

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Metka AČKO

**VEROTOKSIČNOST IN VEČKRATNA ODPORNOST
PROTI ANTIBIOTIKOM BAKTERIJ *Escherichia coli*
IZ VZORCEV ŽIVIL IN VOD**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Metka AČKO

**VEROTOKSIČNOST IN VEČKRATNA ODPORNOST PROTI
ANTIBIOTIKOM BAKTERIJ *Escherichia coli* IZ VZORCEV ŽIVIL IN
VOD**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

**VEROTOXIGENIC AND MULTIDRUG RESISTANT *Escherichia coli*
FROM SAMPLES OF FOOD AND DRINKING WATER**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Food Science and Technology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Živilstvo. Delo je bilo opravljeno v mikrobiološkem laboratoriju Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano in v laboratoriju za živilsko mikrobiologijo, Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina, in za recenzenta prof. dr. Roka Orela.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Recenzent: prof. dr. Rok Orel

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

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

Metka Ačko

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 579.67:614.31:615.9(043)=163.6
KG	patogeni mikroorganizmi/ <i>Escherichia coli</i> /VTEC/ESBL/antibiotiki/odpornost proti antibiotikom/živila/voda/večkratna odpornost/nadzor nad živilu
AV	AČKO, Metka, dipl. inž. živ. in preh. (UN)
SA	SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/OREL, Rok (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2015
IN	VEROTOKSIČNOST IN VEČKRATNA ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM BAKTERIJ <i>Escherichia coli</i> IZ VZORCEV ŽIVIL IN VOD
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo)
OP	XI, 60 str., 11 pregl., 11 sl., 1 pril., 69 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Med bakterije <i>Escherichia coli</i> prištevamo nepatogene seve, ki so običajni prebivalci črevesja ljudi in živali, nekateri sevi pa so zaradi virulentnih dejavnikov, ki jih posedujejo, patogeni za svojega gostitelja. Pogosto jih ugotavljajo v pitni vodi in tudi drugih živilih, predvsem živilih živalskega porekla. Poleg virulentnih genov, dodatno tveganje pri bakterijah <i>E. coli</i> predstavljajo tudi vse pogostejše prisotni geni za odpornost proti antibiotikom. Največje tveganje predstavljajo večkratno odporni sevi. Ti so lahko vzrok usodnih okužb, ki jih ni mogoče ustrezno zdraviti. Tekom magistrskega dela smo iz vzorcev živil in vode osamili 65 sevov <i>E. coli</i> , ostale smo pridobili iz obstoječih zbirk NLZOH v Kranju in laboratorija za živilsko mikrobiologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani, kjer so bili shranjeni po predhodni izolaciji iz živil. Izmed vseh preiskovanih 80 sevov, ki smo jih vključili v nadaljnje preiskave, smo jih pet z molekularno metodo qPCR potrdili kot VTEC in dva kot ESBL. Vse seve smo testirali tudi na odpornost proti antibiotikom. Sevi VTEC in ESBL niso izkazovali odpornosti proti antibiotikom, razen dveh izolatov, enega seva VTEC in enega seva ESBL, ki sta bila potrjena kot večmnogokratno odporna (MDR). Na odpornost proti antibiotikom smo preverjali tudi ostalih 73 nepatogenih sevov <i>E. coli</i> . Večina teh izolatov je bila odporna ali vsaj zmerno občutljiva na vsaj enega od štirinajstih testiranih antibiotikov. Delež na tri ali več antibiotikov odpornih sevov, je bil skoraj enak pri sevih iz živil živalskega in rastlinskega izvora. Proti enemu ali dvema antibiotikoma pa je bilo odpornih največ sevov, izoliranih iz pitne vode, vendar so bile razlike v prevalenci med skupinami zelo majhne. Glede na rezultate testiranja smo na koncu 14 sevov <i>E. coli</i> potrdili kot MDR. Osamili smo jih tako iz vzorcev pitne vode, kot tudi iz živil živalskega in rastlinskega porekla.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDC 579.67:614.31:615.9(043)=163.6

CX pathogens/*Escherichia coli*/VTEC/ESBL/antibiotics/antibiotic resistance/foods/
water/multidrug resistance/food control

AU AČKO, Metka

AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor) / OREL, Rok (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
Technology

PY 2015

TY VEROTOXIGENIC AND MULTIDRUG RESISTANT *Escherichia coli* FROM
SAMPLES OF FOOD AND DRINKING WATER

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)

NO XI, 60 p., 11 tab., 11 fig., 1 ann., 69 ref.

LA sl

Al sl/en

AB The bacterial species *Escherichia coli* includes several nonpathogenic strains that are found in the gastrointestinal tract of humans and animals. However, some strains possessing virulent factors can cause serious food poisoning in their host. They are often identified in drinking water and other foods, especially foods of animal origin. Important characteristic of *E. coli* infections are genes for antibiotics resistance, the risk represents also multidrug resistance. The greatest risk represent multiple-resistant strains, which can cause fatal infections, which can not be adequately treated. During the master thesis work, in total 65 strains of *E. coli* were isolated from the samples of food and water, the other strains were obtained from strains collections in NLZOH Kranj and in Laboratory of Microbiology, Biotechnical Faculty, Ljubljana. Among all investigated 80 isolates from samples of drinking water and food, five strains were confirmed as VTEC and two as ESBL. These samples were also tested for antibiotic resistance, but they did not possess resistance frequency and were neither confirmed as MDR, except one strain of VTEC and one of ESBL. We tested the antibiotic resistance for the other non-pathogenic isolates, as well and most of the isolates were resistant or intermediate resistant to at least one of the antibiotics. Most of the isolated samples was resistant to azithromycin. The isolates with resistance against three or more antibiotics were equally spread in both, meat and non-meat food sources. The proportion of resistant isolates to one or more antibiotics was higher in the samples of drinking water, but the differences in prevalence between the groups are very small. Depending on the test results, we could confirm 14 isolates as MDR. They were isolated from samples of drinking water and also from food.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO PRILOG.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X
1 UVOD.....	1
1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE MAGISTRSKEGA DELA.....	2
1.1.1 Cilji magistrskega dela	2
1.1.2 Delovne hipoteze	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJE RODU <i>E. coli</i>	3
2.1.1 Splošne značilnosti	3
2.1.2 Patogeneza bakterij <i>E. coli</i> in simptomi obolenja.....	4
2.1.3 Pogostnost patogenih bakterij <i>E. coli</i>	7
2.1.3.1 Pojavnost okužb z bakterijo <i>E. coli</i> pri ljudeh	7
2.1.3.2 Pojavnost okužb z bakterijo <i>E. coli</i> pri živalih, vzorcih hrane in pitne vode	8
2.2 ANTIBIOTIKI.....	9
2.2.1 Odpornost bakterij <i>E. coli</i> na antibiotike	12
2.2.2 VTEC in odpornost sevov VTEC na antibiotike.....	14
2.2.3 ESBL in odpornost sevov ESBL na antibiotike	15
3 MATERIAL IN METODE	17
3.1 MATERIALI.....	17
3.1.1 Vzorci živil in vode za izolacijo sevov <i>E. coli</i>	17
3.1.2 Mikrobiološka gojišča za izolacijo in identifikacijo bakterij <i>E. coli</i>	17
3.1.3 Reagenti in materiali za izvedbo PCR	18
3.1.4 Material za testiranje odpornosti na antibiotike.....	18
3.1.5 Ostala laboratorijska oprema.....	19
3.2 METODE.....	20
3.2.1 Priprava vzorcev, izolacija in identifikacija <i>E. coli</i>	20
3.2.2 Izolacija DNK in izvedba q-PCR za potrditev sevov VTEC	21
3.2.3 Izolacija in identifikacija sevov ESBL	22
3.2.4 Testiranje odpornosti proti antibiotikom	23
3.3 SHEMATSKI PRIKAZ EKSPERIMENTALNEGA DELA.....	25
4 REZULTATI.....	26
4.1 IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA <i>E. coli</i> IZ VZORCEV ŽIVIL IN VODE	26

4.2	POTRDI TEV SEVOV VTEC IN ESBL Z METODO q-PCR V VZORCIH ŽIVIL IN OSAMLJENIH SEVIH.....	28
4.3	ANTIBIOTSKA ODPORNOST SEVOV <i>E. coli</i> IZ VZORCEV VOD IN ŽIVIL	29
4.3.1	Antibiotska odpornost izolatov <i>E. coli</i> iz pitne vode.....	36
4.3.2	Antibiotska odpornost izolatov <i>E. coli</i> iz vzorcev živil	37
4.3.3	Mnogokratna odpornost izolatov <i>E. coli</i>	39
4.3.4	Antibiotska odpornost izolatov VTEC.....	40
4.3.5	Antibiotska odpornost sevov ESBL.....	40
5	RAZPRAVA	42
5.1	IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA <i>E. coli</i> IZ VZORCEV ŽIVIL IN VODE	42
5.2	REZULTATI POTRDI TE SEVOV VTEC IN ESBL Z q-PCR.....	42
5.3	ANALIZA REZULTATOV TESTIRANJA BAKTERIJ <i>E. coli</i> NA ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM.....	43
5.3.1	Analiza rezultatov testiranja bakterij <i>E. coli</i> na odpornost proti antibiotikom iz vzorcev pitne vode	43
5.3.2	Analiza rezultatov testiranja bakterij <i>E. coli</i> na odpornost proti antibiotikom iz vzorcev živil.....	45
5.3.3	Mnogokratna odpornost.....	47
5.3.4	Analiza rezultatov odpornosti proti antibiotikom sevov VTEC	48
5.3.5	Analiza rezultatov odpornosti proti antibiotikom sevov ESBL.....	49
6	SKLEPI.....	50
7	POVZETEK.....	51
8	VIRI	53
	ZAHVALA.....	60
	PRILOGA.....	61

KAZALO SLIK

Slika 1: Splošen prikaz okužbe z <i>E. coli</i> (EcL, 2004)	5
Slika 2: Interakcija različnih patogenih bakterij <i>E. coli</i> s črevesnimi celicami (Maciver, 2002)	6
Slika 3: Delež neskladnih vzorcev zaradi fekalne onesnaženosti (prisotnosti <i>E. coli</i>) na vodnih območjih po Sloveniji (Gale in sod., 2014)	9
Slika 4: Trend naraščanja ESBL pozitivnih <i>E.coli</i> (EARS-Net/HPSC, 2014)	16
Slika 5: Princip cepljenja <i>E. coli</i> z ezo na gojišče krvni agar in TBX (levo) in na gojišče TTC (desno)	21
Slika 6: Kombinacije diskov za potrditev sevov ESBL	23
Slika 7: Mikrotitrna ploščica Sensititre® za ugotavljanje odpornosti <i>E. coli</i> na antibiotike	24
Slika 8: Shema poteka eksperimentalnega dela	25
Slika 9: Bakterija <i>E. coli</i> po inkubaciji na gojišču TBX (levo) in TTC (desno)	26
Slika 10: Odstotek občutljivosti oz. odpornosti <i>E. coli</i> na en antibiotik (R1), dva (R2) in 3 ali več (R3+) antibiotikov pri sevih, izoliranih iz vzorcev pitne vode in živil različnega izvora (n=80)	40
Slika 11: Primerjava rezultatov odpornosti <i>E. coli</i> na antibiotike glede na izvor sevov ..	41

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava gojišča TSB (formula za liter destilirane vode) (BD and Company, 2008)	17
Preglednica 2: Sestava gojišča TBX – za 1 liter gojišča (NEOGEN, 2009).....	18
Preglednica 3: Podatki o sevih <i>E. coli</i> , pridobljenih in testiranih v nalogi	27
Preglednica 4: Odčitane vrednosti MIK ($\mu\text{g/ml}$) testiranih izolatov bakterije <i>E. coli</i> iz vzorcev vod in živil rastlinskega in živalskega porekla.....	30
Preglednica 5: Antibiotična odpornost bakterije <i>E. coli</i> v izoliranih vzorcih	34
Preglednica 6: Odstotek proti posameznemu antibiotiku odpornih izolatov bakterije <i>E. coli</i> iz vzorcev pitne vode	37
Preglednica 7: Število sevov <i>E. coli</i> z določeno MIK antibiotika (sevi iz vzorcev pitne vode, $n = 40$)	37
Preglednica 8: Število sevov <i>E. coli</i> z določeno MIK antibiotika (sevi iz vzorcev ŽŽP, $n = 22$)	38
Preglednica 9: Število sevov <i>E. coli</i> z določeno MIK antibiotika (sevi iz vzorcev ŽRP, $n = 18$)	39
Preglednica 10: Odstotek proti posameznim antibiotikom odpornih izolatov bakterije <i>E. coli</i> , ločeno glede na izvor, živila živalskega porekla ($n = 17$) in živila rastlinskega porekla ($n = 18$).....	39
Preglednica 11: Primerjava odpornosti izolatov <i>E. coli</i> iz vzorcev hrane med posameznimi leti.....	46

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Rezultati protimikrobnih testov vseh osemdesetih vzorcev, za vsak antibiotik, z označenimi območji občutljivosti, zmerne občutljivosti in rezistence.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AMP	ampicilin (angl. Ampicillin)
AZI	azitromicin (angl. Azithromycin)
CDC	Center za nadzor in preprečevanje bolezni (angl. Centers for Disease Control and Prevention)
CHL	kloramfenikol (angl. Chloramphenicol)
CIP	ciprofloksacin (angl. Ciprofloxacin)
COL	kolistin (angl. Colistin)
CLSI	inštitut za klinične in laboratorijske standarde (angl. Clinical and Laboratory Standards Institute)
DAEC	difuzno adherentne <i>E. coli</i>
EAEC	enteroagregativne <i>E. coli</i>
EARS-Net	Evropska mreža za spremljanje protimikrobne odpornost (angl. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network)
ECDC	Evropski center za nadzor in preprečevanje bolezni (angl. European Centre for Disease Prevention and Control)
EcL	The Reference Laboratory for <i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EFSA	Evropska agencija za varno hrano (angl. European Food Safety Authority)
EGP	Evropski gospodarski prostor
EHEC	Enterohemoragična <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvazivne <i>E. coli</i>
EPEC	enteropatogene <i>E. coli</i>
ESBL	Beta-laktamaze razširjenega spektra
ETEC	enterotoksigene <i>E. coli</i>
FOT	cefotaksim (angl. Cefotaxime)
GEN	gentamicin (angl. Gentamicin)
HUS	hemolitično uremični sindrom
MDR	večkratna odpornost na antibiotike (angl. multidrug resistant)
MERO	meropenem (angl. Meropenem)

MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
NAL	nalidiksinska kislina (angl. Nalidixic Acid)
NLZOH	Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano
PROMISE	zaščita potrošnikov z zmanjšanjem mikrobiološkega tveganja s hrano (angl. Protection of consumer through mitigation of segregation of expertise)
SMX	sulfametoksazol (angl. Sulfamethoxazole)
STEC	<i>E. coli</i> , ki izdelujejo shigove toksine
TAZ	ceftazidim (angl. Ceftazidime)
TBX	Trypton Bile x-glukoronid agar
TET	tetraciklin (angl. Tetracycline)
TGC	tigeciklin (angl. Tigecycline)
TMP	trimetoprim (angl. Trimethoprim)
TSB agar	triptični soja bujon agar
TTC	trifenil tetrazolijev klorid
TTP	trombotična trombocitopenična purpura
UVHVVR	Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin
VTEC	verotoksična <i>E. coli</i>

1 UVOD

Bakterija *E. coli* je naravni prebivalec prebavnega trakta ljudi in živali ter glavni indikator fekalne kontaminacije v živilih in vodah. Preko prehranjevalne verige se zlahka razširi v različne ekosisteme (Sabaté in sod., 2008).

Mikrobiološka varnost hrane je pomemben javnozdravstveni problem. Čeprav je večina živil pripravljena po mikrobioloških standardih določene države, pa je še vedno velik delež hrane kontaminirane z *E. coli*. Procesi za pripravo in ravnanje z živilom zahtevajo posebno pozornost, da bi preprečili kontaminacije s komezalnimi ali patogenimi bakterijami (Soufi in sod., 2011).

Patogeni sevi *E. coli* lahko povzročajo pri ljudeh različne bolezni, kot so diareja, okužbe sečil, sepsa in meningitis. Sevi, ki povzročajo črevesne okužbe, sodijo med enteropatogene *E. coli* (EPEC), enterotoksigene *E. coli* (ETEC), enteroinvazivne *E. coli* (EIEC), enteroagregativne *E. coli* (EAEC), difuzno adherentne *E. coli* (DAEC) in *E. coli*, ki izdelujejo Shiga toksine (STEC) ali verotoksine (VTEC). Pri okužbi s sevi VTEC pride včasih do nevarnega zapleta, zlasti pri otrocih in starejših, hemolitično uremičnega sindroma (HUS). Virulentni dejavniki in geni, povezani z virulenco, so pri patogenih *E. coli* številni in zelo različni, nekateri med njimi so značilni za posamezno skupino, mnogi pa se pojavljajo pri različnih skupinah (Grilc in sod., 2014).

Zdravljenje okužb z *E. coli* je vedno bolj oteženo zaradi razvoja odpornosti na večino najpogostejše uporabljenih antibiotikov (Sabaté in sod., 2008). Vsa uporabljena antimikrobna sredstva so igrala in še igrajo pomembno vlogo pri zdravljenju bolezni, ter pri zmanjševanju smrtnosti, vendar so bakterije razvile učinkovite mehanizme odpornosti proti tem protimikrobnim zdravilom. Svetovni pojav na antibiotike odpornih sevov je vzpodbudil skrb za javno zdravje (Alexander in sod., 2010).

Hitro širjenje rezistentnih bakterij je globalni problem, ki resno otežuje zdravljenje okužb pri ljudeh. Različni dejavniki lahko prispevajo k temu, saj velika uporaba protimikrobnih zdravil pri ljudeh in živalih daje sposobnost bakterijam za širjenje genov za odpornost na druge bakterije (Soufi in sod., 2011). Antibiotiki, ki se uporabljajo za zdravljenje in preprečevanje bakterijskih okužb pri živalih, sodijo v iste kemijske skupine kot antibiotiki, ki se uporabljajo pri ljudeh. To pomeni, da se tudi pri živalih lahko pojavijo bakterije, ki so odporne proti antibiotikom, ki se uporabljajo za zdravljenje okužb pri ljudeh. V preteklih letih so poročali o povečanju števila okužb z *E. coli*, odpornimi proti več antibiotikom hkrati, vključno s flourokinoloni in cefalosporini tretje generacije. Predhodno zdravljenje z antibiotiki, npr. s flourokinoloni, povečuje tveganje za pojav odporne *E. coli*, ki se lahko nato širi med ljudmi (ECDC, 2013).

Tveganje za varnost živil oziroma zdravje potrošnikov pa predstavljajo tudi geni, ki kodirajo odpornost proti antibiotikom pri komenzalnih oziroma nepatogenih bakterijah *E. coli*. Še posebej so nazaželjene večkratno odporne bakterije, saj predstavljajo rezervoar črevesnih bakterij od koder se odpornost lahko širi na druge seve iste vrste ali celo med vrstami. Zaradi izjemne gostote bakterijske mikrobiote v črevesju živali in ljudi je ta prenos lahko pogostejši. Zato je sledenje večkratno odpornih sevov črevesnih bakterij zelo pomembno za preprečevanje tveganja prenosa odpornih bakterij v živilski proizvodno prehranski verigi (Smole Možina in sod., 2011). Večkratno odporne patogene in komenzalne bakterije vrste *E. coli* potrebujejo več pozornosti v preiskavah živil in sorodnih vzorcev (Szmolka in Nagy, 2013).

1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE MAGISTRSKEGA DELA

1.1.1 Cilji magistrskega dela

Pred začetkom eksperimentalnega dela smo si zadali naslednje cilje:

- Iz različnih vzorcev živil in vod, ki so predvideni v monitoringu, ugotoviti prisotnost in osamiti seve bakterije *E. coli*.
- Fenotipsko in genotipsko ugotoviti morebitno prisotnost verotoksigenih sevov (VTEC) in ESBL sevov v vzorcih živil in vode in potrditi ta rezultat tudi na osamljenih sevih bakterij *E. coli*.
- Z mikrodilucijsko metodo določiti odpornost pridobljenih sevov na standardni set protimikrobnih zdravil in rezultate analizirati glede na izvor sevov (živila/vode) ter glede na druge, že zbrane rezultate (humani, živalski/živilski sevi), osamljenih iz slovenskih vzorcev ter vzorcev živil, nelegalno vnesenih v EU (projekt Promise, 2012 - 2014).

1.1.2 Delovne hipoteze

Predpostavili smo:

- Iz vzorcev živil in vode, vključenih v monitoring, bomo izolirali različne seve *E. coli*.
- Med izoliranimi sevi *E. coli* bomo potrdili tudi seve VTEC ki izdelujejo Shiga toksine, seve ESBL, ter seve, ki bodo odporni na določene antibiotike.
- Prisotnost genov, odgovornih za virulentne dejavnike in odpornost proti antibiotikom, se bo razlikovala med sevi glede na njihov izvor.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJE RODU *E. coli*

2.1.1 Splošne značilnosti

E. coli spada med najpogostejše bakterije v prebavilih (črevesju) vsakega izmed nas. Sodi v družino enterobakterij, imenovano *Enterobacteriaceae*. Najdemo jo v črevesju človeka in živali. *E. coli* je po Gramu negativna, torej ni sposobna tvorbe spor, fakultativno anaerobna, paličasta bakterija. Omenja se kot najbolj preučevan prosto živeč organizem, odkrili pa so že več kot 700 različnih serotipov (Adamič in sod., 2003).

Posamezne tipe ločimo na osnovi O-K-H- antigenov, kjer so O-antigeni liposaharidi, ki se nahajajo na zunanji celični ovojnici, K-antigeni so kapsularni polisaharidi in H-antigeni flagelarni proteini. *E. coli* je običajno neškodljiva in je pomemben del zdravega prebavnega trakta. Vendar pa so nekateri sevi patogeni, kar pomeni, da lahko povzročijo bolezni, bodisi drisko ali bolezen izven prebavnega trakta, predvsem okužbe sečil (ECDC, 2013). Patogene vrste *E. coli* se lahko prenašajo z okuženo vodo ali hrano ali prek stika z živalmi ali ljudmi. *E. coli* je sestavljena iz raznolike skupine bakterij, patogeni sevi pa so razvrščeni v patotipe (CDC, 2014). Viri bakterije so kontaminirana hrana, predvsem mleto govedina, nepasterizirano (surovo) mleko in sok, mehki siri iz surovega mleka in surovo sadje in zelenjava, npr. kalčki, onesnažena voda, vključno s pitno vodo, živali in njihovo okolje (Gyles, 2007).

Bakterije *E. coli* so indol in metilrdeče pozitivne, Voges Proskauer in citrat negativne in ne tvorijo žveplovodika. Optimalni pogoji za rast so med 10 °C do 46 °C, lahko pa rastejo tudi pri 4 °C. Minimalna aktivnost vode (a_w), torej količina proste vode v živilu za rast je med 0,93 in 0,96, najnižji pH pa 4,3. Pri temperaturah med 44 °C in 45,5 °C tvorijo plin in kislino iz laktoze (Adamič in sod., 2003).

Zdravljenje črevesnih nalezljivih bolezni (ČNB), povzročenih z okužbo z *E. coli*, je večinoma z nadomeščanjem izgubljene tekočine, v nekaterih primerih zdravljenje z antibiotik, naprimer v primeru težkega septičnega poteka bolezni (Blatnik in sod., 2002). Okužba ponavadi izzveni sama brez dolgotrajnih in hudih znakov okužbe. Vendar pa patogeni sevi, kot so *E. coli* O157:H7 in *E. coli* O104:H4, lahko poleg krvave driske povzročijo tudi odpoved ledvic, v skrajnih primerih smrt. Pravilna priprava živil, dobro oprana sadje in zelenjava, preprečevanje navzkrižne kontaminacije živil in temeljito umivanje rok, lahko preprečijo okužbe z *E. coli* (IVZ, 2010).

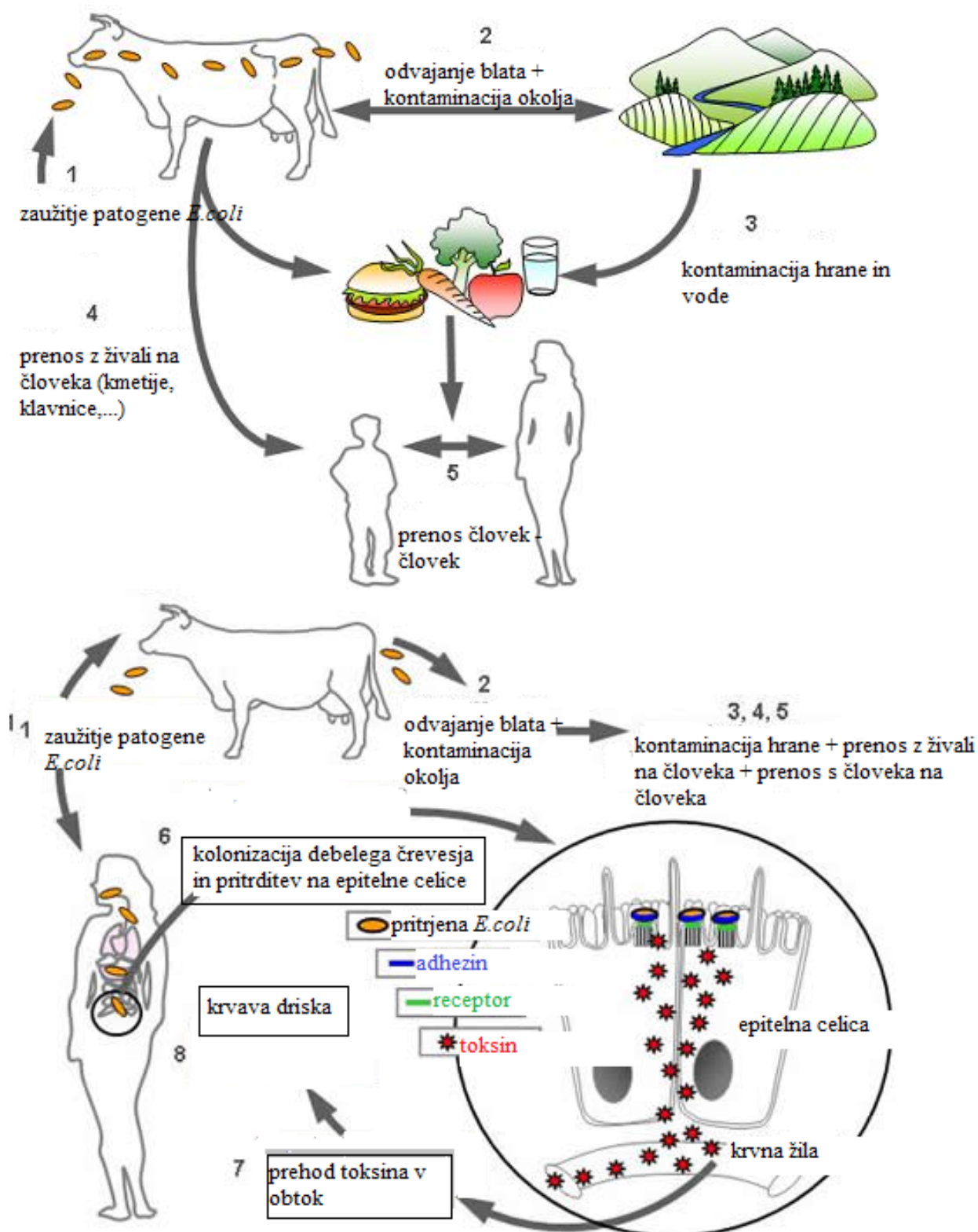
2.1.2 Patogeneza bakterij *E. coli* in simptomi obolenja

Poznamo pet različnih mehanizmov, prek katerih *E. coli* delujejo in povzročajo bolezni. Glede na patogenezo jih delimo na enterohemoragične, enterotoksične, enteropatogene, enteroinvazivne, in enteroagregativne (Blatnik in sod., 2002).

Zunajčrevesne okužbe z bakterijo *E. coli* so večinoma endogene (povzroči jih lastna flora, ki se razširi v področja, kjer je normalno ni) ali prenesene z rokami in postopki (npr. pri vstavljanju urinskega katetra). Pri okužbah prebavil se okužimo z uživanjem kontaminirane hrane oz. vode ali pa fekalno-oralno od bolnika oz. klicenosca (Kotnik, 2011).

Med zelo patogene spada enterohemoragična *E. coli* (EHEC), serotip O157:H7, ki je bila leta 1982 prvič opisana kot povzročiteljica krvave driske pri človeku. EHEC povzroča krvavo drisko s težko klinično sliko, še zlasti pri otrocih in starejših ljudeh, kar kaže na velik pomen imunskega odgovora gostitelja. Povzroča epidemije in sporadične primere drisk. Pri zdravih odraslih je potek okužbe lahko tudi asimptomatski. Ker je toksin EHEC zelo podoben toksinu, ki ga izloča *Shigella dysenteriae*, se imenuje Shiga toksin. Toksično deluje na kulture vero ledvičnih celic, zato se imenuje tudi verotoksin. Genska informacija za sintezo verotoksina se med *E. coli* prenaša prek bakteriofagov. Infektivni odmerek EHEC O157:H7 je nizek. Zadostuje manj kot 70 živih bakterij v zaužiti hrani, da se razvije driska. Inkubacija bolezni traja 4-8 dni. V klinični sliki je v ospredju intenzivna driska, ki je sprva vodena, kasneje pogosto hemoragična. Drisko spremljajo krčevite bolečine v trebuhu in bruhanje. Telesna temperatura je normalna ali blago povišana. Bolezen traja 1-12 dni, v povprečju 8 dni (Blatnik in sod., 2002).

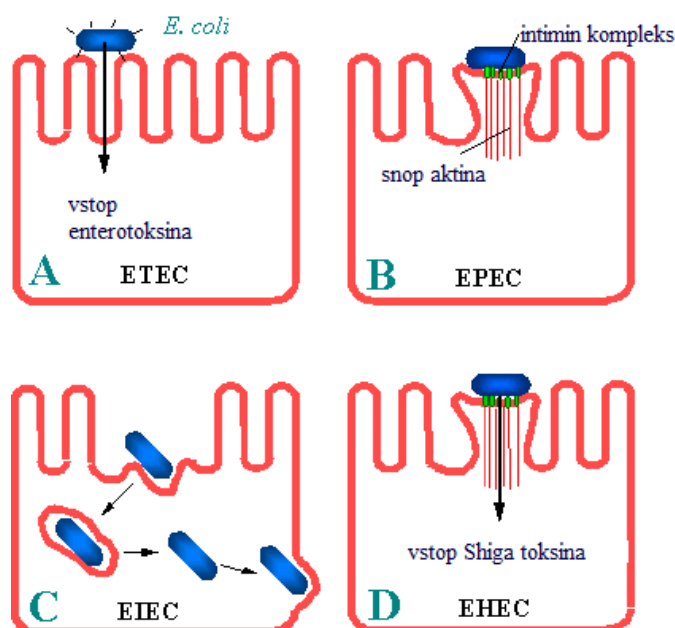
Verotoksigene *E. coli*, kamor sodi tudi EHEC, kolonizirajo prebavni trakt goveda in drugih prežvekovalcev, vendar ne povzročajo bolezni pri teh živalih. Bakterije se izločijo z blatom v okolje, kjer ga onesnažujejo, vključno z pitno vodo in vodo za namakanje. Lahko pride tudi do direktne kontaminacije živil, kot na primer sadja, zelenjave, surovega mleka, lahko pa se kontaminirajo tudi klavni trupi ob samem zakolu živali. Lahko pride do neposrednega prenosa iz človeka na človeka, in sicer z osebami, ki na kmetijah ali klavnicah prihajajo v neposreden stik z živalmi. Pri ljudeh te patogene bakterije naselijo predvsem debelo črevo in se pritrdijo na črevesno sluznico. Bakterije proizvajajo posebne receptorje, ki jih injicirajo v epitelijske celice gostitelja. Adhezini posredujejo bakterijske signale do celičnih receptorjev. Pritrjene bakterije sproščajo toksin, ki se prenaša preko epitelijskih celic v obtoku. Tako povzročijo pri gostitelju krvavo drisko in bolečine v trebuhu. Pride lahko do zapletenega hemolitično uremičnega sindroma (HUS) ali trombotične trombocitopenične purpure (TTP), ki lahko privedeta do akutne odpovedi ledvic (EcL, 2004).



Slika 1: Splošen prikaz okužbe z *E. coli* (EcL, 2004)

Na sliki 2 je prikazana interakcija različnih patogenih bakterij *E. coli* z epitelijskimi celicami v črevesju.

- A - ETEC se preko fimbrij veže na črevesno celico in izloča strupe (toplotno labilni enterotoksin), ki nato vstopi v celico, ne da bi jo poškodoval.
- B - EPEC se veže na mikrovile enterocitov in jih uniči. Ostane čvrsto pritrjena na površino sluznice tankega črevesa.
- C - EIEC se pripnejo na površino črevesnih celic in jih uničijo. Vstopijo v celico, kjer se lahko razmnožujejo in invadirajo sosednje celice.
- D – EHEC izločajo verotoksine v epitelne celice, ki poškodujejo črevesno sluznico, lahko pa tudi druge organe. Toksin potuje od Golgijevega aparata do ribosomov in uniči celico.



Slika 2: Interakcija različnih patogenih bakterij *E. coli* s črevesnimi celicami (Maciver, 2002)

2.1.2.1 Virulentni dejavniki *E. coli*

Pri *E. coli* so virulentni dejavniki, ki povzročajo diarejo, številni in zelo različni. Njihovo prepoznavanje omogoča boljšo diagnostiko bolezni, ki jo povzročajo. Seve ki povzročajo črevesne okužbe, delimo v različne skupine, predvsem glede na klinično sliko bolezni, ki jo povzročajo, in specifične virulentne dejavnike. Tako EPEC povzročajo histopatološke spremembe črevesnega epitela. VTEC izdelujejo verotoksine 1 in 2, nekateri sevi lahko izdelujejo obe skupini verotoksinov. ETEC izdelujejo toplotno labilne (LT) in toplotno stabilne (ST) enterotoksine, nekateri sevi izdelujejo obe vrsti teh toksinov. Značilnost EIEC je, da so sorodne šigelam in da vstopajo v epitelne celice, se v njih razmnožujejo in nato prehajajo v sosednje celice. EAEC se pritrjujejo na celice črevesne sluznice in nekatere izdelujejo enterotoksine in citotoksine (Trkov in sod., 2008).

Zapisi za te virulentne dejavnike so na genetskih elementih, kot so plazmidi in bakteriofagi. Ti geni, ki so povezani z virulenco *E. coli*, so gen *ipaH* pri EIEC. Gena *eltA* in *estA* pa kodirata toplotno labilni in toplotno stabilni enterotoksin pri ETEC. Gen *eae* nosi zapis za adhezin EPEC in nekaterih VTEC na celice epitelijske črevesne sluznice. Geni *vtx1* in *vtx2* oziroma *stx1* in *stx2* pa nosita zapis za verocitotoksine (Trkov in sod., 2008).

Sevi *E. coli* so pomemben etiološki dejavnik pri driski, predvsem pri prašičih. Tako je sposobnost patogenih sevov *E. coli* razmnoževanje in kolonizacija tankega črevesja, kot tudi izločanje enterotoksina. *E. coli*, izolirane iz prašičev, so sposobne proizvajati fimbrije. Te površinske strukture so odgovorne za adhezijo patogenih sevov na črevesne epitelijske celice. Sevi, ki imajo fimbrije, lahko izločajo še enega ali več enterotoksinov (Osek in sod., 1999).

2.1.3 Pogostnost patogenih bakterij *E. coli*

2.1.3.1 Pojavnost okužb z bakterijo *E. coli* pri ljudeh

Bakterije *Escherichia coli* so v Sloveniji za kampilobaktri, salmonelami in bakterijami vrste *Clostridium difficile* četrti najpogostejši bakterijski povzročitelj drisk. Število prijav v Sloveniji je bilo v letu 2013 enako številu prijav adenovirusnih enterokolitisov. Najvišja prijavna incidenčna stopnja je bila v novogoriški regiji (24,6/100.000 prebivalcev), sledili sta celjska (17/100.000 prebivalcev) in kranjska regija (4,4/100.000 prebivalcev). Glede na prijave med posameznimi skupinami prevladujejo enteropatogene *E. coli*. Število vseh prijav je bilo v letu 2013 za 15 % nižje kot v letu 2012. Dejansko število okužb z *E. coli* je verjetno večje. Število prijav je podcenjeno zaradi nepopolne prijave in neprepznanih primerov okužbe. V letu 2013 je NLZOH potrdil 17 primerov prisotnosti genov za verotoksine iz blata ljudi. Največ bolnikov je bilo med majhnimi otroci, največ izolatov VTEC pa je pripadlo serološki skupini O26. V Sloveniji je trend okužb z *E. coli* najvišji v poletnih mesecih, med junijem in septembrom, najnižji pa v zimskih mesecih (Grilc in sod., 2014).

V letu 2011 je ECDC zabeležil porast incidence VTEC okužb v državah EU, ki je znašala 2,54 na 100.000 prebivalcev. Porast je bila predvsem posledica obsežne epidemije v Nemčiji. Prevladovali sta serološki skupini O157 in O104. Pojavnost okužb z VTEC v državah EU vseskozi nekoliko narašča (Grilc in sod., 2014).

Leta 2004 je bilo v državah sveta število laboratorijsko potrjenih okužb z EHEC v EU in na Norveškem 1,3 na 100.000 prebivalcev, medtem ko je bilo v ZDA takšnih primerov 0,9 na 100.000 prebivalcev. Frekvenca okužb z EHEC, predvsem potrjenih primerov HUS, je bila višja v Argentini, kjer je bilo 22 primerov HUS-a na 100.000 otrok, starih med 6 in 48 mesecev (Stein, 2004).

Iz članka Franza in sod. (2014) lahko povzamemo pojavnost *E. coli* O157 po svetu. In sicer je največja pojavnost na 100.000 prebivalcev v Argentini, tako kot tudi pojav HUS-a kar je omenjeno že zgoraj, in sicer je incidenca 13,9 na 100.000 prebivalcev. Sledijo Nova Zelandija (3,6), ZDA (0,9), Japonska (0,87), Švedska, kjer so rezultati predstavljeni med leti 2005 in 2012, pojavnost pa je 0,81 na 100.000 prebivalcev. Sledijo še Nizozemska, s podatki iz leta 2012 (0,33) in Avstralija z najmanj prijavljenimi primeri okužb z *E. coli* O157 (0,12/100.000 prebivalcev).

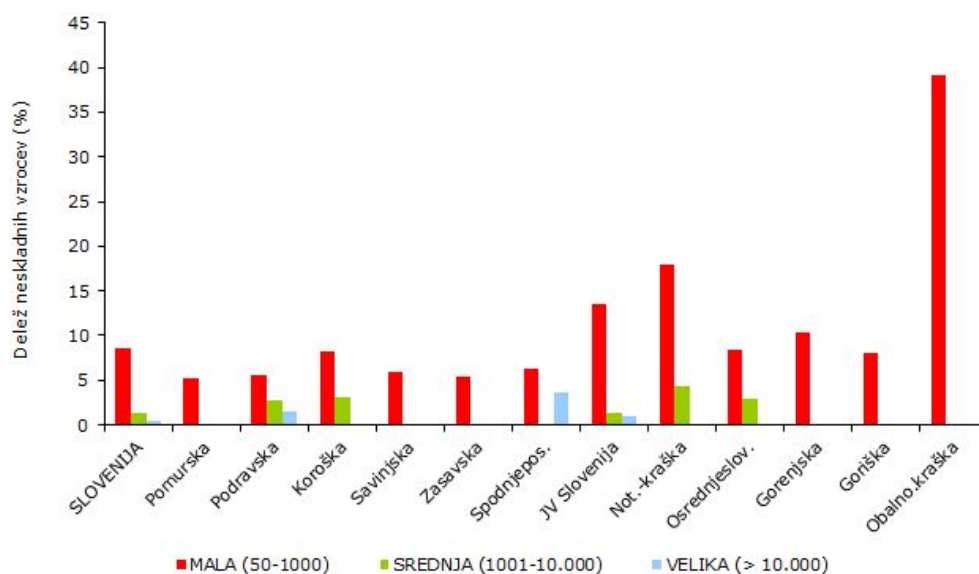
2.1.3.2 Pojavnost okužb z bakterijo *E. coli* pri živalih, vzorcih hrane in pitne vode

V okviru izvajanja letnega monitoringa so na Upravi za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin spremljali prisotnost VTEC v živilih živalskega in neživalskega izvora ter vodi za namakanje. Skupaj so analizirali 382 vzorcev živil ter 8 vzorcev vode za namakanje. Pri vzorcih živil živalskega izvora se je prisotnost genov *vtx1* in /ali *vtx2*, ter tudi prisotnost genov posameznih seroloških skupin ugotovila pri 13 vzorcih od 184 analiziranih vzorcev. Pri 10 vzorcih mletega mesa in mesnih pripravkov so ugotovili prisotnost genov *vtx1* in/ali *vtx2*, ter tudi prisotnost genov ene izmed petih seroloških skupin, ki se najpogosteje pojavljajo kot povzročitelji okužb s hrano pri ljudeh. Prav tako so gene za verotoksičnost ugotovili pri dveh vzorcih nemenskega izvora in enem vzorcu namakalne vode (Grilc in sod., 2014).

V letnem poročilu o zoonozah in povzročiteljih zoonoz Uprave RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin iz leta 2013 poročajo, da so v živilih in vodi za namakanje določali verotoksično *E. coli* (VTEC). Skupaj so analizirali 382 vzorcev živil mesnega izvora in sveže zelenjave in semen za kaljenje, ter 8 vzorcev vode za namakanje. V 13 vzorcih mesnih živil so ugotovili prisotnost genov *vtx1* in/ali *vtx2*, pri 10 vzorcih pa se je poleg genov za verotoksičnost potrdila tudi prisotnost genov ene izmed petih seroloških skupin, ki se najpogosteje pojavljajo kot povzročitelji okužb s hrano (O157, O103, O26, O145 in O111). Prisotnost izolata serološke skupine O103, *vtx2* se je potrdila samo pri 1 vzorcu mesnega pripravka, pri 1 vzorcu mletega mesa pa je bila potrjena prisotnost netoksigenega seva O157. Pri živilih neživalskega porekla je bilo število potrjenih genov *vtx1* in/ ali *vtx2* nekoliko nižje, prav tako pri namakalnih vodah. Pri dveh vzorcih zelenjave in enem vzorcu namakalne vode so ugotovili gene za verotoksičnost (UVHVVR, 2014).

Iz poročila Agencije Republike Slovenije za okolje iz leta 2013 lahko podamo rezultate mikrobiološke onesnaženosti pitne vode z *E. coli*. Vzorce so zbirali po celotni Sloveniji, rezultati pa so prikazani za vsako regijo in ločeno po velikosti vodnega območja, iz katerega izvira vzorec (Slika 3).

.



Slika 3: Delež neskladnih vzorcev zaradi fekalne onesnaženosti (prisotnosti *E. coli*) na vodnih območjih po Sloveniji (Gale in sod., 2014)

2.2 ANTIBIOTIKI

Antibiotiki so povečini naravni produkti mikroorganizmov ali naravnemu produktu podobne sintetične ali polsintetične spojine, ki zavirajo ali onemogočijo razmnoževanje drugih mikroorganizmov in se uporabljajo za zdravljenje mikrobni okužb. V grobem jih ločimo na antibiotike širokega spektra, ki delujejo na več vrst različnih mikroorganizmov, in antibiotike ozkega spektra, ki delujejo specifično na eno vrsto mikroorganizmov. V širšem smislu so antibiotiki kemoterapevtska sredstva, ki inhibirajo ali preprečujejo rast mikroorganizmov, kot so bakterije, glive ali praživali. Izraz antibiotik se nanaša prvotno na kateri koli agens z biološko aktivnostjo proti živim organizmom. Sedaj se ta izraz uporablja za snovi z antibakterijsko, antiglivično ali antiparazitsko dejavnostjo (Krümmerer, 2009a).

V farmacevtski industriji so bili prvi antibiotiki, npr. penicilin ali streptomycin naravnega izvora, sedaj pa so pridobljeni s kemično sintezo ali s kemično modifikacijo spojin naravnega izvora. Razen po načinu izdelave se praktično ne razlikujejo med sabo (Krümmerer, 2009a).

Antibiotiki so med najbolj pogosto uporabljenimi zdravili v bolnišnicah. Po študiji jemanja antibiotikov v bolnišnicah v ZDA je v letu 2010 56 % bolnikov dobilo antibiotik med hospitalizacijo. Za do 50 % predpisanih antibiotikov so ugotovili, da so bili napačno predpisani, ali da je šlo pri zdravljenju za napačno terapijo. Prav tako je eno zadnjih poročil pokazalo, da je bilo pri 30 % hospitaliziranih odraslih bolnikov v enotah za intenzivno nego zdravljenje z antibiotiki nepotrebno. Ne samo da se s tem, ko se napačno

ali po nepotrebnem predpisujejo antibiotiki, višajo stroški za zdravstvo, to prispeva tudi k vse večjemu javnozdravstvenemu problemu, saj na tak način bakterije pridobivajo na odpornosti na te pogosto uporabljene antibiotike (Cakmakci, 2015). V državah EU se med antibiotiki največ predpisujejo penicilini (13–57 %), sledijo cefalosporini (8–31 %), kinoloni (4–17 %), makrolidi (3–13 %), tetraciklini (0–12 %) in drugi antibiotiki (6–27%). Slovenija po porabi antibiotikov sodi v to povprečje. Sicer pa se v Sloveniji opaža stabilna raba antibiotikov v bolnišnicah (Kolman in sod., 2006).

Ene večjih omejitev za uspešno protimikrobno zdravljenje je postopno nastajanje odpornosti proti tem zdravilom, zlasti v državah v razvoju. Zaradi izrazitega povečanja odpornosti na antibiotike predvsem, med patogenimi črevesnimi bakterijami, je postalo nujno najti učinkovitejša protimikrobna sredstva. Tako so fluorokinoloni in cefalosporini širokega spektra delovanja skupine, katerih učinkovitost proti črevesnim patogenom iz družine enterobakterij še ni ogrožena zaradi pridobljene odpornosti (Chayani in sod., 2009).

Poznamo veliko različnih antibiotikov, glede na njihovo kemijsko zgradbo in mehanizem delovanja jih razvrščamo v več skupin. V odvisnosti od delovanja na mikrobne celice jih razdelimo na:

- bakteriostatične (zavirajo rast celic in replikacijo),
- bakteriolitične (lizirajo mikroorganizme, povezani so s poškodbami bakterijske celične stene) in
- baktericidne (povzročijo celično smrt).

Večina novejših baktericidnih protimikrobnih sredstev glede na spekter delovanja deluje tako, da zavira sintezo DNK, sintezo RNK (kinoloni, sulfamidi), ali zavirajo sintezo celične stene (cefalosporini), ali preprečujejo sintezo celičnih beljakovin (aminoglikozidi, tetraciklini, makrolidi, fenikoli) (Kohanski in sod., 2010).

Glede na kemijsko strukturo pa jih razdelimo na betalaktame, kamor uvrščamo peniciline, cefalosporine, karbapeneme, monobaktame in makrolide. Potem so še tetraciklini, aminoglikozidi, kinoloni in flouorokinoloni, linkozamidi, glikopeptidi, polimiksini, oksazolidini, nitrofurani in nitroimidazoli.

Nekoliko podrobneje sem opisala le skupine antibiotikov, ki smo jih testirali v naši nalogi. **Beta-laktamski** antibiotiki obsegajo veliko skupino antibiotikov, vključno s penicilini, cefalosporini in sorodnimi spojinami, ki v svoji kemijski zgradbi vsebujejo betalaktamski obroč. Imajo širok spekter delovanja in so najbolj razširjena skupina antibiotikov. Svojo učinkovitost izražajo z zaviranjem sinteze peptidoglikanskega ogrodja celične stene mikroorganizmov. Imajo baktericiden učinek. Bakterijska odpornost proti β -laktamskim antibiotikom se povečuje in postaja pogosta težava v osnovni zdravstveni oskrbi. Obstaja več mehanizmov protimikrobne odpornosti β -laktamskih antibiotikov. Pomemben

mehanizem je proizvodnja β -laktamaze, encima, ki hidrolizira β -laktamski obroč in ga s tem inaktivira. V to skupino strukturno sodijo tudi cefalosporini, ki imajo beta-laktamski obroč in tiazolidinski obroč. Razdeljeni so v tri generacije, odvisno od njihovega spektra delovanja. Komercialno dostopen cefalosporin je bil uveden leta 1962, čeprav so sprva mislili, da je samo izboljššan derivat penicilina (Holten in Onusko, 2000).

V skupino antibiotikov, ki zavirajo normalno delovanje celične membrane, uvrščamo **kolistin**. Kolistin je polipeptidni antibiotik iz skupine antibiotikov, imenovanih **polimiksini**. Delujejo baktericidno na Gram negativne bakterije s porušenje strukture in funkcije zunanje citoplazemske membrane bakterij. Podatki v zvezi s klinično učinkovitostjo so omejeni, so pa leta 1960 ugotovili, da je učinkovit pri zdravljenju okužb s po Gramu negativnih bakterij, ki so odporne na druge antibiotike (Markou in sod., 2003).

V skupino antibiotikov, ki preprečujejo sintezo beljakovin, sodijo **aminoglikozidi**. Aminoglikozidi so ene prvih, a še vedno pomembnih antibakterijskih pripravkov. So naravni fermentacijski proizvodi ali njihovi polysintetični derivati, sestavljeni iz sladkorne in aminske skupine. V osnovi so vodotopne molekule, ki kažejo baktericidno učinkovitost, zlasti za zdravljenje Gram-negativnih bakterijskih okužb in tuberkuloze. Negativne lastnosti te skupine antibiotikov so razvoj odpornosti, ototoksičnost in nefrotoksičnost. Razdeljeni so v tri generacije. Gentamicin, ki smo ga za določanje antimikrobne odpornosti uporabili v tej nalogi se uvršča v drugo generacijo aminoglikozidov. Delujejo tako, da se vežejo na 30S ribosomske podenote in s tem motijo sintezo beljakovin, stopnja aktivnosti pa je odvisna od njihove koncentracije v krvi (Kirst in Allen, 2013).

Makrolidni antibiotiki se pogosto uporabljajo za okužbe spodnjih in zgornjih dihal, okužbe mehkih tkiv, povzročenih z okužbo Gram pozitivnih bakterij. Razdeljeni so na eritromicin, prvi makrolidni antibiotik in neeritromicine, kamor sodita klaritromicin in azitromicin. Makrolidni antibiotiki so drugi najpogostejše uporabljeni antibiotiki v ZDA v času nosečnosti. Protimikrobni učinek je povezan s preprečevanjem sinteze proteinov. Vežejo se na 50S ribosomske podenote in s tem zavirajo procese na peptidni verigi in preprečujejo premestitvene reakcije (Lin in sod., 2013).

Tetraciklini so antibiotiki s širokim spektrom delovanja. So antibiotiki z bakteriostatičnim delovanjem, ki se vežejo na 30S ribosomske enote, s čimer zavirajo sintezo bakterijskih beljakovin. Tetraciklini delujejo tako, da blokirajo dostop aminoacila-tRNK do ribosoma 92 (Kohanski in sod., 2010).

Skupina protibakterijskih zdravil, imenovanih **kinoloni**, se v klinični praksi uporablja od zgodnjih 60. let. Kinoloni vključujejo dve glavni skupini zdravil, in sicer ne-fluorirane kinolone in fluorokinolone. Imajo baktericidni učinek, ki je odvisen od koncentracije doziranja. Inhibirajo delovanje encimov giraza in topoizomeraza, ki sta ključna za sintezo

DNK v mikrobnih celicah. Zaviranje teh funkcij pa vodi do nepovratnih sprememb v mikroorganizmu in njegove smrti (Drlica in sod., 2008).

Sulfamidi ali sulfonamidi so prvi razred antibakterijskih spojin, odobrenih za široko uporabo. Sulfonamidni antibiotiki so sintetično pridobljeni iz sulfanilne kisline. Kemijska struktura je iz sulfonamida in samostojnega pet- ali šest - členskega heterocikličnega obroča. Imajo širok spekter delovanja zoper večino gram-pozitivnih in številnih gram-negativnih mikroorganizmov. Razmnoževanje bakterij zavirajo tako, da delujejo kot inhibitorji p-aminobenzojske kisline, prekursorja folne kisline, ki pa je ena glavnih sestavin pri sintezi nukleinskih kislin. Pogosto se uporabljajo v živilstvu, in predstavljajo velik delež celotne porabe antibiotikov pri zdravljenju živali. Tako so bili ostanki sulfamidov odkriti v številnih vodnih okoljih, rekah, jezerih, podzemnih vodah. Širjenje ostankov teh antibiotikov v vodnih okoljih je ustvarilo veliko zaskrbljenost zaradi možnih tveganj, kot so povečanje mikrobne odpornosti po dolgotrajni izpostavljenosti mikroorganizmov (Yang in sod., 2015).

2.2.1 Odpornost bakterij *E. coli* na antibiotike

Na antibiotike odporne bakterije so bile odkrite že v letih 1980 in kasneje 1990 v pitni vodi. Pri odpornih bakterijah, odkritih v pitni vodi, so prišli do zaključkov, da je obdelava surove vode in njena poznejša distribucija selekcionirala proti antibiotikom odporne bakterije (Krümmerer, 2009b).

Odpornost mikroorganizmov proti antibiotikom predstavlja resno grožnjo javnemu zdravju v Evropi, saj se s tem podaljšuje bolnišnično zdravljenje, povečujejo se stroški za zdravstvo, odpornost vodi k neuspelemu zdravljenju in je občasno tudi vzrok smrti. V EU in državah Evropskega gospodarskega prostora (EGP) se je v zadnjih letih odpornost proti antibiotikom pri *E. coli* opazno povečala. Zato sta preudarna raba antibiotikov in celovita strategija nadzora okužb v zdravstvenih ustanovah temelja učinkovitih ukrepov za preprečevanje pojavnosti in prenosa proti antibiotikom odpornih bakterij (ECDC, 2013).

Delež izolatov *E. coli*, odpornih na najbolj pogosto uporabljene antibiotike, se v Evropi povečuje. Po poročanjih EARS-Neta je bilo v letu 2012 proti vsaj enemu od spremljanih antibiotikov odpornih večina izolatov. Zaskrbljujoče je povečanje odpornosti proti cefalosporinom tretje generacije in večkratna odpornost proti fluorokinolonom in aminoglikozidom. Več držav EU beleži trend povečanja teh vrst odpornosti med leti 2009 in 2012. Odpornost proti karbapenemom pri *E. coli* ostaja v Evropi nizka (ECDC, 2013).

Letno poročilo agencije EFSA in ECDC iz leta 2013 je pokazalo, da imajo indikatorski oz. komenzalni sevi *E. coli*, ki so jih izolirali iz piščančjega mesa, svinjine in govedine, visok

odstotek odpornosti na antibiotike, predvsem na ampicilin, sulfonamide in tetracikline. Rezistenca na gentamicin je bila nižja od 5 %, nižja od 10 % je bila rezistenca na cefotaksim in nižja od 13 % na kloramfenikol. Izolati iz mesa brojlerjev so imeli praviloma višji odstotek odpornih sevov na antibiotike, kot sevi iz vzorcev mesa prašičev in goveda. Med leti 2007 in 2013 poročajo o povečanem trendu odpornosti pri izolatih *E. coli* iz mesa brojlerjev, najvišji odstotki rezistenc so bili na ampicilin, ciprofloksacin in nalidiksinsko kislino. Pri vzorcih mesa ostalih živali je bila najvišja odpornost na tetracikline in streptomycin. V poročilu so podani izsledki raziskav o odpornosti *E. coli* iz vzorcev mesa. Odpornost za ciprofloksacin, ki je pomemben antibiotik v humani medicini, je bila precej višja pri vzorcih mesa brojlerjev, kot vzorcih drugih mesnih živil. Podobno je bilo pri pojavu odpornosti na nalidiksinsko kislino. Podatke o odpornosti je posredovala tudi Slovenija. Skupno gledano je delež odpornosti na antibiotike višji pri izolatih iz brojlerjev kot pri svinjini. Glede antibiotikov pa se je odpornost najpogosteje pojavljala na ampicilin, najmanj izolatov je odpornost izkazovalo na gentamicin in kloramfenikol (EFSA, 2015).

Raziskavo na področju odpornosti izolatov *E. coli* so izvedli tudi v ZDA (1950 – 2002). Skupno so analizirali 1729 sevov, od tega 746 živalskih (govedo, prašiči, perutnina). Pri živalskih izolatih so opazili povečano odpornost na enajst od petnajstih testiranih antibiotikov, vključno z ampicilinom, sulfonamidi in gentamicinom, podobno kot v Evropi. Na splošno so opazili najpogostejšo odpornost na starejša zdravila, kot so tetraciklini, sulfonamidi in ampicilin. Manj sevov je bilo odpornih na zdravila, uvedena v klinično uporabo po letu 1980, in sicer na ciprofloksacin in nekatere druge. Večkratna odpornost *E. coli* se je iz 7,2 % leta 1950 povečala na 63,3 % leta 2000 (Tadesse in sod., 2012).

Tudi surova zelenjava lahko gosti veliko različnih patogenih mikroorganizmov, vključno s patogenimi sevi *E. coli*. Številni izbruhi okužb z EHEC ali STEC v Evropi, Severni Ameriki in na Japonskem so bili posledica uživanja kontaminirane zelenjave iz svežega sadnega soka. Zadnji velik izbruh z EHEC, je bil povezan s kalčki leta 2011 v Nemčiji in je povzročil visoko incidenco HUS-a (Skočkova in sod., 2013; EFSA, 2015). Sadje in zelenjava sta bistveni sestavini zdrave prehrane. Sveža zelenjava se po vsem svetu proizvaja in prodaja vse leto. V zadnjem času je tako sveža zelenjava postala potencialna grožnja okužb s hrano in vzrok potrjenih velikih in resnih mednarodnih izbruhov, ki so bili povezani s semenskim materialom ohrovt, kontaminiranih z *Escherichia coli* O104: H4 v Evropi in *E. coli* O157 v paradižniku in špinaci v Ameriki. Tako se povečuje problem varne hrane, saj je lahko kontaminirana z povzročitelji bolezni ali komenzalnimi sevi, ki so rezervoar genov za rezistentnost, s tem pa tudi prenos bakterij odpornih na antibiotike na ljudi. Čeprav so proizvodi živalskega izvora glavni prenašalci bakterij odpornih na antibiotike in njihovih genov za odpornost, postaja velik problem tudi ravnanje in obdelava svežih živil rastlinskega izvora. Na Portugalskem je bila tako po poročanju Campos in sod. (2013) najvišja odpornost *E. coli* izolirane iz vzorcev zelenjave iz supermarketov na tetracikline in streptomycin, najnižja pa na kloramfenikol.

Povprečna odpornost na aminoglikozide iz tridesetih držav EU je bila leta 2012 izračunana na 10,3 %. Za polovico držav so poročali o povečevanju trenda odpornosti, in sicer iz 8,6 % leta 2009 na 10,3 % leta 2012. V treh državah EU (Nemčija, Litva, Malta) so opazili upadajoč trend odpornosti na aminoglikozide. Podoben trend povečanja odpornosti so zabeležili pri kinolonih. V tridesetih državah EU je bila povprečna odpornost na kinolone 22,3 %. Najmanjša zaznana odpornost je bila na Islandiji, najvišja (42,0 %) pa na Cipru in v Italiji (ECDC, 2012).

2.2.2 VTEC in odpornost sevov VTEC na antibiotike

Sevi *Escherichia coli*, ki proizvajajo Shiga toksin (STEC) ali verotoksin (VTEC) so raznolika skupina črevesnih povzročiteljev bolezni in so bili opredeljeni kot eden od glavnih povzročiteljev bolezni, ki se prenašajo s hrano. Lahko povzročijo drisko, pa tudi hude bolezni prebavil pri ljudeh kot sta hemoragični kolitis in hemolitični uremični sindrom (HUS), prav tako akutno odpoved ledvic, sindrom razdražljivega črevesja ali smrt (Franz in sod., 2014).

Jasno je, da je varnost hrane ključnega pomena pri oblikovanju predpisov za povečanje varnosti nacionalnih kmetijsko-živilskih sektorjev. Posamezne države so sprejele posebne predpise za soočanje s pojavom VTEC in tveganja za kontaminacijo hrane (Franz in sod., 2014).

VTEC pripadajo številnih seroskupinam, ki so povezane s težkimi oblikami bolezni, to so O157, O26, O111, O103 in O145 (ISO / TS 13136:2012). Shiga toksin in Shiga podobni toksini spadajo v skupino proteinskih toksinov, ki imajo del, ki se veže na celično površino in po vstopu v citosol zavira sintezo proteina. Prežvekovalci naj bi bili glavni posredniki VTEC sevov, ker so sevi naravni prebivalci njihove črevesne mikroflore, z iztrebki kontaminirajo okolje in posledično prenašajo te bakterije na hrano in v vodo. Živali ne kažejo nobenih kliničnih znakov okužbe, pride pa do kontaminacij surovega mleka in mesa, ki pa lahko kasneje povzročajo bolezni pri človeku, ki uživa takšno hrano (Al-Zogibi in sod., 2015).

Glavni virulenčni dejavniki VTEC so proizvodnja toksina imenovanega Shiga toksin (*Stx1*, *Stx2*) oziroma verotoksin (*vt1* in *vt2*) in geni za proizvodnjo intimina (*eae*) (Al-Zogibi in sod., 2015). V večini držav (ZDA, Kanada, Velika Britanija, Japonska) je VTEC, serotip O157 povezan s povzročitvijo bolezni. Za razliko od drugih serotipov *E. coli*, VTEC O157: H7 ne fermentira sorbitola in je β -glukuronidaza negativna. Zaradi teh lastnosti je identifikacija na selektivnih medijih, kot je sorbitol MacConkey (SMAC), enostavna. *E. coli* O157: H7 je bila leta 1982 priznana kot pomemben vzrok za bolezni, poleg prenosa s hrano je mogoč tudi prenos s človeka na človeka (Gyles, 2007). Prav zaradi možnosti povzročitve epidemije ostaja globalni zdravstveni problem. Opozoriti je potrebno, da se pri

zdravljenju okužb z verotoksigenimi sevi protimikrobno zdravljenje ne priporoča (Vukelić, 2012).

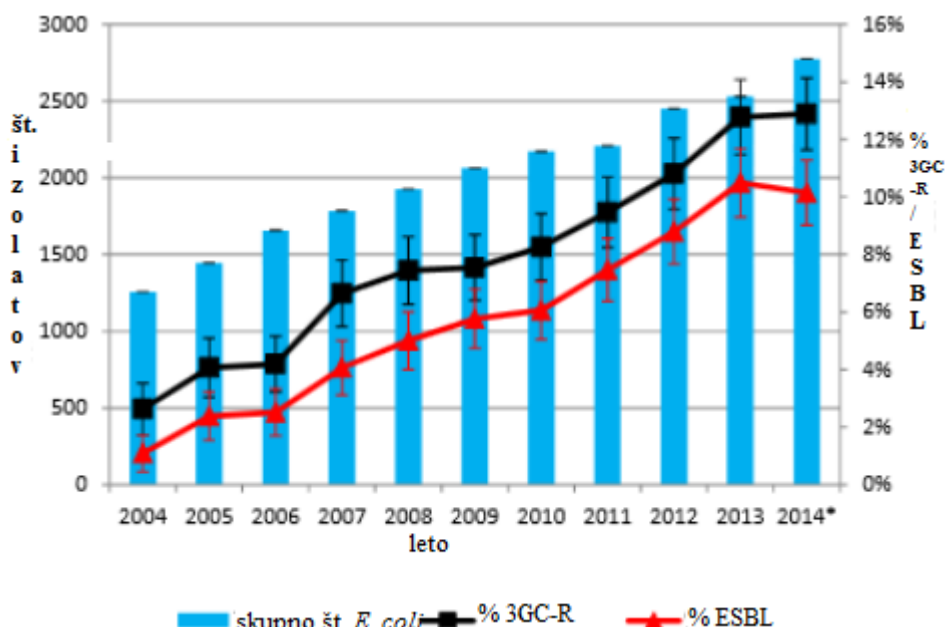
Trenutne študije kažejo, da so serotipi VTEC hkrati odporni na več antimikrobnih razredov, vključno s penicilini, aminoglikozidi, tetraciklini, sulfonamidi in fluorokinoloni. Večkratno odpornost proti antibiotikom lahko pridobijo preko mobilnih genskih elementov, kot so plazmidi in transpozoni (Scott, 2009). Maja leta 2011 so v Nemčiji razglasili epidemijo HUS-a, ki jo je povzročil serotip O104: H4. Skupino bolnikov so zdravili z azitromicinom, pri bolnikih z dolgotrajno okužbo je bilo izvedeno naknadno zdravljenje z azitromicinom, ki je pripeljalo do trajne dekolonizacije brez znakov bolezni (Robert Koch Institute, 2011).

2.2.3 ESBL in odpornost sevov ESBL na antibiotike

Beta-laktamaze razširjenega spektra oz. s kratico ESBL izločajo Gram negativne bakterije, ki jih najdemo v črevesju, in sicer *E. coli* in *Klebsiella pneumoniae*. ESBL so encimi, ki inaktivirajo β -laktamske antibiotike s tem, ko cepijo amidne vezi v beta-laktamskem obroču. Sevi so odporni na večino pogosto uporabljenih beta-laktamskih antibiotikov, med njimi tudi tretje generacije cefalosporinov. Pogosto izražajo te bakterije tudi odpornost proti aminoglikozidom in kinolonom. Zanesljivo učinkoviti antibiotiki naj bi bili karbapenemi. Večina do sedaj izoliranih ESBL sevov je bila iz kliničnih vzorcev. Šele pred kratkim so pozornost namenili tudi ne-človeškemu virom, kot možnim izvorom okužb. Po ugotovitvah študij so bili ti mikroorganizmi pogosto prisotni v vzorcih goveda, kot tudi v vzorcih divjih živali, kot so ptice in glodalci. V preteklih letih so poročali tudi že o prenosih ESBL iz živil živalskega porekla na ljudi, vendar je o prenosu okužbe še malo znanega (Wieler in sod., 2011).

Na osnovi njihovih aminokislinskih sekvenc so ESBL razvrščeni v štiri razrede, od A do D. V razredu A in B so sevi, ki niso odporni na cefotaksime in ceftazidim. V razred A se razvrščajo ESBL tipa TEM beta - laktamaze. Do 90 % odpornosti *E. coli* na ampicilin je zabeleženo zaradi proizvodnje encima TEM-1. Poleg odpornosti na ampicilin so odgovorni tudi za odpornost na penicilin. Razred B so encimi SHV beta - laktamaze in jih najpogosteje najdemo v *K. pneumoniae*. V začetku 80 let so bili cefotaksimi uvedeni za zdravljenje okužb z ESBL. Njihova ponavljajoča in povečana uporaba je povzročila nastanek odpornih sevov, ki jih uvrščamo v skupino C. Encimi so CTX-M beta - laktamaze in imajo veliko aktivnost proti cefalosporinom. Beta - laktamaze tipa OXA hidrolizirajo oksacilinom in jih uvrščamo v razred D. Encime pa najdemo v *P. aeruginosa* (Bonnet, 2004). V zadnjih desetletjih resno grožnjo za okužbe povzročajo predvsem ESBL tipa CTX-M, tako v bolnišnicah, kot v skupnosti (Lepeule in sod., 2014).

Iz poročila EARS-Neta iz leta 2014 lahko razberemo, da je bilo 12,9 % izolatov *E. coli* rezistentnih na tretjo generacijo cefalosporinov in med njimi se je pokazalo, da je večina teh izolatov ESBL pozitivnih (EARS-Net/HPSC, 2014).



Slika 4: Trend naraščanja ESBL pozitivnih *E.coli* – skupno število izolatov *E.coli* in odstotek rezistentnih izolatov na 3GC in ESBL pozitivnih izolatov (EARS-Net/HPSC, 2014)

Bakterije z beta – laktamazami razširjenega spektra so eden najhitreje razvijajočih se sistemov odpornosti po svetu. Na Danskem nedavno ugotavljajo (Borck Høg in sod., 2014), da so iz prašičev ob zakolu izolirali 6 % *E. coli*, ki so bile potrjene kot ESBL, kar je sicer manj kot v letih med 2009 in 2012. Med vzorci mesa so najvišjo prevalenco ESBL *E. coli* ugotovili med uvoženimi vzorci).

V študiji, ki je bila narejena v Sloveniji leta 2011, ko se je v Sloveniji opravljalo preliminarno testiranje glede prisotnosti večkratno odpornih bakterij v mesu, so v preiskavo vključili več vzorcev perutninskega in prašičjega mesa. V preiskavo je bilo vključenih 80 vzorcev perutninskega mesa, kjer je bila *E. coli* tipa ESBL izolirana iz več kot 70 % vzorcev, medtem ko v 60 pregledanih vzorcih prašičjega mesa ni bilo izoliranih *E. coli* z beta – laktamazami razširjenega spektra (Zdovc, 2012).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci živil in vode za izolacijo sevov *E. coli*

V skladu z letnim monitoringom smo v Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) preiskovali različne vzorce, in sicer pitne vode in živil živalskega in rastlinskega izvora. Vzorce smo preiskovali med poletjem 2014, nekaj sevov pa smo pridobili iz zbirke Biotehniške fakultete in iz arhiva NLZOH v Kranju, nekaj sevov pa tudi iz zbirke v Mariboru, in sicer iz leta 2008 in 2013. V nadaljnje delo so bili vključeni tudi štirje sevi *E. coli*, ki so bili izolirani iz živil živalskega porekla, in sicer iz nelegalno uvoženih živil v Slovenijo na mejnih prehodih (letališče Brnik in mejni prehod Obrežje). Vzorci živil so bili izolirani v okviru mednarodnega FP7 projekta PROMISE, v katerega je bila vključena Biotehniška fakulteta v letih 2012 – 2014. Vsi štirje vzorci so bili shranjeni kot sevi VTEC, v okviru te naloge je bila njihova identifikacija ponovno potrjena. Sama sem prispevala vzorce mesa in različnih rastlinskih virov, ostale vzorce smo pridobili tekom letnega monitoringa.

Vsi izolirani sevi so bili trajno shranjeni v krioepruvetkah pri temperaturi -80 °C.

3.1.2 Mikrobiološka gojišča za izolacijo in identifikacijo bakterij *E. coli*

Pri delu smo uporabljali komercialno pripravljena gojišča.

- **TSB agar** je hranljivi agar, ki smo ga uporabili za kvalitativno obogatitev *E. coli*.

Preglednica 1: Sestava gojišča TSB (formula za liter destilirane vode) (BD and Company, 2008)

SESTAVINE	KOLIČINA
Bacto tripton (kazein trebušne slinavke)	17,0 g
Bacto soja (peptin iz sojine moke)	3,0 g
Glukoza	2,5 g
Natrijev klorid	5,0 g
Dikalijev hidrogenfosfat	2,5 g

- **TBX agar** – uporabili smo ga za izolacijo in identifikacijo *E. coli* v hrani in vodi. Gojišče je izboljšano z dodatkom kromogenega sredstva, vsebuje dušik, vitamine in aminokisline, deluje selektivno na Gram pozitivne bakterije. Kolonije *E. coli* se po inkubaciji obarvajo značilno modro (NEOGEN, 2009).

Preglednica 2: Sestava gojišča TBX – za 1 liter gojišča (NEOGEN, 2009)

SESTAVINE	KOLIČINA
Tripton	20 g
Žolčna sol	1,5 g
x-glukoronid	0,075 g
Agar	15 g

- **TTC agar** z bromtimol zelenim je selektivno gojišče za rast *E. coli* in drugih koliformnih bakterij. Pepton in goveji ekstrakt zagotavljajo vir dušika, vitaminov, mineralov za rast koliformnih bakterij. Ekstrakt kvasa je vir vitaminov B-skupine. Mikroorganizmi zaradi fermentacije laktoze zrastejo značilno rumeno. Bromtimol zeleno je indikator pH (BIOCORP, 2009).
- **Krvni agar**
Je diferencialno gojišče. Sodi med obogatitvena gojišča, ki vsebujejo snovi za pospešitev rasti zahtevnejših bakterij. Gojišče krvni agar vsebuje ogljikove hidrate in citrirano govejo ali ovčjo kri. Na tem gojišču lahko opazujemo različne tipe hemolize (α , β , γ) (Kotnik, 2011).
- **ChromID[®] ESBL**
Je selektivno gojišče, ki temelji na agarju s patentirano mešanico antibiotikov ki omogočajo rast ESBL-pozitivnih enterobakterij (BioMerieux, 2015).

3.1.3 Reagenti in materiali za izvedbo PCR

Za pomnoževanje in detekcijo produktov se uporablja aparat LightCycler 2.0. Potrebujemo še nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov in sond za detekcijo gena *eae* in interne kontrole, ter nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov in sond za detekcijo verotoksina 1 in 2 s PCR v realnem času. Reagenti so v skladu z ISO 20838. Reakcijska mešanica za PCR pomnoževanje, ki jo uporabljajo na NLZOH je LightCycler[®] Taqman[®] Master proizvajalca Roche in reagenčni komplet TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents proizvajalca Applied Biosystems. Pri vsaki izvedbi q-PCR pa potrebujemo še pozitivno kontrolo pomnoževanja, negativno kontrolo pomnoževanja, negativno kontrolo izolacije, kontrolo kontaminacije okolja, pozitivno kontrolo izolacije in kontrolo inhibicije. Kriteriji izvedbe morajo biti v skladu z ISO/TS 13136:2012.

3.1.4 Material za testiranje odpornosti na antibiotike

Uporabljali smo Sensititre[®] plošče z štirinajstimi antibiotiki v različnih koncentracijah.

Potrebujemo še:

- demineralizirano destilirano vodo,
- sterilne vatrane palčke,
- 0,5 McFarlanda za pripravo bakterijske suspenzije (0,5 McFarlanda pripravimo z mešanjem 0,05 ml 1,175 % barijevega klorida dihidrata ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), z 9,95 ml 1 % žveplove kisline (H_2SO_4)),
- denzimeter,
- 11 ml Mueller-Hinton (MH) bujona,
- 10 μl in 50 μl avtomatsko pipeto z pripadajočimi nastavki,
- vorteks,
- inkubator z 37 °C, brez CO_2 ,
- lepilni trak, s katerim prelepimo ploščo po nacepitvi,
- digestorij.

3.1.5 Ostala laboratorijska oprema

- Splošni mikrobiološki material: petrijeve plošče, plastične cepilne zanke, stojalo za epruvete, avtomatska pipeta z nastavki, epice, vrečke za avtoklaviranje,
- plinski gorilnik,
- zamrzovalnik,
- hladilnik,
- inkubator nastavljen na 37 °C $\pm$ 1 °C,
- vodna kopel,
- mikrovalovna pečica,
- krioepruvetke,
- centrifugirka,
- aparat za elektroforezo,
- UV transiluminator.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava vzorcev, izolacija in identifikacija *E. coli*

Vse vzorce smo pripravili tako, da smo naredili začetno suspenzijo ali osnovno razredčitev. Pri živilih 25 gramov vzorca prelijemo z 225 ml predobogatitvenega gojišča TSB in homogeniziramo. Pri vzorcih mesa smo le-te ustrezno razredčili, ker smo pričakovali višje koncentracije *E. coli* v vzorcih. Nadaljnje razredčitve dobimo s Kochovo vrsto s TSB. Naredili smo razredčitve 1:10, 1:100 in 1:1000. Pri vzorcih vode 100 ml vode prefiltriramo z metodo membranske filtracije in filter prenesemo v 100 ml TSB gojišča (ISO 6887-1:1999).

Tako pripravljene vzorce smo inkubirali 24 h na 37 °C. 10 mL vzorca smo prenesli v centrifugirke, 1 mL pa odpipetirali v petrijevko in vzorce prelili z gojiščem TBX. Gojišče je specifično za rast *E. coli*, zavira pa rast drugih bakterij. Vzorce inkubiramo 18-24h na 37 °C. *E. coli* se na selektivnem gojišču TBX obarvajo značilno modro. Po inkubaciji smo morfološko določili domnevno rast *E. coli*, in sicer kot drobne modre kolonije. Če je bila vidna rast, smo nadalje naredili potrditvene teste. Po eno značilno kolonijo smo z ezo precepili na TTC agar z bromtimol zelenim, kjer po inkubaciji na 37 °C za 24h zrastejo za *E. coli* značilne rumene kolonije s hrapavo površino. Gojišče TTC je selektivno za koliformne bakterije, med katere spada tudi *E. coli*. Za potrditev smo naredili še indolni test. Sočasno cepimo bakterijsko kulturo tudi v epruvetko s testom za tvorbo laktoze.

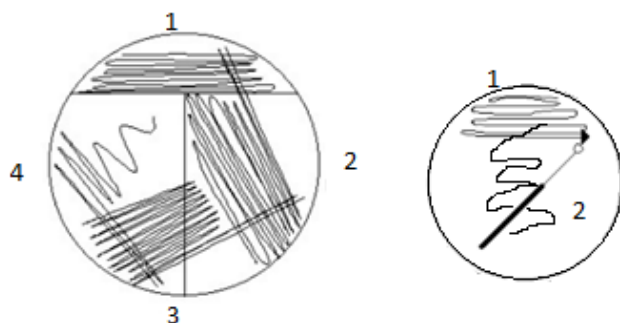
- Indolni test

Pri ugotavljanju, ali preiskovani sev tvori indol, smo bakterijsko kulturo cepili v peptonsko vodo, ki vsebuje triptofan (aminokislina z indolovim obročem). Po 24 h inkubaciji v vodni kopeli pri 37 °C lahko dokažemo sproščeni indol z dodatkom Erlichovega reagenta. Triptofan se s pomočjo triptofanaz, ki jih tvori *E. coli* in vode, hidrolitsko cepi in nastane indol. Indol reagira z aldehidno skupino p-metilaminobenzaldehida, ki je sestavina Erlichovega reagenta in nastane rdeče obarvan kompleks.

- Test fermentacije laktoze

Uporabili smo tekoče gojišče, ki vsebuje pepton in laktozo, indikator je brom timol modro. Po 24 urni inkubaciji pri 37 °C opazujemo tvorbo kisline v epruveti. Laktoza fermentira do kisline, rezultat je rumena barva v epruveti. *E. coli* so laktoza pozitivne, tako se barva gojišča ob razgradnji laktoze spremeni iz vijolične v rumeno. Pozitivna reakcija pri tvorbi indola je obarvanje na rdeče-vijolično in tvorba indolnega obročja. Tako potrdimo prisotnost *E. coli* v vzorcu.

Ko potrdimo prisotnost *E. coli*, posamezne kolonije iz TTC ali TBX agarja z ezo precepimo na krvni agar, inkubiramo in nato lahko tako pripravljene seve bakterij zamrznemo v krioepurvetkah za nadaljnje delo.



Slika 5: Princip cepljenja *E. coli* z ezo na gojišče krvni agar in TBX (levo) in na gojišče TTC (desno)

Pri sumu na prisotnost VTEC po pripravi vzorca in inkubaciji, kot je opisano zgoraj, odpipetiramo 1 ml predobogatitvenega gojišča v mikroepruветko in centrifugiramo 10 minut na 10.000 obr./min. Po centrifugiranju supernatant zavržemo, usedlino pa uporabimo za izolacijo DNK (Cimerman in Lušicky, 2013).

3.2.2 Izolacija DNK in izvedba q-PCR za potrditev sevov VTEC

Izolacijo DNK in izvedbo q – PCR smo naredili na vzorcih hrane, ki so bili po izolaciji in identifikaciji pozitivni na *E. coli*. Šele, ko so se določeni vzorci hrane izkazali za pozitivne na VTEC, smo iz vzorca hrane poskušali izolirati VTEC sev in izvedli izolacijo DNK in potrditev sevov VTEC še na določenih bakterijskih sevih.

Postopek izolacije DNK iz vzorca za izvedbo PCR:

1. 1 ml bakterijske kulture centrifugiramo 10 minut na 10.000 obr./min.
2. Dodamo 20 µl proteinaze K in 180 µl ATL pufra, premešamo in inkubiramo 20 minut na 56 °C.
3. Dodamo 200 µl pufra AL Buffer, premešamo in inkubiramo 10 minut na 70 °C.
4. Dodamo 200 µl etanola, na kolono prenesemo 2 ml filtrata. Centrifugiramo na 6000 obr./min 1 minuto. Filtrat zavržemo.
5. Kolono prenesemo v novo zbiralno epruветko, dodamo 500 µl pufra Buffer AW1, centrifugiramo na 6000 obr/min 1 minuto. Filtrat skupaj z zbiralno epruветko zavržemo.
6. Kolono ponovno vstavimo v novo zbiralno epruветko, dodamo še 500 µl pufra Buffer AW2 in centrifugiramo 3 minute na 14.000 obr./min.
7. Kolono vstavimo v 1,5 ml mikroepruветko, na kolono odpipetiramo 200 µl elucijskega pufra AE, inkubiramo 5 minut na sobni temperaturi in nato

centrifugiramo na 6000 obr./min 1 minuto. S tem z membrane speremo vezano DNK (ISO/TS 13136:2012).

Vsi zgoraj omenjeni pufri in materiali so priloženi v setu za izolacijo DNK.

V DNK potrjujemo prisotnost specifičnega odseka DNK, ki nosi zapis za intimin ter verotoksin 1 in 2, z reakcijo PCR v realnem času, z uporabo hibridizacijskih sond. Preiskovanje za detekcijo verotoksina 1 in 2 pri *E. coli* se izvaja s pomočjo PCR reakcije, kjer se pomnožuje specifične odseke DNK. Sočasno s pomnoževanjem se v vsakem ciklu izvaja tudi detekcija PCR produktov. Produkti se detektirajo z uporabo sond, ki so označene s fluorescentnimi barvili. Pri detekciji verotoksina 1 in 2 se uporablja reportersko barvilo FAM, ki oddaja svetlobo valovne dolžine 530 nm (za verotoksin 1) in reportersko barvilo JOE, ki oddaja svetlobo valovne dolžine 560 nm (verotoksin 2). OB pomnoževanju specifičnih odsekov DNK sonda hibridizira s homolognim zaporedjem, zatem pa jo Taq-polimeraza ob podaljševanju nukleotidne verige razgradi. Barvili se tako ločeno sprostita v raztopino in aparat zazna sevanje reporterskega barvila. Pozitivna reakcija z začetnimi nukleotidi in sondo, ki specifično pomnožujejo odsek zaporedij potrjuje, da so v preiskovanem vzorcu prisotne *E. coli*, ki nosijo zapis za verotoksin 1 in/ali 2 nad limitom detekcije. Vedno uporabljamo pozitivno kontrolo pri določanju VTEC, ki nosi zapis za gen *eae* ter verotoksin 1 in 2 v koncentraciji 50.000 kopij na PCR reakcijo.

3.2.3 Izolacija in identifikacija sevov ESBL

Najprej naredimo testni vzorec, tako da v sterilno vrečko odmerimo zahtevano količino in dodamo puferizirano vodo z dodatkom cefotaksima in s stresanjem dobro homogeniziramo. Vzorec inkubiramo na 37 °C za 18 – 24 ur. Po inkubaciji v puferizirani vodi z dodatkom cefotaksima prenesemo kulturo s sterilno cepilno zanko na dve petrijevki s selektivnim gojiščem chromID® ESBL tako, da dobimo posamezne kolonije. Po nacepivti sledi inkubacija plošč na 37 °C za 18 – 24 ur.

Sledi identifikacija sevov. Tipične kolonije za *E. coli*, zrasle po inkubaciji, so roza do rdeče obarvane β – glukuronidaza – pozitivne kolonije.

Za potrditev sevov ESBL pripravimo suspenzijo kulture 0,5 po McFarlandu za fenotipsko identifikacijo z disk difuzijsko metodo. Na štiri plošče Mueller Hinton gojišča enakomerno nanesemo suspenzijo in nanj položimo diske. ESBL seve potrdimo s testom kombinacije diskov, kot so podani na sliki 6. Premer inhibicijske cone cefalosporinskih diskov v kombinaciji s klavulansko kislino mora biti večji od 5 mm od premera cone cefalosporinskih diskov brez klavulanske kisline (Cimerman in Lušicky, 2013).

ESBL	Cefotaksim	CTX30
	Cefotaksim+klavulanska	CTX+C
	Ceftazidim	CAZ30
	Ceftazidim+klavulanska	CAZ+C
	Cefotaksim+kloksacilin	CTXCX
	Cefotaksim+kloksacilin+klavulanska	CTXCC

Slika 6: Kombinacije diskov za potrditev sevov ESBL

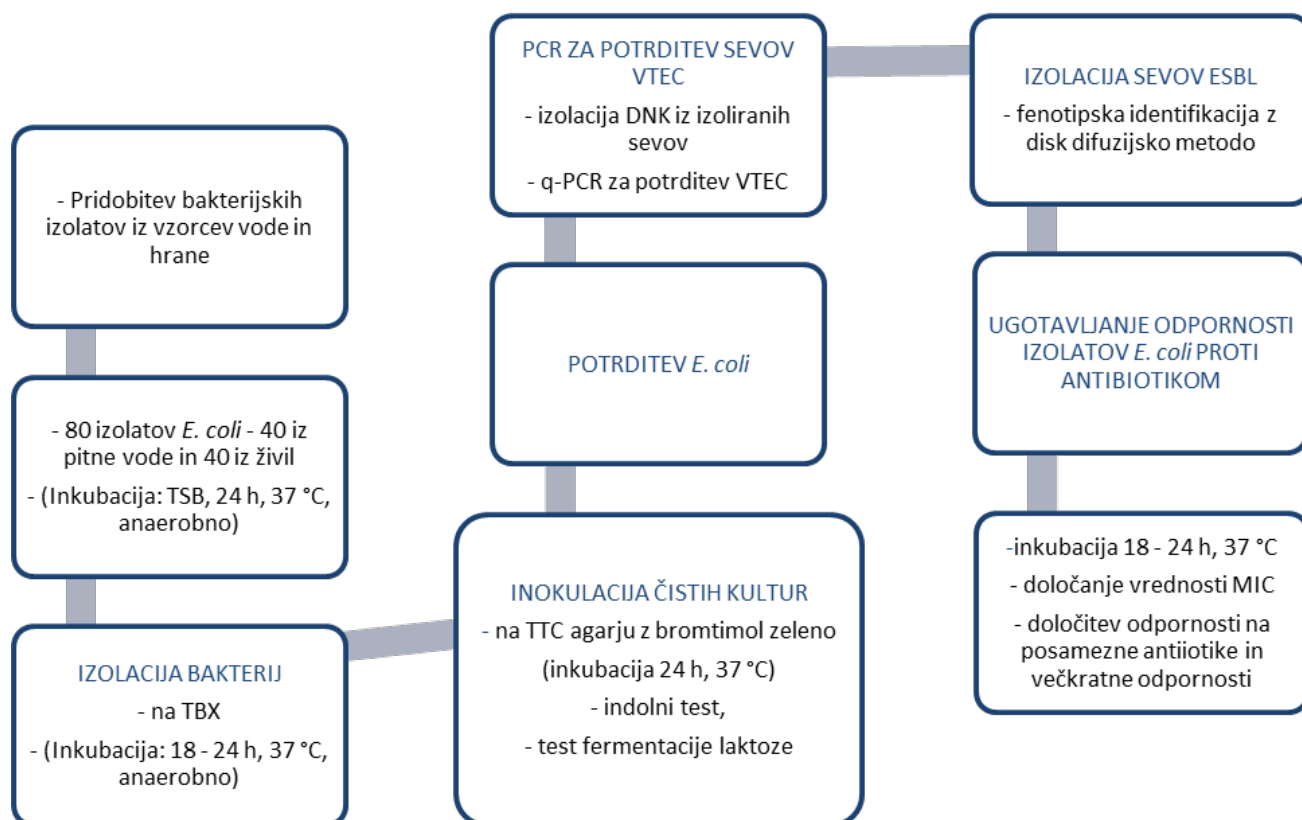
3.2.4 Testiranje odpornosti proti antibiotikom

Odpornost proti antibiotikom 80 sevov *E. coli* iz različnih virov smo določili za 14 protimikrobnih spojin z uporabo komercialnih plošč Sensititre® (TREK Diagnostic Systems). Določanje občutljivosti na antibiotike na Sensititre® ploščah je hitrejša metoda kot klasična dilucijska metoda in zagotavlja kvalitativne in kvantitativne rezultate za minimalne inhibitorne koncentracije in mejne vrednosti. Na vsaki plošči so dozirana protimikrobna sredstva ustreznih razredčitev. Po inkubaciji se lahko rezultati preberejo vizualno. Vsaka ploščica ima vdolbinici s pozitivno kontrolo, v katerih ni antibiotika in se uporabljata za preverjanje pravilnega rezultata. Plošče je treba hraniti na sobni temperaturi, stran od neposredne svetlobe in toplote. Vsaka plošča je pakirana samostojno v foliji.

Protimikrobna sredstva oziroma antibiotiki, na katere smo preverjali odpornost so bili naslednji: Sulfatetoksazol (SMX), trimetoprim (TMP), ciprofloksacin (CIP), tetraciklin (TET), meropenem (MERO), azitromicin (AZI), nalidiksinska kislina (NAL), cefotaksim (FOT), kloramfenikol (CHL), tigeciklin (TGC), ceftazidim (TAZ), kolistin (COL), ampicilin (AMP) in gentamicin (GEN). Večkratna odpornost (MDR) je definirana kot odpornost na tri ali več antimikrobnih razredov.

Ko smo zbrali zadostno število sevov *E. coli*, smo za nadaljnje delo revitalizirali seve na krvnem agarju. Iz posamezne krioepruvetke smo s cepilno zanko na gojišče krvni agar aseptično prenesli eno kroglico s bakterijsko kulturo in gojišče inkubirali 24 h na 37 °C. Postopek priprave inokuluma za cepitev na ploščo je potekal tako, da smo s sterilno palčko prenesli iz krvnega agarja v epruvete z raztopino MCFarlanda 1-2 koloniji *E. coli*, oziroma toliko, da smo imeli pripravljeno suspenzijo z gostoto inokuluma 0,5 MCFarlanda, kar je enako $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Koncentracijo mikrobnih celic smo izmerili z denzimetrom. S pipeto smo prenesli 10 µl suspenzije v 11 ml MH bujona, tako smo dobili inokulum z koncentracijo *E. coli* 1×10^5 cfu/ml. Suspenzijo vorteksiramo 8-10 krat. Iz pripravljenega inokuluma smo s pipeto v vsako vdolbinico na mikrotiterski ploščici prenesli 50 µl suspenzije. Plošče smo pokrili s sterilnim trakom, ki je priložen v kompletu. Tako zagotovimo, da ne pride do kontaminacije. Inkubirali smo pri 34-36 °C 18-24 h brez CO₂.

3.3 SHEMATSKI PRIKAZ EKSPERIMENTALNEGA DELA



Slika 8: Shema poteka eksperimentalnega dela

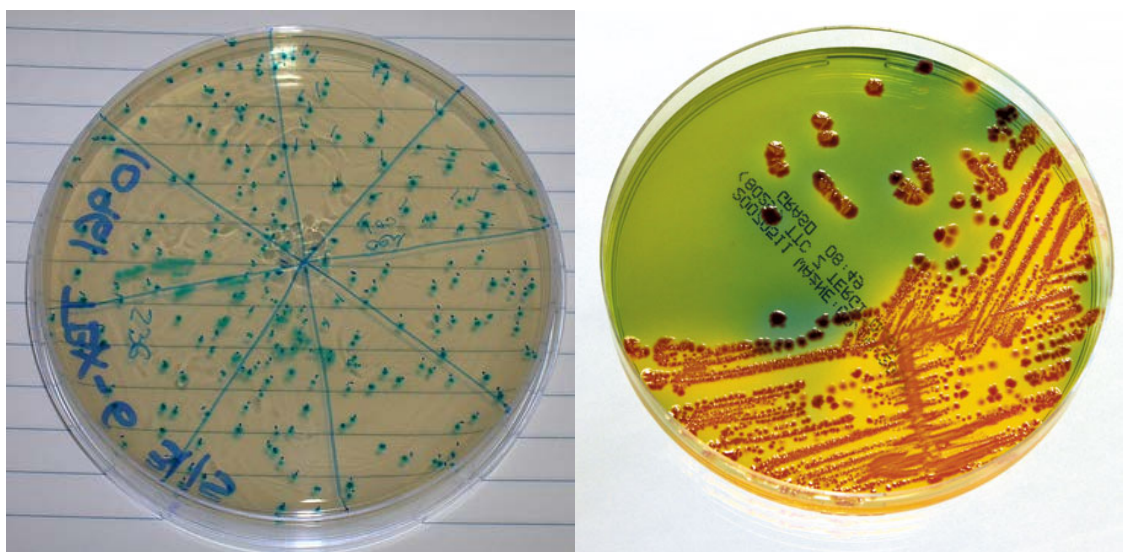
4 REZULTATI

Glavnina eksperimentalnega dela je potekala v mikrobiološkem laboratoriju Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano v Mariboru med aprilom in decembrom 2014. Nekateri sevi so bili predhodno pridobljeni iz vzorcev živil in shranjeni v zbirkah laboratorija NLZOH Kranj in v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Pridobili smo še štiri seve VTEC iz mednarodnega projekta PROMISE, ki so bili živalskega izvora. Vse vzorce, kontaminirane z *E. coli* smo preverili na odpornost proti antibiotikom in določili, ali so sevi *E. coli* v vzorcih odporni na en antibiotik ali so večkrat odporni.

4.1 IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA *E. coli* IZ VZORCEV ŽIVIL IN VODE

Po inkubaciji gojišča na 37 °C smo opravili potrditvene teste za kolonije, ki so značilne za rast *E. coli* na določenem gojišču.



Slika 9: Bakterija *E. coli* po inkubaciji na gojišču TBX (levo) in TTC (desno)

Za testiranje odpornosti proti antibiotikom smo tekom eksperimentalnega dela pridobili skupno 80 sevov: 40 sevov *E. coli* iz pitne vode, 18 sevov je bilo nemesnega izvora (1 sev iz ajdove moke, 1 sev iz slaščice, 2 seva iz gobove juhe in 14 sevov iz različne zelenjave in začimb), 22 sevov smo izolirali iz mesa. 40 sevov *E. coli* iz vzorcev pitne vode in 25 sevov iz različnih živil je bilo dobljenih na NLZOH, ostale seve (15) pa smo pridobili iz arhivov enote NLZOH iz Kranja in Laboratorija za živilsko mikrobiologijo Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete v Ljubljani. Vzorci pitne vode in vzorci živil, iz katerih smo izolirali seve *E. coli* za nadaljnje delo so predstavljeni v preglednici 3.

Preglednica 3: Podatki o sevih *E. coli*, pridobljenih in testiranih v nalogi

zap.št. vzorca	št. zamrznjenega vzorca	lab.št.	tip	podrobno	dodatno
1	84		voda	pitna voda	
2	86		voda	pitna voda	
3	87		voda	pitna voda	
4	88		voda	pitna voda	
5	89		voda	pitna voda	
6	90		voda	pitna voda	
7	91		voda	pitna voda	
8	92		voda	pitna voda	
9	93		voda	pitna voda	
10	94		voda	pitna voda	
11	95		voda	pitna voda	
12	96		voda	pitna voda	
13	97		voda	pitna voda	
14	98		voda	pitna voda	
15	99		voda	pitna voda	
16	100		voda	pitna voda	
17	101		voda	pitna voda	
18	102		voda	pitna voda	
19	103		voda	pitna voda	
20	104		voda	pitna voda	
21	105		voda	pitna voda	
22	106		voda	pitna voda	
23	107		voda	pitna voda	
24	108		voda	pitna voda	
25	109		voda	pitna voda	
26	110		voda	pitna voda	
27	111		voda	pitna voda	
28	112		voda	pitna voda	
29	113		voda	Pitna voda	
30	114		voda	pitna voda	
31	115		voda	pitna voda	
32	116		voda	pitna voda	
33	117		voda	pitna voda	
34	118		voda	pitna voda	
35	119		voda	pitna voda	
36	120		voda	pitna voda	
37	121		voda	pitna voda	
38	122		voda	pitna voda	
39	123		voda	pitna voda	
40	124		voda	pitna voda	
41	125	13066/2014	ŽRP	rastlina	
42	126	14155/2014	ŽŽP	meso	
43	127	15176/2014	ŽRP	slasčica	
44	128	18106/2014	ŽRP	rastlina	
45	129	20362/2014	ŽRP	gobova juha	

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 3: Podatki o sevih *E. coli*, pridobljenih in testiranih v nalogi

zap.št. vzorca	št. zamrznjenega vzorca	lab.št.	tip	podrobno	dodatno
46	130	22767/2014	ŽŽP	meso	
47	131	22813/2014	ŽRP	gobova juha	
48	132	22973/3014	ŽŽP	meso(polnjena paprika)	
49	133		ŽŽP	mešano mleto meso	
50	134	21872/2014	ŽRP	rastlina	
51	135	22774/2014	ŽRP	solata	
52	136	3	ŽRP	solata	
53	137	4	ŽRP	ajdova moka	
54	138	2/3	ŽŽP	meso	VTEC
55	139	2/4	ŽŽP	piščančje meso	
56	140	80/33	ŽŽP	fermentirana klobasa	VTEC
57	141	62/4	ŽŽP	sir	VTEC
58	142	81/30	ŽŽP	fermentirana klobasa	VTEC
59	146	24910/2014	ŽŽP	meso	
60	147	KR2901	ŽŽP	meso	
61	148	KR2907	ŽŽP	meso	
62	149	KR2909	ŽŽP	meso	
63	150	KR2911	ŽŽP	meso	
64	151	KR2915	ŽŽP	meso	
65	152	KR2916	ŽŽP	meso	
66	153	KR2922	ŽŽP	meso	
67	154	KR2924	ŽŽP	meso	
68	155	KR2926	ŽŽP	meso	
69	156	KR2927	ŽŽP	meso	
70	157	KR2928	ŽŽP	meso	
71	160	24910/2014	ŽRP	rastlina	
72	161	30857/2014	ŽRP	rastlina	
73	67	25022/2008	ŽRP	rastlina	
74	147	9773/2013	ŽRP	blitva	ESBL
75	151	19065/2013	ŽRP	rukola	ESBL
76	153	19118/2013	ŽRP	peteršilj	VTEC
77	6	6	ŽŽP	goveje mleto meso	
78	23	3526/2008	ŽRP	rastlina	
79	24	4982/2008	ŽRP	rastlina	
80	39	11770/2008	ŽRP	rastlina	

ŽRP – živilo rastlinskega porekla; ŽŽP – živilo živalskega porekla

4.2 POTRDITEV SEVOV VTEC IN ESBL Z METODO q-PCR V VZORCIH ŽIVIL IN OSAMLJENIH SEVIH

Seve *E. coli*, ki smo jih tekom dela izolirali iz vzorcev pitne vode in raznih živil smo testirali na VTEC s q-PCR. Rezultati niso bili obetavni, saj smo v celotnem naboru izolirane DNK iz preiskovanih vzorcev le pri dveh vzorcih potrdili verotoksičnost, a smo kasneje le iz enega vzorca, nacepljenega na krvni agar uspeli osamiti sev, ki je izkazoval

verotoksičnost. Sev, ki nam ga je uspelo izolirati in je bil VTEC pozitiven je bil iz živila rastlinskega porekla. Prav tako smo tekom dela vzorec govejega mletega mesa s metodo PCR potrdili kot verotoksičen, vendar seva iz plošče krvnega agarja nismo mogli izolirati in osamiti za nadaljnjo analizo. Poleg tega smo imeli v nalogi še pet sevov *E. coli*, izmed katerih so bili štirje potrjeni kot VTEC v predhodnih preiskavah v okviru projekta PROMISE. Ti vzorci so bili izolirani tekom študije nelegalno vnesene hrane v EU (Slovenijo, Avstrijo, Nemčijo in Madžarsko) (Nagy in sod., 2015). Pridobljeni so bili med pregledom 103 vzorcev nelegalno vnesene hrane v Slovenijo zasežene na letališču Brnik in mejnemu prehodu Obrežje. Vzorci hrane so bili iz Kosova, Srbije in Makedonije in so bili živalskega porekla (sveže piščančje meso ter doma pripravljene fermentirane klobase in sir).

Rezultate po koncu q-PCR pri kvalitativni preiskavi ovržemo oziroma potrdimo glede na vsebnost specifičnega DNK zaporedja za VTEC. Prisotnost VTEC potrdimo v primeru, ko je hkrati potrjena prisotnost gena *eae* in vsaj en gen verotoksina, torej verotoksina 1 ali 2. Ovržemo pa v primeru, ko ni prisoten niti *eae* niti nobeden verotoksin, hkrati pa smo potrdili uspešnost reakcije z interno kontrolo. Prisotnost VTEC ovržemo tudi v primeru, ko je prisoten samo gen *eae* brez vsaj enega verotoksina ali verotoksin brez gena *eae*.

Tekom eksperimentalnega dela smo potrdili tudi dva seva *E. coli*, ki sta bila identificirana kot ESBL in sta bila izolirana iz vzorcev živila rastlinskega porekla.

Vzorci, iz katerih smo izolirali seve *E. coli*, ki so bili kasneje potrjeni kot VTEC in ESBL so označeni v preglednici 3 v predelku dodatno.

4.3 ANTIBIOTSKA ODPORNOST SEVOV *E. coli* IZ VZORCEV VOD IN ŽIVIL

S mikrotitrskimi ploščicami smo določili minimalno inhibitorno koncentracijo 80 izolatov bakterije *E. coli* na 14 različnih antibiotikov. Vzorcev pitne vode, iz katerih smo izolirali *E. coli*, in smo seve nato testirali na odpornost proti antibiotikom, je bilo 40. Imeli smo 22 vzorcev mesa in 18 vzorcev živil rastlinskega porekla (zelenjava, ajdova moka, gobova juha), iz katerih smo prav tako izolirali *E. coli* in naredili teste na odpornost proti antibiotikom na mikrotitrskih ploščicah.

Odpornost proti vsaj enemu antibiotiku je bila ugotovljena pri skoraj vseh izolatih iz pitne vode in živil. Podrobnejši rezultati so zbrani v preglednici 4.

Kjer so polja v preglednici 4 obarvana temnejše, so bili sevi glede na standarde CLSI (2014) rezistentni na posamezne antibiotike.

Preglednica 4: Odčitane vrednosti MIK ($\mu\text{g/ml}$) testiranih izolatov bakterije *E. coli* iz vzorcev vod in živil rastlinskega in živalskega porekla

MIK (µg/ml)																	
zap.št.	št. vzorca	tip	podrobno	SMX	TMP	CIP	TET	MERO	AZI	NAL	FOT	CHL	TGC	TAZ	COL	AMP	GEN
1	84	voda	pitna voda	>1024	8	0,03	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	4	<1	4	1
2	86	voda	pitna voda	>1024	<0,25	0,03	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	2	2	1
3	87	voda	pitna voda	1024	0,5	0,03	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	0,5	<0,5	<1	2	4
4	88	voda	pitna voda	>1024	<0,25	0,12	>64	0,12	8	<4	<0,25	<8	0,5	<0,5	<1	2	1
5	89	voda	pitna voda	128	2	<0,015	<2	0,06	8	<4	<0,25	<8	0,5	<0,5	2	2	1
6	90	voda	pitna voda	32	0,5	0,25	<2	<0,03	32	<4	>4	64	1	<0,5	<1	2	1
7	91	voda	pitna voda	128	<0,25	<0,015	4	<0,03	8	16	<0,25	<8	0,5	<0,5	<1	4	1
8	92	voda	pitna voda	>1024	2	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	0,5	<0,5	<1	4	1
9	93	voda	pitna voda	>1024	0,5	0,03	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	<0,5
10	94	voda	pitna voda	32	0,5	<0,015	>64	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	1
11	95	voda	pitna voda	16	0,5	0,03	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	2	4	<0,5
12	96	voda	pitna voda	>1024	<0,25	<0,015	>64	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	1
13	97	voda	pitna voda	128	<0,25	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	1
14	98	voda	pitna voda	64	0,5	0,03	<2	<0,03	4	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	1
15	99	voda	pitna voda	128	<0,25	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	1
16	100	voda	pitna voda	32	0,5	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	1	<1	2	<0,5
17	101	voda	pitna voda	>1024	0,5	0,03	64	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	<0,5
18	102	voda	pitna voda	16	<0,25	<0,015	64	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	<0,5
19	103	voda	pitna voda	256	<0,25	0,03	64	<0,03	16	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	<0,5
20	104	voda	pitna voda	128	0,5	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	<0,5

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 4: Odčitane vrednosti MIK ($\mu\text{g/ml}$) testiranih izolatov bakterije *E. coli* iz vzorcev vod in živil rastlinskega in živalskega porekla

zap.št.	št. vzorca	tip	podrobno	SMX	TMP	CIP	TET	MERO	AZI	NAL	FOT	CHL	TGC	TAZ	COL	AMP	GEN
21	105	voda	pitna voda	64	<0,25	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	1
22	106	voda	pitna voda	64	<0,25	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	<0,5
23	107	voda	pitna voda	32	0,5	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	<0,5
24	108	voda	pitna voda	1024	0,5	0,03	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	1
25	109	voda	pitna voda	>1024	<0,25	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	<0,5
26	110	voda	pitna voda	512	<0,25	<0,015	<2	<0,03	4	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	1
27	111	voda	pitna voda	>1024	0,5	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	1
28	112	voda	pitna voda	>1024	0,5	<0,015	<2	<0,03	16	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	<0,5
29	113	voda	pitna voda	64	<0,25	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	<1	1
30	114	voda	pitna voda	64	<0,25	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	<1	1
31	115	voda	pitna voda	1024	<0,25	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	1
32	116	voda	pitna voda	128	0,5	0,03	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	<0,5
33	117	voda	pitna voda	<8	<0,25	0,03	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	1
34	118	voda	pitna voda	>1024	>32	<0,015	<2	<0,03	16	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	>64	1
35	119	voda	pitna voda	<8	<0,25	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	1
36	120	voda	pitna voda	128	0,5	0,03	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	<0,5
37	121	voda	pitna voda	16	<0,25	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	1
38	122	voda	pitna voda	32	<0,25	<0,015	64	<0,03	4	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	<0,5
39	123	voda	pitna voda	16	<0,25	0,03	<2	<0,03	8	8	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	1
40	124	voda	pitna voda	64	0,5	<0,015	32	<0,03	4	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	<0,5

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 4: Odčitane vrednosti MIK (μg/ml) testiranih izolatov bakterije *E. coli* iz vzorcev vod in živil rastlinskega in živalskega porekla

zap.št.	št. vzorca	tip	podrobno	SMX	TMP	CIP	TET	MERO	AZI	NAL	FOT	CHL	TGC	TAZ	COL	AMP	GEN
41	125	živilo	rastlina	16	<0,25	0,25	<2	<0,03	8	128	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	>64	1
42	126	živilo	meso	<8	<0,25	<0,015	<2	<0,03	4	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	<0,5
43	127	živilo	slaščica	256	<0,25	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	1
44	128	živilo	rastlina	<8	0,5	<0,015	64	<0,03	8	<4	<0,25	<8	0,5	<0,5	<1	2	1
45	129	živilo	gobova juha	>1024	<0,25	<0,015	>64	<0,03	16	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	16
46	130	živilo	meso	16	0,5	0,03	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	<0,5
47	131	živilo	gobova juha	>1024	1	<0,015	<2	<0,03	16	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	1
48	132	živilo	meso	16	<0,25	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	2
49	133	živilo	meso	16	0,5	<0,015	<2	<0,03	16	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	1
50	134	živilo	rastlina	16	0,5	0,03	<2	<0,03	16	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	1
51	135	živilo	solata	>1024	0,5	<0,015	<2	<0,03	16	<4	<0,25	<8	<0,25	2	<1	32	1
52	136	živilo	solata	128	0,5	0,03	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	1
53	137	živilo	ajdova moka	>1024	<0,25	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	1
54	138 P, V	živilo	meso	512	<0,25	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	1
55	139 P	živilo	meso	1024	0,5	<0,015	32	<0,03	4	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	<1	<0,5
56	140 P, V	živilo	meso	16	<0,25	<0,015	<2	<0,03	4	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	<1	1
57	141 P, V	živilo	meso	<8	<0,25	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	1
58	142 P, V	živilo	meso	16	0,5	0,03	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	1
59	146	živilo	meso	<8	0,5	<0,015	<2	<0,03	8	8	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	1
60	147	živilo	meso	>1024	>32	<0,015	64	<0,03	8	<4	<0,25	16	<0,25	<0,5	<1	16	1

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 4: Odčitane vrednosti MIK ($\mu\text{g/ml}$) testiranih izolatov bakterije *E. coli* iz vzorcev vod in živil rastlinskega in živalskega porekla

zap.št.	št. vzorca	tip	podrobno	SMX	TMP	CIP	TET	MERO	AZI	NAL	FOT	CHL	TGC	TAZ	COL	AMP	GEN
61	148	živilo	meso	256	<0,25	0,25	<2	<0,03	4	128	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	<1	<0,5
62	149	živilo	meso	16	0,5	<0,015	<2	<0,03	4	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	<1	1
63	150	živilo	meso	>1024	>32	4	>64	0,25	16	>128	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	>64	<0,5
64	151	živilo	meso	>1024	<0,25	0,5	>64	<0,03	16	>128	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	1
65	152	živilo	meso	>1024	>32	>8	64	<0,03	8	>128	<0,25	<8	0,5	<0,5	<1	<1	1
66	153	živilo	meso	16	<0,25	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	0,5	<0,5	<1	2	<0,5
67	154	živilo	meso	>1024	<0,25	<0,015	>64	<0,03	8	<4	4	<8	<0,25	8	<1	>64	<0,5
68	155	živilo	meso	<8	<0,25	<0,015	<2	<0,03	<2	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	<1	1
69	156	živilo	meso	16	<0,25	<0,015	4	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	<1	1
70	157	živilo	meso	16	0,5	<0,015	<2	<0,03	16	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	4	1
71	160	živilo	rastlina	128	0,5	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	2	<1	2
72	161	živilo	rastlina	32	<0,25	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	<0,5
73	67	živilo	rastlina	128	<0,25	<0,015	<2	<0,03	4	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	<0,5
74	147 E	živilo	blitva	>1024	>32	0,06	>64	<0,03	8	<4	>4	64	<0,25	1	<1	>64	<0,5
75	151 E	živilo	rukola	<8	<0,25	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	8	<0,5
76	153 V	živilo	peteršilj	>1024	<0,25	0,5	<2	<0,03	8	128	2	<8	<0,25	1	<1	>64	<0,5
77	6	živilo	meso	16	1	0,06	<2	0,12	8	<4	<0,25	<8	<0,25	4	<1	4	1
78	23	živilo	rastlina	16	0,5	<0,015	4	<0,03	8	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	1
79	24	živilo	rastlina	32	<0,25	<0,015	<2	<0,03	4	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	<1	1
80	39	živilo	rastlina	16	1	<0,015	<2	<0,03	4	<4	<0,25	<8	<0,25	<0,5	<1	2	<0,5

Sulfatetoksazol (SMX), trimetoprim (TMP), ciprofloksacin (CIP), tetraciklin (TET), meropenem (MERO), azitromicin (AZI), nalidiksična kislina (NAL), cefotaksim (FOT), kloramfenikol (CHL), tigeciklin (TGC), ceftazidim (TAZ), kolistin (COL), ampicilin (AMP) in gentamicin (GEN). P – izolat iz projekta PROMISE, V – VTEC, E – ESBL

Preglednica 5: Antibiotična odpornost bakterije *E. coli* v izoliranih vzorcih

zap.š	podrobno	sulfamidi		kinoloni		betalaktami				amin	makr	tetraciklini		fenik	drugi
		SMX	TMP	CIP	NAL	FOT	AMP	TAZ	MERO	GEN	AZI	TGC	TET	CHL	COL
1	pitna voda	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
2	pitna voda	R	NS	S	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	S
3	pitna voda	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	NS	S	NS
4	pitna voda	R	NS	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	NS
5	pitna voda	I	S	NS	S	S	S	S	S	S	R	S	NS	S	S
6	pitna voda	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	NS	R	NS
7	pitna voda	I	NS	NS	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	NS
8	pitna voda	R	S	NS	S	S	S	S	S	S	R	S	NS	S	NS
9	pitna voda	R	S	S	S	S	S	S	S	NS	R	NS	NS	S	NS
10	pitna voda	S	S	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	R	S	NS
11	pitna voda	S	S	S	S	S	S	S	S	NS	R	NS	NS	S	S
12	pitna voda	R	NS	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	R	S	NS
13	pitna voda	I	NS	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
14	pitna voda	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NS	NS	S	NS
15	pitna voda	I	NS	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
16	pitna voda	S	S	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
17	pitna voda	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	NS	R	S	NS
18	pitna voda	S	NS	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	R	S	NS
19	pitna voda	R	NS	S	S	S	S	S	S	S	R	NS	R	S	NS
20	pitna voda	I	S	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
21	pitna voda	S	NS	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
22	pitna voda	S	NS	NS	S	S	S	S	S	NS	R	NS	NS	S	NS
23	pitna voda	S	S	NS	S	S	S	S	S	NS	R	NS	NS	S	NS
24	pitna voda	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
25	pitna voda	R	NS	NS	S	S	S	S	S	NS	R	NS	NS	S	NS
26	pitna voda	R	NS	NS	S	S	S	S	S	S	S	NS	NS	S	NS
27	pitna voda	R	S	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
28	pitna voda	R	S	NS	S	S	S	S	S	NS	R	NS	NS	S	NS
29	pitna voda	S	NS	NS	S	S	NS	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
30	pitna voda	S	NS	NS	S	S	NS	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
31	pitna voda	R	NS	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
32	pitna voda	I	S	S	S	S	S	S	S	NS	R	NS	NS	S	NS
33	pitna voda	NS	NS	S	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
34	pitna voda	R	R	NS	S	S	R	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
35	pitna voda	NS	NS	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
36	pitna voda	I	S	S	S	S	S	S	S	NS	R	NS	NS	S	NS
37	pitna voda	S	NS	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
38	pitna voda	S	NS	NS	S	S	S	S	S	NS	S	NS	R	S	NS
39	pitna voda	S	NS	S	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
40	pitna voda	S	S	NS	S	S	S	S	S	NS	S	NS	R	S	NS

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 5: Antibiotična odpornost bakterije *E. coli* v izoliranih vzorcih

zap.š	podrobno	SMX	TMP	CIP	NAL	FOT	AMP	TAZ	MERO	GEN	AZI	TGC	TET	CHL	COL
41	rastlina	S	NS	S	R	S	R	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
42	meso	NS	NS	NS	S	S	S	S	S	NS	S	NS	NS	S	NS
43	slaščica	R	NS	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
44	rastlina	NS	S	NS	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	NS
45	gobova juha	R	NS	NS	S	S	S	S	S	R	R	NS	R	S	NS
46	meso	S	S	S	S	S	S	S	S	NS	R	NS	NS	S	NS
47	gobova juha	R	S	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
48	meso	S	NS	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
49	meso	S	S	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
50	rastlina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
51	solata	R	S	NS	S	S	R	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
52	solata	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
53	ajdova	R	NS	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
54	meso	R	NS	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
55	meso	R	S	NS	S	S	NS	S	S	NS	S	NS	R	S	NS
56	meso	S	NS	NS	S	S	NS	S	S	S	S	NS	NS	S	NS
57	meso	NS	NS	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
58	meso	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
59	meso	NS	S	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
60	meso	R	R	NS	S	S	I	S	S	S	R	NS	R	I	NS
61	meso	R	NS	S	R	S	NS	S	S	NS	S	NS	NS	S	NS
62	meso	S	S	NS	S	S	NS	S	S	S	S	NS	NS	S	NS
63	meso	R	R	R	R	S	R	S	S	NS	R	NS	R	S	NS
64	meso	R	NS	S	R	S	S	S	S	S	R	NS	R	S	NS
65	meso	R	R	R	R	S	NS	S	S	S	R	S	R	S	NS
66	meso	S	NS	NS	S	S	S	S	S	NS	R	S	NS	S	NS
67	meso	R	NS	NS	S	R	R	I	S	NS	R	NS	R	S	NS
68	meso	NS	NS	NS	S	S	NS	S	S	S	NS	NS	NS	S	NS
69	meso	S	NS	NS	S	S	NS	S	S	S	R	NS	S	S	NS
70	meso	S	S	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
71	rastlina	I	S	NS	S	S	NS	S	S	S	R	NS	NS	S	S
72	rastlina	S	NS	NS	S	S	S	S	S	NS	R	NS	NS	S	NS
73	rastlina	I	NS	NS	S	S	S	S	S	NS	S	NS	NS	S	NS
74	blitva	R	R	S	S	R	R	S	S	NS	R	NS	R	R	NS
75	rukola	NS	NS	NS	S	S	S	S	S	NS	R	NS	NS	S	NS
76	peteršilj	R	NS	S	R	I	R	S	S	NS	R	NS	NS	S	NS
77	meso	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	NS	NS	S	NS
78	rastlina	S	S	NS	S	S	S	S	S	S	R	NS	S	S	NS
79	rastlina	S	NS	NS	S	S	NS	S	S	S	S	NS	NS	S	NS
80	rastlina	S	S	NS	S	S	S	S	S	NS	S	NS	NS	S	NS

S – občutljivo, I – zmerno občutljivo, R – odporno, NS – niso občutljivi

Glede na očitane rezultate minimalnih inhibitornih koncentracij iz mikrotitrskih plošč smo rezultate združili v preglednico 4. Nato smo na osnovi teh rezultatov in z upoštevanjem standardov za mikrobn občutljivost bakterij *E. coli* na antibiotike (CLSI, 2014) preiskovane bakterije razvrstili kot občutljive oziroma dovzetne za antibiotik (S), zmerno občutljive (I) in rezistentne oziroma odporne na določen antibiotik (R). Četrta kategorija pa so tako imenovani neobčutljivi sevi (NS), ki pri določenih najnižjih koncentracijah na plošči niso imeli rasti (Preglednica 5). Tako so v preglednici 5 antibiotiki razvrščeni po skupinah, v katere jih uvrščamo. Vseh štirinajst antibiotikov, na katere smo preverjali odpornost sevov *E. coli* smo razdelili v skupine (sulfamidi, kinoloni, β -laktami, aminoglikozidi, tetraciklini, makrolidi, fenikoli in polimiksini). Iz preglednice 5 je razvidno, kateri izolati *E. coli* so odporni oziroma večkrat odporni na posamezne skupine antibiotikov. Odpornost na antibiotike je označena z barvo: z belo, sevi ki so bili občutljivi na posamezen antibiotik, z roza sevi, ki so bili zmerno občutljivi in z modro sevi ki so bili odporni na posamezen antibiotik.

Tako je bilo pokazano da je bila večina izoliranih sevov *E. coli* odporna na azitromicin. Velika večina vzorcev je pokazala občutljivost na večino testiranih antibiotikov, torej na celotno skupino sulfamidov, β -laktamov, aminoglikozidov, makrolidov in fenikolov. Pri tetraciklinih se v večini vzorcev ni pojavila niti občutljivost na antibiotike iz te skupine (razen nekaj sevov, ki so bili rezistentni na tetraciklin).

4.3.1 Antibiotična odpornost izolatov *E. coli* iz pitne vode

V spodnji tabeli je prikazano skupno število sevov z minimalno inhibitorno koncentracijo pri določeni koncentraciji danega antibiotika. Podane so številke najnižjih koncentracij antibiotikov, ki se pojavljajo na Sensititre® plošči do najvišjih koncentracij. Številke v najnižjih koncentracijah antibiotika predstavljajo maksimalno MIK ($MIC=C_{min} \rightarrow MIC \leq C_{min}$). Če je vrednost MIK višja od najvišje navedene koncentracije določenega antibiotika, je število sevov podano pri naslednji višji stopnji koncentracije antibiotika. Temnejša siva polja predstavljajo koncentracije antibiotikov, pri katerih so bakterije *E. coli* po standardih CLSI (2014) zmerno občutljive (I=intermediate) na antibiotik. Debela črna črta kaže odmerek antibiotika med občutljivo in odporno, če koncentracija antibiotika za zmerno občutljivo ne obstaja oziroma ni določena, ali pa vmesne koncentracije doziranja antibiotika ni. Predstavljeno imamo določeno število sevov *E. coli*, ki so imela MIK pri določeni koncentraciji antibiotika.

Iz spodnje preglednice 6 je razvidno, da je največ izoliranih bakterij *E. coli* in vzorcev pitnih vod odpornih na azitromicin (90 %) in sulfametoksazol (40 %), medtem ko na skupino kinolonov, antibiotikov, kamor uvrščamo ciprofloksacin in nalidiksinsko kislino, ni bil odporen nobeden od izolatov. Prav tako odpornosti nismo zaznali pri kolistinu, tigecilinu, gentamicinu in skupini antibiotikov β -laktamov, kjer je bil le majhen delež

izolatov (2,5 %) odporen na ampicilin in cefotaksim. Majhen delež izolatov je bil odporen tudi na trimetoprim (2,5 %).

Preglednica 6: Odstotek proti posameznemu antibiotiku odpornih izolatov bakterije *E. coli* iz vzorcev pitne vode

	SMX	TMP	CIP	NAL	AMP	FOT	TAZ	MERO	GEN	TET	TGC	AZI	CHL	COL
<i>E. coli</i>	40	2,5	0	0	2,5	2,5	0	0	0	20	0	10	2,5	0

Preglednica 7: Število sevov *E. coli* z določeno MIK antibiotika (sevi iz vzorcev pitne vode, n = 40)

Število sevov <i>E. coli</i> z določeno MIK antibiotika (sevi iz vzorcev pri koncentraciji 10 ⁸)																			
Antibiotik	konc. na plošči (µg/ml)	Število sevov <i>E. coli</i> z MIK (µg/ml) pri določeni koncentraciji antibiotika																	
		0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	>1024
sulfamidi																			
SMX	8-1024										2	4	5	6	7	1	1	3	11
TMP	0,25-32					20	16		2		1			1					
kinoloni																			
CIP	0,015-8	25	13			1	1												
NAL	4-128									38	1	1							
β-laktami																			
AMP	1-64							2	19	18					1				
FOT	0,25-4					39					1								
TAZ	0,5-8						38	1		1									
MERO	0,03-16		38	1	1														
amino-glikozidi																			
GEN	0,5-32						15	24		1									
tetraciklini																			
TET	2-64								31	1			1	4	3				
TGC	0,25-8					34	5	1											
makrolidi																			
AZI	2-64									4	32	3	1						
fenikoli																			
CHL	8-128										39			1					
polimiksini																			
COL	1-16							37	3										

4.3.2 Antibiotična odpornost izolatov *E. coli* iz vzorcev živil

Po enakem principu kot za bakterijske izolate iz vzorcev pitne vode so rezultati predstavljeni tudi za izolate iz vzorcev živil. Razdelili smo jih v dve skupini, in sicer živila živalskega in živila rastlinskega porekla.

4.3.2.1 Antibiotična odpornost izolatov *E. coli* iz živil živalskega porekla

V primerjavo smo vključili 22 vzorcev živil živalskega porekla in 18 vzorcev živil rastlinskega porekla. Bakterijski sevi iz mesa so bili izolirani v letu 2014, nekaj jih je bilo

iz zbirke NLZOH v Kranju, pet sevov VTEC je bilo izoliranih v okviru projekta PROMISE v letu 2013.

V preglednici 8 je predstavljeno število izolatov bakterije *E. coli* iz vzorcev mesa z določenim MIK posameznih antibiotikov. Najvišji delež odpornih sevov je bil tudi v vzorcih mesa na azitromicin (72,2 %) in sulfametoksazol (36,4 %). Odpornosti tudi izolati iz vzorcev mesa niso pokazali na kolistin, tigeciklin in gentamicin. Nekoliko višji v primerjavi z vzorci pitne vode pa je bil odstotek odpornosti na skupino β -laktamov, kjer izolati odpornosti niso razvili le na meropenem. Razliko opazimo tudi pri skupini kinolonov, kjer smo pri izolatih iz vzorcev mesa opazili odpornost tako na ciprofloksacin (9 %) in nalidiksinsko kislino (18,2 %). V preglednici 8 so zajeti tudi sevi pridobljeni v projektu PROMISE, ki smo jih pri nadaljni analizi izvzeli zaradi primerjave odpornosti domačih in tujih sevov (preglednica 10).

Preglednica 8: Število sevov *E. coli* z določeno MIK antibiotika (sevi iz vzorcev ŽŽP, n = 22)

Antibiotik	konec. na plošči (µg/ml)	Število sevov <i>E.coli</i> z MIK (µg/ml) pri določeni koncentraciji antibiotika																	
		0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	>1024
sulfamidi																			
SMX	8-1024										4	10				1	1	1	5
TMP	0,25-32					11	7	1						3					
kinoloni																			
CIP	0,015-8	15	2	1		1	1			1		1							
NAL	4-128									17	1				1	3			
β-laktami																			
AMP	1-64							7	6	6		1			2				
FOT	0,25-4					21				1									
TAZ	0,5-8						20			1	1								
MERO	0,03-16		20		1	1													
amino- glikozidi																			
GEN	0,5-32						7	14	1										
tetraciklini																			
TET	2-64								15	1			1	2	3				
TGC	0,25-8					20	2												
makrolidi																			
AZI	2-64								1	5		12	4						
fenikoli																			
CHL	8-128										21	1							
polimiksini																			
COL	1-16							22											

4.3.2.2 Antibiotična odpornost izolatov *E. coli* v vzorcih živil rastlinskega porekla

Vzorci živil rastlinskega izvora so bili pridobljeni v letu 2014, trije vzorci leta 2013, štirje vzorci so iz leta 2008.

Delež odpornih izolatov je bil v tej skupini spet najvišji pri azitromicinu (83,3 %) in sulfametoksazolu (38,9 %). Noben sev ni izkazoval odpornosti na kolistin, tigeciklin, ciprofloksacin, v skupini β -laktamov pa na meropenem in ceftazidim.

Preglednica 9: Število sevov *E. coli* z določeno MIK antibiotika (sevi iz vzorcev ŽRP, n = 18)

Antibiotik	konc. na plošči ($\mu\text{g/ml}$)	Število sevov <i>E. coli</i> z MIK ($\mu\text{g/ml}$) pri določeni koncentraciji antibiotika																	
		0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	>1024
sulfamidi																			
SMX	8-1024										2	4	2		3	1			6
TMP	0,25-32					9	6	2						1					
kinoloni																			
CIP	0,015-8	13	2	1		1	1												
NAL	4-128									16					2				
β-laktami																			
AMP	1-64							2	6	5	1		1		3				
FOT	0,25-4					16			1		1								
TAZ	0,5-8						15	2	1										
MERO	0,03-16		18																
amino-glikozidi																			
GEN	0,5-32						6	10	1			1							
tetraciklini																			
TET	2-64								14	1				1	2				
TGC	0,25-8					17	1												
makrolidi																			
AZI	2-64									3	11	4							
fenikoli																			
CHL	8-128										17			1					
polimiksini																			
COL	1-16							17	1										

V preglednici 10 je prikazan delež odpornosti proti posameznim antibiotikom, ločeno glede na izvor živila. Pri izračunu deleža odpornosti živil živalskega porekla smo izvzeli pet sevov pridobljenih tekom projekta PROMISE.

Preglednica 10: Odstotek proti posameznim antibiotikom odpornih izolatov bakterije *E. coli*, ločeno glede na izvor, živila živalskega porekla (n = 17) in živila rastlinskega porekla (n = 18)

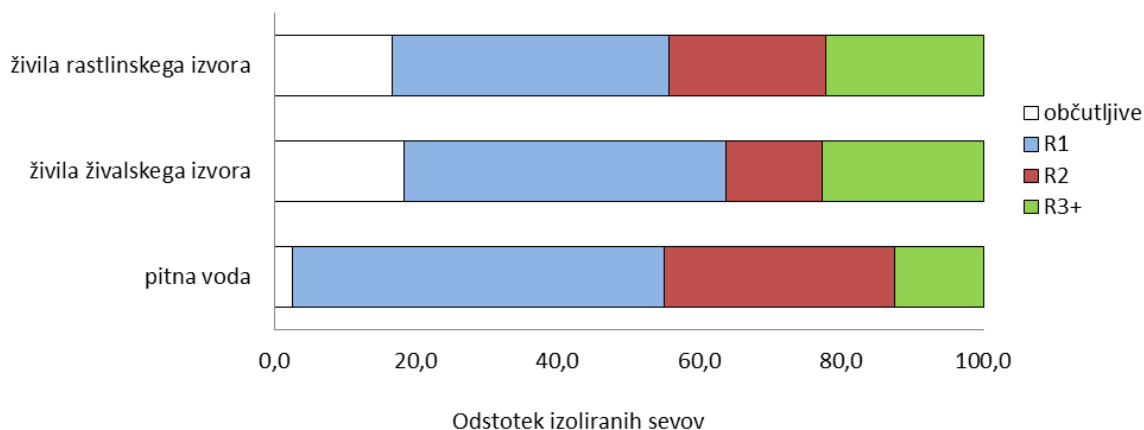
	SMX	TMP	CIP	NAL	AMP	FOT	TAZ	MERO	GEN	TET	TGC	AZI	CHL	COL
ŽŽP	35,3	17,6	11,8	23,5	11,8	5,9	0	0	0	29,4	0	76,5	0	0
ŽRP	38,9	5,5	0	11,1	22,2	5,5	0	0	5,5	16,7	0	83,3	5,5	0

4.3.3 Mnogokratna odpornost izolatov *E. coli*

Število izolatov z odpornostjo proti enemu ali več antibiotikom je bilo višje v vzorcih pitne vode (97,5 %) kot v vzorcih živil (82,5 %). Če vzamemo za primerjavo samo živila, pa je bila stopnja odpornosti na vsaj en antibiotik le malenkost višja v živilih rastlinskega izvora

(83 %), kot v živilih živalskega izvora (82 %). Vendar pa je bil odstotek sevov odpornih na tri ali več antibiotikov, najvišji v živilih živalskega porekla (22,7 %) v primerjavi z 22,2 % odpornih izolatov na tri ali več antibiotikov v rastlinskih živilih in 12,5 % izolatov iz pitne vode.

Primerjava med testiranimi izolati bakterije *E.coli* na odpornost proti antibiotikom glede na izvor je prikazana na sliki 10.



antibiotikov pri sevih, izoliranih iz vzorcev pitne vode in živil različnega izvora (n=80)

Odstotek sevov iz vzorcev pitne vode, ki so bili odporni na eno skupino antibiotikov je bilo tako 52,5 %, odstotek sevov iz vzorcev živil živalskega porekla je bil 45,5 %, 38,9 % je bilo sevov, odpornih na eno skupino antibiotikov iz vzorcev živil rastlinskega izvora. Na dve skupini antibiotikov je bilo odpornih 32,5 % sevov iz vzorcev pitne vode, 13,6 % sevov iz vzorcev živil živalskega porekla in 22,2 % sevov iz vzorcev živil rastlinskega porekla.

4.3.4 Antibiotika odpornost izolatov VTEC

Edini potrjeni sev VTEC rastlinskega izvora smo izolirali iz peteršilja (vzorec pod zap.št. 76). Ta sev je bil poleg SMX odporen še na NAL, AMP in AZI. Pokazal je še vmesno občutljivost na cefotaksim, ostalih devet antibiotikov pa je bilo učinkovitih proti VTEC. Ostali štirje sevi VTEC (zap.št. 54, 56, 57, 58) so bili izolirani iz živil živalskega porekla v okviru projekta PROMISE, mi pa smo jih še enkrat dodatno potrdili kot VTEC pozitivne. Ti sevi razen na azitromicin, sev iz vzorca piščanca (št. 56) še na SMX, niso pokazali odpornosti na testirane antibiotike.

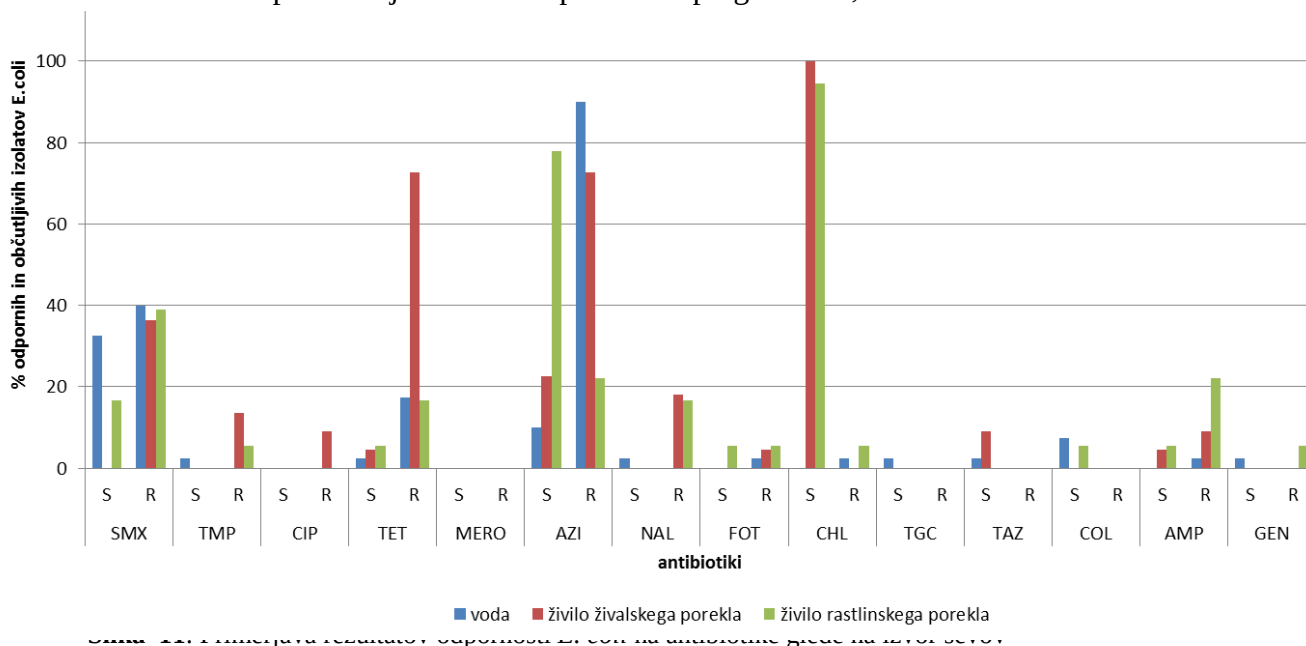
4.3.5 Antibiotika odpornost sevov ESBL

Vzorca pod zaporedno številko 74 in 75 sta bila identificirana kot ESBL, ki smo ju našli v blitvi in rukoli. Ti sevi poleg odpornosti na peniciline in cefalosporine pogosto izražajo

odpornost tudi na aminoglikozide in kinolone. Glede na prikazane rezultate v preglednici 4 bi lahko rekli, da te trditve za naše vzorce ESBL ne držijo, saj nobeden od obeh izolatov ni pokazal odpornosti ne na kinolone, ne na gentamicin, ki ga uvrščamo med aminoglikozide. Pokazala se je odpornost na SMX in TMP, prav tako na FOT in AMP, ki ju uvrščamo med β -laktame in pa tudi na azitromicin in tetraciklin. Učinkoviti antibiotik proti ESBL naj bi bil meropenem, kar sicer lahko potrdimo, saj pri nobenem od vzorcev ni bilo opaziti odpornosti na ta antibiotik, ampak je bil enako učinkovit tudi pri vseh drugih izoliranih vzorcih.

Če povzamem rezultate odpornosti sevov *E. coli* na določene antibiotike, jih je bilo največ odpornih na azitromicin in sulfametoksazol. Delež sevov odpornih na antibiotike iz vzorcev živil živalskega porekla je bil visok pri trimetoprimu, ciprofloksacimu, tetraciklinu, kjer sevi iz vzorcev vode in živil rastlinskega porekla niso izkazovali odpornosti. Razlika med odpornostjo na nalidiksinsko kislino in cefotaksim pri sevih iz vzorcev živil ni bistvena, vendar delež odpornosti ni visok. So pa najvišjo odpornost pokazali sevi iz vzorcev živil rastlinskega porekla na ampicilin in gentamicin. Odpornost sevov iz vzorcev vode razen pri sulfametoksazolu in azitromicinu nikjer ni bila izrazita.

Na sliki 11 so predstavljeni rezultati povzeti iz preglednic 7, 8 in 9.



V prilogi A pa so zbrani rezultati nadaljnje obdelave podatkov, to je antibiotsko odpornost za posamezen antibiotik, ne glede na vrsto živila od koder so izvirali bakterijski sevi.

5 RAZPRAVA

V nalogi smo tekom letnega monitoringa preiskovali vzorce pitne vode in živil, ter tekom eksperimentalnega dela v okviru naloge iz njih izolirali različne seve *E. coli*. Izolirane seve smo s q-PCR testirali na VTEC, nadalje pa na antimikrobno odpornost. Skupno smo *E. coli* izolirali iz 40 vzorcev pitne vode in 40 vzorcev živil različnih izvorov, od mesnih do rastlinskih živil, pa tudi predelanih, kot so ajdova moka, slaščice, gobova juha.

5.1 IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA *E. coli* IZ VZORCEV ŽIVIL IN VODE

V nalogi smo z klasično identifikacijo vrste, ki temelji na morfoloških in fenotipskih lastnostih, potrdili bakterije *E. coli*. Gojišče TBX je specifično za rast *E. coli*, zavira pa rast drugih bakterij, *E. coli* pa se obarvajo značilno modro, tako smo lahko morfološko določili domnevno rast iskanih bakterij. Domnevno rast smo potrjevali z testi, in sicer z rastjo na TTC agarju z bromtimol zeleno, kjer zrastejo za *E. coli* značilne rumene kolonije s hrapavo površino. Za potrditev smo naredili še indol test. Tako smo identificirali vse izolate *E. coli*, ki smo jih kasneje s PCR samo še potrdili in z qPCR naredili test verotoksičnosti.

Izmed vseh preiskovanih vzorcev pitne vode in živil, zajetih v letni monitoring smo iz 40 vzorcev pitne vode in 25 vzorcev živil različnih izvorov izolirali seve *E. coli*.

5.2 REZULTATI POTRDITVE SEVOV VTEC IN ESBL Z q-PCR

Z analizo PCR v realnem času smo potrdili VTEC seve in ESBL seve. Izmed vseh 75 izolatov v laboratoriju NLZOH smo le en sev potrdili kot VTEC pozitiven, kar predstavlja 1,3 % vseh preiskovanih vzorcev, iz katerih smo izolirali *E. coli*. Dva izolata oziroma 2,7 % sevov smo potrdili kot ESBL pozitivna.

Glede na naše rezultate lahko trdimo, da so primerljivi tudi z rezultati drugih raziskav, kjer so potrjevali VTEC in ESBL seve. Tako so Canizales-Roman in sod. (2013) izmed 409 vzorcev z *E. coli* izolirali pet pozitivnih sevov VTEC iz pripravljene hrane in mlečnih izdelkov, medtem ko Skočkova in sod. (2013) med 27 izolatov niso zaznali gena, ki bi nosil zapis za *stx1* ali *stx2*, za sintezo Shiga toksina. V treh izolatih so določili prisotnost gena *eae*, ki kodira proizvodnjo intimina, za vezavo na črevesne celice. Skočkova in sod. (2013) so razpravljali tudi o sevih ESBL, katerim je v zadnjem času namenjene več pozornosti, saj so sposobni hidrolize večine β -laktamskih antibiotikov, ki so trenutno v uporabi, ampak jih med samo raziskavo niso uspeli izolirati.

Med junijem 2012 in majem 2013 je bil izveden projekt PROMISE (Protection of consumer through mitigation of segregation of expertise) (Nagy in sod., 2013), pri katerem so zbirali vzorce živil, ki so bili nelegalno prineseni v države, sodelujoče pri tem projektu

med katerimi je bila tudi Slovenija. V projektu PROMISE so skupno zbrali 1526 vzorcev hrane, iz katerih so izolirali *E. coli* in jih testirali na prisotnost VTEC. Izmed vseh vzorcev hrane so iz 113 vzorcev izolirali seve *E. coli*. Skupno je bilo 15 sevov (1 %) potrjenih kot VTEC pozitivnih, oziroma štirje sevi od skupno 103 (3,8 %), ki so bili v okviru tega projekta izolirani na Biotehniški fakulteti v Ljubljani, kar je primerljivo z rezultati v naši nalogi in prav tako z drugimi raziskavami. Prav tako so v projektu dva seva potrdili kot ESBL, kar predstavlja 1,8 % vseh sevov *E. coli* v tem projektu. Delež ESBL sevov je nekoliko nižji, kot delež potrjenih sevov v naši nalogi (2,7 %).

5.3 ANALIZA REZULTATOV TESTIRANJA BAKTERIJ *E. coli* NA ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM

Problem za zdravje ljudi je antimikrobna odpornost *E. coli* sevov iz živil, saj lahko nevirulentni sevi *E. coli*, zaužiti s hrano, postanejo del komezalne črevesne mikrobiote in zato kot nalašč rezervoar genov za odpornost za potencialno patogene seve (Trkov in sod., 2014).

Na splošno je bilo 90 % testiranih sevov, odpornih na vsaj en antibiotik. Zmerno občutljivost smo opazili pri enem odstotku vseh sevov testiranih na štirinajst antibiotikov. Največ srednje občutljivih izolatov je bilo iz vzorcev pitnih vod, in sicer na sulfametoksazol. Pri pitnih vodah so se samo pri tem antibiotiku pojavile zmerne občutljivosti. Pri živilih smo zmerno občutljivost sevov določili pri večih antibiotikih, sulfametoksazolu, cefotaksimu, ampicilinu, ceftazidimu in kloramfenikolu.

5.3.1 Analiza rezultatov testiranja bakterij *E. coli* na odpornost proti antibiotikom iz vzorcev pitne vode

Pri vzorcih pitnih vod so rezultati antibiogramov pokazali največjo odpornost na azitromicin, in sicer je bilo kar 90 % vseh sevov odpornih na ta antibiotik. Sledila je odpornost na sulfametoksazol (40 %), tetraciklin (17,5 %), na cefotaksim, ampicilin, kloramfenikol kjer je 2,5 % vzorcev pokazalo odpornost na te antibiotike, medtem ko na trimetoprim, ciprofloksacin, nalidiksično kislino, ceftazidim, meropenem, gentamicin, tigeciklin in colistin ni bil odporen nobeden od vzorcev pitne vode. Na en antibiotik je bilo v nalogi odpornih 52,5 % izolatov, na dva antibiotika 32,5 % in na tri ali več 12,5 % vseh izolatov iz pitnih vod.

Študija odpornosti proti antibiotikom bakterije *E. coli*, izolirane v sistemu pitne vode kraškega podeželja na severozahodu Francije, Larocheja in sod. (2010), je pokazala 30 – 55 % odpornost bakterije *E. coli* na antibiotike, 10 – 23 % teh izolatov je bilo odpornih na dva ali tri antibiotike. Najpogostejše je bila odpornost ugotovljena na kloramfenikol (21 %) in tetraciklin (32 %). Odpornosti na β-laktame, razen v enem primeru, ni bilo zaznati. V

sušnem obdobju je bil odstotek odpornih *E. coli* izoliranih v vodnem sistemu nizek, in sicer okoli 6 %, nobeden od vzorcev ni bil odporen na več kot en antibiotik. Odpornih sevov v času padavin je bilo kar 50 %, in sicer okoli 40 % je bilo odpornih na en antibiotik in okoli 10 % na dva ali več antibiotikov. V raziskavi Maal-Bared in sod. (2013) so preiskovali rezistenco *E. coli* in *E. coli O157*, izoliranih iz vode in iz namakalnih vod v Britanski Kolumbiji. Največ vzorcev je bilo odpornih na tetraciklin in ampicilin, sledijo nalidiksinska kislina, ciprofloksacin, odpornosti pa niso pokazali na cefotaksim. Ti izolati so največkrat pokazali odpornost na enega ali dva antibiotika. Sledi še študija Colemana in sod. (2013), ki so preiskovali odpornost *E. coli* iz virov pitne vode v Kanadi, vzorce pa so prispevali lastniki privatnih vodnih virov prostovoljno. Med vsemi zbranimi vzorci je bilo na antimikrobno občutljivost testiranih 4,5 % zbranih vzorcev, 10,5 % vzorcev, kontaminiranih z *E. coli*, je bilo odpornih na enega ali več antibiotikov, vključno z 3,7 % izolatov odpornih na tri ali več razredov antibiotikov. Največ odpornosti so izolati pokazali na tetraciklin (76 %), na ampicilin (9 %), na sulfametoksazol (8 %). Najmanj vzorcev je bilo odpornih na kloramfenikol (0,9 %) in na skupino β -laktamov. V tej raziskavi je multirezistenco pokazalo 3,7 % izolatov, in sicer največ na sulfamide-aminoglikozide-tetracikline. V raziskavi Larocheja in sod. (2010) je bil večkrat odporen le en sev iz vzorca vode, in sicer kar na pet družin antibiotikov (β -laktami, kloramfenikol, streptomycin, tetraciklin in sulfametoksazol+trimetoprim).

V nobeni od zgoraj podanih raziskav niso testirali odpornosti na azitromicin, na katerega je v naši nalogi pokazalo odpornost največ izolatov. Nekako pa smo v naši nalogi v obsegu rezultatov zgoraj opisanih raziskav glede odpornosti na druge antibiotike. Če torej izvezamo azitromicin, imamo prav tako velik delež odpornih izolatov na tetraciklin in tudi na kloramfenikol. Sicer pa nismo dokazali odpornosti na nalidiksinsko kislino in ciprofloksacin, tako kot v zgornjih raziskavah. V območju rezultatov zgornjih raziskav je tudi v naši študiji določen delež izolatov, odpornih na več kot en antibiotik. Prav tako se lahko strinjamo z izsledki zgornjih raziskav, ki kažejo majhno odpornost ali pa sploh ne na skupino β -laktamov.

Tako kot v študiji Maal-Bared in sod. (2013), kjer je največ sevov izkazalo odpornost na enega ali dva antibiotika, smo tudi mi v nalogi prišli do podobnih zaključkov. Za razliko od rezultatov zgornjih študij, kjer so dokazali minimalno multirezistentnost sevov iz vzorcev vode, so bili naši rezultati nekoliko drugačni, saj smo kar 12,5 % vseh izolatov dokazali, da so multirezistentni.

5.3.2 Analiza rezultatov testiranja bakterij *E. coli* na odpornost proti antibiotikom iz vzorcev živil

Rezultati antibiogramov, kjer smo testirali vzorce živil, so bili nekoliko drugačni. Največji delež sevov je zopet pokazal odpornost na azitromicin (77,5 %), sledijo sulfametoksazol (37,5 %), nalidiksinska kislina, ampicilin in tetraciklin, na katere je bilo odpornih 15 % vseh testiranih sevov *E. coli*. Prav tako je 10 % sevov pokazalo odpornost na trimetoprim, na ciprofloksacim, na cefotaksim po pet odstotkov vzorcev in na kloramfenikol 2,5 %. Na antibiotike ceftazidim, meropenem, gentamicin, tigeciklin in kolistin ni bilo dokazane odpornosti pri nobenemu sevu.

Canizales-Roman in sod. (2013) so v svoji študiji testirali vzorce govedine, svinjine, perutnine, sadja, solat, omak, zelenjave, sladice, pa tudi vzorce pitne vode, čaja, vode z okusom in ledu. Izolirali so bakterijo *E. coli* tudi iz mlečnih izdelkov, ki pa jih mi nismo imeli. Vzorci so bili odvzeti v obratih prodaje hrane v Mehiki. V tej raziskavi so ugotovili, da je bilo 39 % sevov odpornih na dva ali več antibiotikov, 60 % pa na vsaj en antibiotik. V našem delu smo prišli do zaključkov, da imamo 42,5 % sevov odpornih na en antibiotik, na dva 17,5 % in na tri ali več antibiotikov 22,5 % sevov, osamljenih iz vzorcev živil.

V zgornji raziskavi so največjo odpornost ugotovili na tetraciklin (34 %), cefotaksim (30 %), ampicilin (29 %). Zelo nizko odpornost ali občutljivost pa so opazili za ciprofloksacin, nalidiksično kislino in ceftazidim, prav tako nizko odpornost, le pet odstotkov so opazili za kloramfenikol, 30 % sevov je bilo odpornih na sulfametoksazol. Prav tako niso testirali odpornosti na azitromicin. So pa naši rezultati glede odpornosti na ostale testirane antibiotike primerljivi z njihovimi.

V letno poročilo o zoonozah v Sloveniji iz leta 2008 je bilo vključenih 113 izolatov iz vzorcev mesa, ki so bili testirani na antibiotike. Največjo stopnjo odpornosti so izolati izkazovali na ampicilin, tetraciklin, nalidiksinsko kislino, trimetoprim. Prav tako so odpornost preverjali pri 36 vzorcih živil iz različnih virov. Od skupno 36 vzorcev je bilo največ izolatov (13,9 %) odpornih proti ampicilinu, proti TET in TMP 8,3 %, proti NAL 5,5 % in proti CHL 2,8 % (VURS, 2009).

Odpornost proti antibiotikom so spremljali tudi na UVHVVR, kjer so bili izolati pridobljeni iz klinično zdravih živali in živil živalskega izvora. Spremljali so odpornost proti protimikrobnim zdravilom izolatov najpogosteje povzročenih bolezni pri ljudeh, med njimi tudi *E. coli*. Pokazal se je zelo velik delež odpornosti izolatov proti kinolonom (CIP in NAL) in tetraciklinom. Glede odpornosti pa so se izolati proti različnim antibiotikom precej razlikovali, glede na to, iz katerih vzorcev so bili izolirani (UVHVVR, 2013).

Iz pregleda občutljivost bakterij na antibiotike v Sloveniji iz leta 2013 vidimo odpornost *E. coli* na nekatere antibiotike, ki smo jih testirali tudi mi. Vzorci so bili sicer v laboratorije, ki so testirali protimikrobno odpornost, poslani iz bolnišničnih ambulant, medtem ko so bili naši izolati iz vzorcev živil, zato rezultati niso najboljše primerljivi, a jih kljub temu navajam. In sicer so rezistentnost izolati izkazovali na ampicilin (49 %), ceftazidim (4 %), gentamicin (8 %) in ciprofloksacin (19 %) (Štrumbelj in sod., 2014).

Evropski trendi naraščanja odpornosti sevov *E. coli* kažejo na povečanje odpornosti proti cefalosporinom tretje generacije, fluorokinolonom in aminoglikozidom. Več držav EU je imelo pomemben trend povečanja teh vrst odpornosti v obdobju med leti 2009 in 2012. Povprečen delež odpornosti proti FOT in TAZ v EU se je z 8,2 % v letu 2009 znatno povečal na 11,8 % v letu 2012 (ECDC, 2013).

5.3.2.1 Analiza rezultatov testiranja *E. coli* na odpornost proti antibiotikom iz vzorcev živil živalskega porekla

Naši sevi, izolirani iz vzorcev živil živalskega izvora so kazali najvišjo stopnjo odpornosti proti antibiotikom na azitromicin, sulfametoksazol. Prav tako so odpornost razvili tudi na tetraciklin (27,3 %), ampicilin in nalidiksinsko kislino.

V poročilu EFSE in ECDC, ki je izšlo v začetku leta 2015, poročajo o izolatih *E. coli* iz živali in hrane izolirane v letu 2013. Štiri države članice, med njimi tudi Slovenija in ena država ne – članica, so *E. coli* izolirale iz mesa brojlerjev, prašičev in goveda. Pri poročanju o antibiotiki odpornosti je bila le-ta visoka na ampicilin, sulfonamide in tetraciklin pri vzorcih mesa brojlerjev in prašičev in nekoliko nižja v vzorcih govejega mesa. Delež odpornosti proti antibiotikom je med državami variiral, pri ampicilinu med 24 in 74 %, med 18 in 54 % pri sulfonamidu in med 11 in 59 % za tetracikline (EFSA, 2015).

V skladu z evropskimi trendi naraščanja odpornosti lahko potrdimo tudi naraščanje odpornosti v Sloveniji sodeč po rezultatih raznih poročil, ne moremo pa enako trditi tudi za dobljene rezultate v naši nalogi.

Preglednica 11: Primerjava odpornosti izolatov *E. coli* iz vzorcev hrane med posameznimi leti

	delež odpornih izolatov (%)									
	SMX	TMP	CIP	NAL	AMP	FOT	GEN	TET	AZI	CHL
2008	0	18,1	4	23,5	30,2	0,7	1,3	23,5	25	5,3
2009		20,1	18,9	18,9	31,1	1,8	1,2	30,5		
2013	66,7	33,3	59,3	33,3 / 51	66,7 / 40	33,3 / 20	4	33,3 / 28	100	33,3 / 8
2014	29,4	0	0	5,9	11,7	0	0	0	94,1	0

Podatki, obarvani z rdečo sozeti iz Letnega poročila o zoonozah in povzročiteljih zoonoz v Sloveniji v letu 2008 in 2009 (VURS, 2009; VURS 2010), podatki za leto 2013 se nanašajo na Slovenijo in sozeti iz poročila EFSE in ECDC iz leta 2015 za leto 2013 (EFSA/ ECDC, 2015).

5.3.2.2 Analiza rezultatov testiranja *E. coli* na odpornost proti antibiotikom iz vzorcev živil rastlinskega porekla

Skočková in sod. (2013) so bakterijo *E. coli* izolirali iz vzorcev zelenjave, uvožene na Češko, in ugotavljali rezistenco na antibiotike. Ugotovili so, da je *E. coli* najpogostejše odporna na ampicilin (48 %), na tetraciklin (18,5 %), prav tako na trimetoprim in nalidiksinsko kislino. Od 27 izoliranih sevov so v skladu s standardi CLSI tri seve potrdili kot odporne na ampicilin, sedem kot zmerno občutljive in tri kot občutljive, medtem ko smo mi od 18 vzorcev rastlin štiri potrdili odporne na ampicilin in 12 kot občutljive. V tej isti študiji je bila odpornost proti več kot eni skupini antibiotikov dokazana pri treh izolatih.

Rezultati odpornosti proti antibiotikom naših vzorcev zelenjave so pokazali najvišjo stopnjo rezistence na azitromicin in sulfametoksazol, medtem ko je bila odpornost na ampicilin in tetraciklin bistveno nižja (16 %).

5.3.3 Mnogokratna odpornost

Glede na rezultate testiranja protimikrobne odpornosti lahko 14 (18,7 %) izolatov štejemo kot multirezistentne (MDR), ker kažejo odpornost na vsaj tri antibiotske razrede. In sicer je bilo pet sevov izoliranih iz vzorcev pitne vode, pet sevov je bilo izoliranih iz vzorcev mesa in pa štirje sevi iz živil rastlinskega porekla (preglednica 5). Sevi *E. coli*, odporni na več protimikrobnih zdravil tako predstavljajo veliko nevarnost za zdravje, če gre za patogene seve, lahko pa predstavljajo nevarnost tudi kot možni prenašalci genov, ki kodirajo odpornost proti različnim protimikrobnim zdravilom.

Rezultati projekta PROMISE so pokazali, da je bilo izmed 113 sevov *E. coli*, 12,4 % sevov iz vzorcev hrane potrjene kot MDR, kar je manj kot v naši nalogi, kjer je bilo takšnih vzorcev 18,7 % oziroma če primerjamo samo vzorce živil živalskega porekla, saj so bili v projektu PROMISE izolirani sevi iz živil živalskega izvora, je bilo MDR sevov v naši nalogi 29,4 %, kar je bistveno več v primerjavi z izsledki projekta PROMISE. Ne glede na vir hrane, je večina sevov *E. coli* pokazala visoko frekvenco odpornosti na ampicilin, tetraciklin (100 %) in sulfonamidnih spojin (93 %) in manj pogosto na kloramfenikol (50 %). Če primerjamo samo MDR izolate, so v naši nalogi pokazali najvišjo frekvenco odpornosti na tetraciklin, sulfonamidne spojine, prav tako na kinolone (100 %), za razliko od odpornosti na ampicilin pri projektu PROMISE v MDR izolatih v naši nalogi ni bilo zaznati rezistence, prav tako ne na kloramfenikol.

5.3.4 Analiza rezultatov odpornosti proti antibiotikom sevov VTEC

V naši raziskavi smo imeli osemdesetih sevov *E. coli*, med katerimi smo jih pet potrdili kot pozitivne za VTEC, en sev je bil iz vzorca peteršilja in smo ga izolirali v laboratoriju NLZOH, štirje sevi pa iz vzorcev mesa, ki so bili preiskovani v projektu PROMISE, torej nelegalno vnešeni v Slovenijo. Skupno 66 vzorcev, zaseženih na letališču Brnik in 37 vzorcev živil zaplenjenih na mejnem prehodu Obrežje, je bilo preiskovanih na Univerzi v Ljubljani v okviru projekta. Od vseh 103 preiskovanih vzorcev so bili štirje potrjeni kot VTEC. Te seve smo na antimikrobno aktivnost preverjali tekom naše naloge. Med vsemi zaseženimi vzorci tekom projekta, ki jih je bilo 1526, pa so jih kot pozitivne na *E. coli* potrdili 113 in izmed teh so 15 sevov potrdili kot VTEC. Torej je bil odstotek VTEC 1,0 %, medtem ko je bil delež izoliranih sevov v naši nalogi 1,3 %. Zanimivo je, da nobeden od 15 sevov VTEC analiziranih v projektu PROMISE ni imel gena za odpornost na antibiotike in niso bili MDR. Prav tako sevi VTEC iz projekta PROMISE v naši nalogi niso izkazovali multirezistence. Medtem je bil sev iz vzorca peteršilja, ki smo ga kot VTEC potrdili v tej nalogi, večkratno odporen, oz. odporen na več skupin antibiotikov.

Naš sev VTEC iz vzorca peteršilja je pokazal večkratno odpornost, in sicer na sulfametoksazol, nalidiksinsko kislino, ampicilin, azitromicin, pokazal pa je tudi zmerno občutljivost na cefotaksim. Medtem ko vzorci iz projekta PROMISE niso pokazali odpornosti na antibiotike, razen na azitromicin (preglednica 5).

Seve *E. coli*, izolirane iz različnih živil v Sloveniji, so Trkov in sod. (2014) testirali med drugim tudi na VTEC. Glede na to, da so bili izolati iz hrane, vzorčene v Sloveniji lahko delno primerjamo pogostnost VTEC sevov pri nas. In sicer so Trkov in sod. izmed 84 izolatov skupaj kar 11 potrdili, da ima enega ali oba *stx* gena. En izolat je bil pozitiven na VTEC virulentni gen *stx1*, pet pa na *stx2* in pet izolatov je bilo pozitivnih na oba *stx* alela. Dva izolata z genom za VTEC sta bila izolirana iz solate, ostali so bili iz mesnih živil.

V naši nalogi smo izolate potrdili kot VTEC, če so imeli prisoten *eae* in vsaj eden gen *stx*. In takih izolatov je bilo pet, od tega smo samo enega kot VTEC izolirali tekom naše naloge, ostale štiri smo tekom raziskave samo dodatno potrdili, saj so bili izolirani v projektu PROMISE na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Torej je delež pozitivnih *E. coli* na verotoksin nekoliko nižji v naši nalogi, smo pa v obeh raziskavah VTEC potrdili tako v vzorcih hrane rastlinskega izvora, kot tudi vzorcih hrane živalskega izvora. Zanimivo je še dejstvo, da so Trkov in sod. (2014) poročali, da imajo sevi, ki so bili pozitivni samo na *stx2* alel, večji potencial virulenčnosti in večjo pogostnost za HUS, kot sevi s samo *stx1* ali obema *stx* aleloma.

5.3.5 Analiza rezultatov odpornosti proti antibiotikom sevov ESBL

V naši nalogi sta bila dva seva potrjena kot ESBL. Naša izolata potrjena kot ESBL sta bila izolirana iz živila rastlinskega izvora. Sev iz vzorca blitve, potrjen kot ESBL je izkazoval odpornost na SMX, TMP, FOT, AMP, AZI, TET, CHL in je MDR. Drugi sev ESBL je bil odporen samo na azitromicin (preglednica 5). Za dva seva *E. coli* je bilo pri projektu PROMISE ugotovljeno, da proizvajata ESBL, in sta bila potrjena kot MDR. Oba sta bila odporna proti cefotaksimu, AMP, CHL, SMX in TET. Tako lahko potrdimo, da so rezultati obeh raziskav primerljivi.

Skočková in sod. (2013) so prav tako razpravljali o sevih ESBL, katerim je v zadnjem času namenjene več pozornosti, saj so sposobni hidrolize večine β -laktamskih antibiotikov, ki so trenutno v uporabi, ampak jih med samo raziskavo niso uspeli izolirati. V naši študiji smo izolirali dva seva, potrjena kot ESBL, ki sta v 50 % pokazala odpornost na skupino sulfamidov, makrolidov in fenikolov, odporna pa sta bila še na tetraciklin, cefotaksim in ampicilin. Za ESBL bakterije Pullukcu in sod. (2007) poročajo, da so bolniki, okuženi z ESBL najmanj dovzetni za antibiotike kot so sulfametoksazol ali ciprofloksacin. Visoko stopnjo odpornosti pa kažejo tudi na β -laktame. Odpornost na te antibiotike pogosto presega 30 – 50 %. V kar 90 % naj bi bil na ESBL uspešen antibiotik meropenem, Lu in sod. (2008) pa poročajo, da naj bi bil v prav tolikšni meri uspešen tudi tigeciklin. Naša dva seva sicer nista bila odporna na ciprofloksacin, je pa res, da nista pokazala občutljivosti ali odpornosti na meropenem in tigeciklin in da je bila rast pri teh dveh antibiotikih zavrta. Nobeden od ostalih 78 izolatov v naši nalogi ni pokazal občutljivosti ali odpornosti na ta dva antibiotika.

Trkov in sod. (2014) so pregledali vseh 84 sevov na ESBL in jih potrdili kot ne – ESBL. Nadalje so vseh 84 izolatov ne – ESBL pregledali za prisotnost plazmida, ki poseduje gen za odpornost na kinolone. Gena v izolatih niso odkrili, kar je bilo v pričakovanju s poročanji o nizki razširjenosti tega gena med ne – ESBL sevi iz vzorcev hrane.

6 SKLEPI

- Med letnim monitoringom smo v laboratoriju na NLZOH iz vzorcev živil živalskega porekla in živil rastlinskega porekla, kakor tudi iz vzorcev pitne vode izolirali seve *E. coli*. Nekaj sevov smo pridobili tudi na Biotehniški fakulteti v Ljubljani in v zbirki NLZOH v Kranju. Tako smo za nadaljnje delo zbrali 80 sevov *E. coli* iz vzorcev pitne vode in živil.
- Med vsemi 80 sevi *E. coli* smo iz enega vzorca živila rastlinskega porekla izolirali sev, ki je bil potrjen kot VTEC. Iz projekta PROMISE smo pridobili še štiri VTEC seve iz živil živalskega porekla. Prav tako smo izmed vseh preiskovanih sevov dva potrdili kot ESBL.
- Izolate smo preverili na antimikrobno odpornost s standardnim setom antibiotikov in po inkubaciji vsem sevom določili MIK. Med vsemi izolati smo najpogosteje potrdili odpornost na azitromicin, medtem ko je bil delež izolatov, odpornih na kolistin, najnižji. Sevi iz vzorcev živil živalskega porekla so pokazali nekoliko pogostejšo odpornost na antibiotike v primerjavi z živila rastlinskega porekla in pitno vodo. Med vsemi izolati je bilo tudi 14 sevov odpornih na več skupin antibiotikov, kar kaže na veliko pogostost večkratno odpornih sevov *E. coli* iz hrane in pitne vode. Sev, ki smo ga izolirali tekom naloge in potrdili kot VTEC, se je prav tako izkazal za večkratno odpornega na različne skupine antibiotikov.

7 POVZETEK

Bakterija *E. coli* je naravni prebivalec prebavnega trakta ljudi in živali ter glavni indikator fekalne kontaminacije v živilih in vodah. Običajno je neškodljiva in je pomemben del zdravega prebavnega trakta, vendar pa so nekateri sevi patogeni, kar pomeni da lahko povzročijo bolezni, bodisi drisko ali bolezni izven prebavnega trakta, naprimer okužbe sečil. Patogene vrste *E. coli* se lahko prenašajo z okuženo vodo ali hrano ali prek stika z živalmi ali ljudmi. Viri so še kontaminirana hrana, predvsem mleto govedina, nepasterizirano mleko in sok, mehki siri iz surovega mleka in surovo sadje in zelenjava npr. kalčki, onesnažena voda, vključno s pitno vodo, živali in njihovo okolje. Pri pregledih okužb s VTEC v svetu se je razširjenost gibala med 4 – 55 % pri pitnem govedu, nekoliko višji delež okužb je bil pri kravah molznicah, med 0,4 – 74 %. Prav tako so jih izolirali tudi pri drugih živalih, vključno s prašiči in kozami. Bakterije *Escherichia coli* so za kampilobaktri, salmonelami in *Clostridium difficile* četrty najpogostejši bakterijski povzročitelj drisk pri ljudeh v našem okolju. Število prijav v Sloveniji je bilo v letu 2013 enako številu prijav adenovirusnih enterokolitisov. V EU in državah Evropskega gospodarskega prostora (EGP) se je v zadnjih letih odpornost proti cefalosporinom tretje generacije pri *E. coli* opazno povečala, prav tako je opaziti trend povečevanja odpornosti na fluorokinolone in aminoglikozide. Delež izolatov *E. coli*, odpornih na najbolj pogosto uporabljene antibiotike se v Evropi povečuje. Po poročanjih EARS-Neta je bilo v letu 2012 proti vsaj enemu od spremljanih antibiotikov odpornih večina izolatov. Odpornost proti karbapenemom pri *E. coli* ostaja nizka. Trenutne študije kažejo, da so serotipi VTEC lahko hkrati odporni na več antimikrobnih razredov, vključno s penicilini, aminoglikozidi, tetraciklini, sulfonamidi in fluorokinoloni. ESBL so encimi, ki inaktivirajo β -laktamske antibiotike s tem ko cepijo amidne vezi v beta - laktamskem obroču. Sevi so odporni na večino pogosto uporabljenih beta - laktamskih antibiotikov, med njimi tudi tretje generacije cefalosporinov. V skladu z letnim monitoringom smo v Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) zbrali seve *E. coli* iz različnih virov, in sicer iz pitne vode in iz živil živalskega in rastlinskega izvora. Na podlagi zbranih sevov smo s pomočjo q-PCR potrdili 1 sev kot VTEC in 2 seva kot ESBL, vsi trije pa so bili rastlinskega izvora. S mikrotitrskimi ploščicami smo določili minimalno inhibitorno koncentracijo 80 izolatov bakterije *E. coli* na 14 različnih antibiotikov. Odpornost proti vsaj enemu antibiotiku je bila ugotovljena pri 90 odstotkih vzorcev pitne vode in živil. Večina izoliranih sevov *E. coli* je bila odporna na azitromicin, nobeden od vzorcev pa ni pokazal občutljivosti ali odpornosti na kolistin. Velika večina vzorcev je pokazala občutljivost na večino skupin testiranih antibiotikov, torej sulfamide, kinolone (razen pri ciprofloksacinu), β -laktame, aminoglikozide, makrolide in fenikole. Sev VTEC smo izolirali iz vzorca peteršilja, pridobili pa smo še štiri seve VTEC iz vzorcev mesa, ki so bili nelegalno vneseni v Slovenijo in so bili del projekta PROMISE. Glede na rezultate testiranja protimikrobne odpornosti smo lahko 14 izolatov potrdili kot multirezistentne (MDR), saj kažejo odpornost na vsaj tri antibiotske razrede. In sicer je bilo pet sevov iz

vzorcev pitne vode, pet sevov iz vzorcev živil rastlinskega porekla in štirje iz vzorcev živil živalskega porekla. Sev iz vzorca peteršilja, ki je bil VTEC, se je izkazal tudi za MDR, saj je bil poleg SMX odporen še na NAL, AMP in AZI, medtem ko sevi iz vzorcev mesa, razen na azitromicin niso izkazovali druge odpornosti. Vzorca ESBL sta pokazala odpornost na SMX in TMP, prav tako na FOT in AMP, ki ju uvrščamo med β -laktame in pa tudi na azitromicin in tetraciklin. Tako smo tudi preiskovani sev ESBL potrdili kot MDR. Zaključimo lahko, da rezultati raziskave kažejo na veliko pogostnost večkratno odpornih sevov *E. coli* iz hrane in pitne vode, kar bi bilo smiselno preiskovati z nadaljnimi raziskavami.

8 VIRI

- Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1 - 42
- Alexander T.W., Inglis G.D., Yanke L.J., Topp E., Read R.R., Reuter T., McAllister T.A. 2010. Farm-to-fork characterization of *Escherichia coli* associated with feedlot cattle with a known history of antimicrobial use. International Journal of Food Microbiology, 137: 40–48
- Al-Zogibi O.G., Mohamed M.I., Hessain A.M., El-Jakee J.K., Kabli S.A. 2015. Molecular and serotyping characterization of shiga toxogenic *Escherichia coli* associated with food collected from Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences, 22: 438 - 442
- Andlovič A. 2002. Enterobakterije. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 179 - 184
- BD and Company. 2008. BD™ Tryptic Soy Broth (TSB). Heidelberg, Becton, Dickinson and Company: 4 str.
<http://www.bd.com> (februar, 2015)
- Blatnik J., Lešničar G., Šibanc B., Cvitan S. 2002. Okužba z *Escherichia coli* O157:H7 - prikaz primera. Zdravniški vestnik, 71: 439-441
- BIOCORP. 2009. TTC Tergitol-7 LAB-AGAR™. Warsaw, BIOCORP Polska Ltd: 1 str.
<http://www.biocorp.pl/en/product/pokaz/id/2081/ttc-tergitol-7-lab-agar%E2%84%A2.html> (januar, 2015)
- BioMérieux. 2015. chromID® ESBL, chromogenic media for ESBL screening. Vienna, bioMérieux Austria G.m.b.H: 1 str.
<http://www.biomerieux-diagnostics.com/chromidr-esbl> (julij, 2015)
- Bonnet R. 2004. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48, 1: 1 - 14
- Cakmakci M. 2015. Antibiotic stewardship programmes and the surgeon's role. Journal of Hospital Infection, 89: 264-266
- Campos J., Mourão J., Pestana N., Peixe L., Novais C., Antunes P. 2013. Microbiological quality of ready-to-eat salads: An underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. International Journal of Food Microbiology, 166: 464–470
- Canizalez-Roman A., Gonzalez-Nuñez E., Vidal J. E., Flores-Villaseñor H., León-Sicairos N. 2013. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli*

strains isolated from food items in northwestern Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 164: 36–45

CDC. 2014. *E. coli* (*Escherichia coli*). Atlanta, Centers for Disease Control and Prevention: 1 str.

<http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html> (marec, 2015)

Chayani N., Tiwari S., Sarangi G., Mallick B., Mohapatra A., Paty B.P., Das P. 2009. Role of azithromycin against clinical isolates of family *Enterobacteriaceae*: A comparison of its minimum inhibitory concentration by three different methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27: 107-110

Cimerman M., Lušicky M. 2013. Navodilo za delo: Določanje prisotnosti gena, ki nosi zapis za intimin ter verotoksin 1 in 2 pri bakteriji *Escherichia coli* z uporabo hidroliznih sond. Maribor, ZZV Maribor, Center za mikrobiologijo: 1-13

CLSI. 2014. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 24th Informational Supplement. Vol. 32, No. 3. CLSI document M100-S24. Wayne, Clinical and Laboratory Standards Institute: 219 str.

Coleman L. B., Louie M., Salvadori M. I., McEwen S. E., Neumann N., Sibley K., Irwin R. J., Jamieson F. B., Daignault D., Majury A., Braithwaite S., Crago B., McGeer A. J. 2013. Contamination of Canadian private drinking water sources with antimicrobial resistant *Escherichia coli*. *Water Research*, 47: 3026-3036

Drlica K., Malik M., Kerns R., Zhao X. 2008. Quinolone-Mediated Bacterial Death. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52: 385–392

EARS-Net/HPSC. 2014. EARS-Net Report Quarter 1-4. Dublin, European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), Health Protection Surveillance Centre: 18 str.

<http://www.hpsc.ie/AZ/MicrobiologyAntimicrobialResistance/EuropeanAntimicrobialResistanceSurveillanceSystemEARSS/EARSSSurveillanceReports/2014Reports/> (marec, 2015)

EcL. 2004. Pathogenic *E. coli*: Pathogenesis. Montréal, Université de Montréal, The Reference Laboratory for *Escherichia coli* (EcL): 1 str.

<http://www.ecl-lab.ca/en/ecoli/pathogenesis.asp> (marec, 2015)

ECDC. 2012. Antimicrobial resistance surveillance in Europe: Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control: 9-20

ECDC. 2013. Evropski dan antibiotikov, povzetek za splošno javnost. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control: 1 str.

<http://ecdc.europa.eu/sl/eaad/antibiotics/Pages/facts.aspx> (marec, 2015)

- EFSA/ECDC. 2015. European Union summary report. Antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the EU in 2013. EFSA Journal 13, 2: 4036, doi: 10.2903/j.efsa.2015.4036: 178 str.
- Franz E., Delaquis P., Morabito S., Beutin L., Gobius K., Rasko D.A., Bono J., French N., Osek J., Lindstedt B., Muniesa M., Manning S., LeJeune J., Callaway T., Beatson S., Eppinger M., Dallman T., Forbes K.J., Aarts H., Pearl D.L., Gannon V., Laing C.R., Strachan N.J.C. 2014. Exploiting the explosion of information associated with whole genome sequencing to tackle Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in global food production systems. International Journal of Food Microbiology, 187: 57–72
- Gale I., Petrovič A., Bitenc K., Grča T. 2014. Kakovost pitne vode. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor, Agencija Republike Slovenije za okolje: 1 str.
http://kazalci.arso.gov.si/?data=indicator&ind_id=667&lang_id=302 (april, 2015)
- Grilc E., Praprotnik M., Trkov M. 2014. Črevesne nalezljive bolezni in zoonoze. V: Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2013. Kraigher A. (ur.). Ljubljana, Nacionalni inštitut za javno zdravje: 43 - 64.
- Gyles C.L. 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. Journal of Animal Science, 85: 45-62
- Holten K.B., Onusko E.M. 2000. Appropriate Prescribing of Oral Beta-Lactam Antibiotics. American Family Physician, 62: 611-620
- ISO/TS 13136:2012. Microbiology of food and animal feed - Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145. 2012: 23 str.
- ISO 20838. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Requirements for amplification and detection for qualitative methods. 2006: 5 str.
- ISO 6887-1:1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. 1999: 5 str.
- IVZ. 2010. Kako lahko preprečimo okužbe z enterohemoragično *E. coli*. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 1 str.
- Kirst H.A., Allen N.E. 2013. Aminoglycoside antibiotics. V: Reference module in chemistry, molecular sciences and chemical engineering. Reedijk J. (ed.) Oxford, Elsevier Inc: 17 str.

- Kohanski M., Dwyer D., Collins J. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8: 423-435
- Kolman J., Gubina M., Škafar C. A. 2006. Sodelovanje Slovenije v projektu EARSS. *Medicinski razgledi*, 152: 3-10
- Kotnik V. 2011. Praktikum iz mikrobiologije in imunologije za študente medicine. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo: 97 – 102
- Krümmerer K. 2009a. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, 75: 417–434
- Krümmerer K. 2009b. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. *Chemosphere*, 75: 435–441
- Laroche E., Petit F., Fournier M., Pawlak B. 2010. Transport of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in a public rural karst water supply. *Journal of Hydrology*, 392, 12–21
- Lepeule R., Leflon-Guibout V., Vanjak D., Zahar J.R., Lafaurie M., Besson C., Lefort A. 2014. Clinical spectrum of urine cultures positive for ESBL-producing *Escherichia coli* in hospitalized patients and impact on antibiotic use. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44: 530–534
- Lin J.K., Mitchell A.A., Yau W-P., Louik C., Hernández-Díaz S. 2013. Safety of macrolides during pregnancy. *American Journal of obstetrics and gynecology*, 208: 221.e1-221.e8
- Lu C., Chuan Y. C., Sun W., Liu Y. C., Chiang P. C., Shi Z. Y., Wang L. S., Kung H. C., Lin H. C., Liao C. H., Liu J. W., Huang C. H., Tsao S. M., Hsueh P. R. 2008. Nationwide surveillance in Taiwan of the *in-vitro* activity of tigecycline against clinical isolates of extended-spectrum b-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32: 179 – 183
- Maal-Bared R., Bartlett K. H., Bowie W. R., Hall E. R. 2013. Phenotypic antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 isolated from water, sediment and biofilms in an agricultural watershed in British Columbia. *Science of the Total Environment*, 443: 315–323
- Maciver S. 2002. The invasion of eukaryotic cells by bacteria: The role of the cytoskeleton. Edinburgh, The University of Edinburgh, Department of Biomedical Sciences: 5 str.
<http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/Bacteria%20Inv.htm> (april, 2015)
- Markou N., Apostolakos N., Koumoudiou C., Athanasiou M., Koutsoukou A., Alamanos I., Gregorakos L. 2003. Intravenous colistin in the treatment of sepsis from

- multiresistant Gram-negative bacilli in critically ill patients. *Journal of Critical Care*, 7, 5: R78 – R83
- Nagy B., Szmolka A., Smole Možina S., Kovač J., Strauss A., Schlager S., Beutlich J., Appel B., Lušický M., Aprikian P., Pászti J., Tóth I., Kugler R., Wagner M. 2013. Virulence and antimicrobial resistance determinants of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and of multidrug-resistant *E. coli* from foods of animal origin illegally imported to the EU by flight passengers. *International Journals of Food Microbiology*, 209: 52 - 59
- NEOGEN. 2009. Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) medium (7692). Lansing MI, Neogen Corporation: 2 str.
www.neogen.com (februar, 2015)
- Osek J., Gallien P., Truszczyński M., Protz D. 1999. The use of polymerase chain reaction for determination of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs in Poland. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 22: 163–174
- Petersen A., Larsen R. A., Skov L.R. 2014. Resistance in human clinical bacteria. V: DANMAP 2013 - Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. Borck Høg B., Korsgaard H., Agersø Y. (eds.). Søborg, Technical University of Denmark: 77 - 92
- Pullukcu H., Tasbakan M., Sipahi O. R., Yamazhan T., Aydemir S., Ulusoy S. 2007. Fosfomycin in the treatment of extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*-related lower urinary tract infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29: 62–65
- Robert Koch Institute. 2011. Report: Final presentation and evaluation of epidemiological findings in the EHEC O104:H4 outbreak, Germany 2011. Berlin, Department for Infectious Disease Epidemiology: 45 str.
- Sabaté M., Prats G., Moreno E., Ballesté E., Blanch A.R., Andre A. 2008. Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. *Research in Microbiology*, 159: 288–293
- Scott L., McGee P., Walsh C., Fanning S., Sweeney T., Blanco J., Karczmarczyk M., Earley B., Leonard N., Sheridan J.J. 2009. Detection of numerous verotoxigenic *E. coli* serotypes, with multiple antibiotic resistance from cattle faeces and soil. *Veterinary Microbiology*, 134: 288–293
- Skočková A., Karpíšková R., Kolářková I., Cupáková Š. 2013. Characteristics of *Escherichia coli* from raw vegetables at a retail market in the Czech Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 167: 196–201

- Smole Možina S., Kurinčič M., Klančnik A., Mavri A. 2011. *Campylobacter* and its multi-resistance in the food chain. Trends in Food Science and Technology, 22: 91 - 98
- Soufi L., Sáenz Y., Vinué L., Abbassi M.S., Ruiz E., Zarazaga M., Hassen A.B., Hammami S., Torres C. 2011. *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. International Journal of Food Microbiology, 144: 497–502
- Stein C. 2004. WHO Initiative to estimate the global burden of foodborne diseases: Factsheet on *E.coli*. Geneva, Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases, World Health Organization: 1 str.
http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/ecoli.pdf (april, 2015)
- Szmolka A., Nagy B. 2013. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. Frontiers in Microbiology, 4: 258, doi: 10.3389/fmicb.2013.00258: 13 str.
- Štrumbelj I., Berce I., Harlander T., Jeverica S., Kavčič M., Kolman J., Lorenčič – Robnik S., Mueller –Premru M., Paragi M., Piltaver Vajdec I., Pirš M., Ribič H., Seme K., Štorman A., Tomič V., Zdolšek B., Žolnir -Dovč M. 2014. Pregled občutljivosti bakterij za antibiotike - Slovenija 2013. 1. izd. Ljubljana, Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ): 32 str.
http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz/dokumenti/skoupz_porocilo_2013.pdf
- Tadesse D.A., Zhao S., Tong E., Ayers S., Singh A., Bartholomew M.J., McDermott F.M. 2012. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950–2002. Emerging Infectious Diseases, 18: doi: 10.3201/eid1805.111153: 9 str.
- Trek Diagnostic Systems. 2015. Sensititre® 18-24 hour MIC and BREAKPOINT susceptibility plates and JustOne® strips: For veterinary use. East Grinstead UK, Thermo Scientific: 12 str.
- Trkov M., Berce I., Dovečar D., Grilc E., Bujko M., Kraigher A. 2008. Odkrivanje nekaterih genov, povezanih z virulenco, pri sevih *E. coli*, ki povzročajo črevesne okužbe. Zdravstveno varstvo, 47: 81-88
- Trkov M., Rupel T., Žgur – Bertok D., Trontelj S., Avguštin G., Ambrožič A. J. 2014. Molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from different food sources. Food Technology and Biotechnology, 52: 255 - 262
- UVHVVR. 2014. Letno poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz 2013. Ljubljana, Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin: 87 str.
- Vukelić D. 2012. Uloga azitromicina u liječenju infekcija uzrokovanih shiga-toksinskom enteroagregacijskom *Escherichia coli* 0104:H4. MEDICUS, 21, 2: 259 – 261

- VURS. 2009. Letno poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz v Sloveniji v letu 2008. Ljubljana, Veterinarska uprava Republike Slovenije, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 67 str.
- VURS. 2010. Letno poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz v Sloveniji v letu 2009. Ljubljana, Veterinarska uprava Republike Slovenije, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 74 str.
- Wieler L.H., Ewers C., Guenther S., Walther B., Lübke-Becker A. 2011. Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in companion animals: Nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples. *International Journal of Medical Microbiology*, 301: 635– 641
- Yang C-C., Huang C-L., Cheng T-C., Ali H.T. 2015. Inhibitory effect of salinity on the photocatalytic degradation of three sulfonamide antibiotics. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 102: 116 - 125
- Zdovc I. 2012. Odpornost proti antibiotikom pri bakterijah živalskega izvora. Zaključno poročilo o rezultatih ciljnega raziskovalnega projekta. Ljubljana, Veterinarska fakulteta: 29 str.

ZAHVALA

Iskrena hvala mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina za prijaznost, nasvete, vzpodbudo in pomoč pri nastajanju magistrske naloge, ter za hitro in natančno popravo magistrskega dela.

Hvala zaposlenim na Oddelku za Mikrobiologijo Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano, ki so mi omogočili delo v njihovem laboratoriju. Hvala mag. Mariji Lušicky, Mojci Šoštarič in Mojci Cimerman za prijaznost in strokovno pomoč v času dela v njihovem laboratoriju.

Hvala prof. dr. Roku Orlu za hitro recenzijo magistrske naloge.

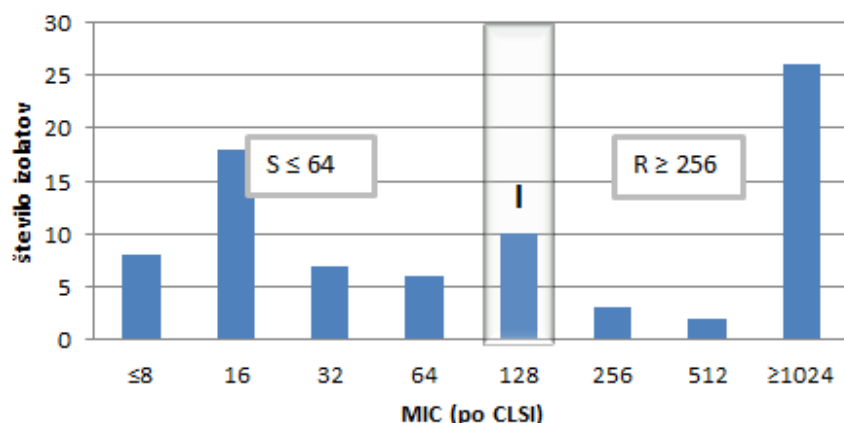
Iskrena hvala moji družini - staršem, ki so mi omogočili študij in me ves čas vzpodbujali, ter sestrama in bratu za razumevanje in podporo.

Hvala prijateljem za doživete trenutke tekom študija. In hvala vsem, ki ste kakorkoli pripomogli k uspešnemu zaključku izdelave magistrske naloge.

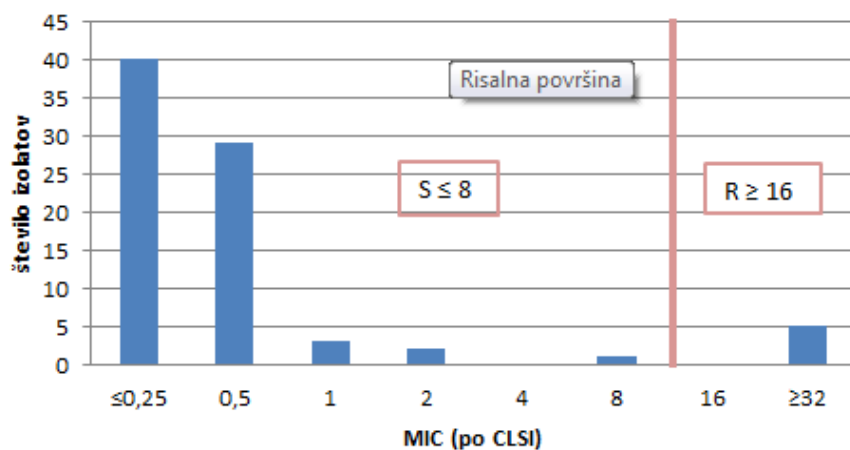
PRILOGA

PRILOGA A: Rezultati protimikrobnih testov vseh osemdesetih vzorcev, za vsak antibiotik, z označenimi območji občutljivosti, zmerne občutljivosti in rezistence.

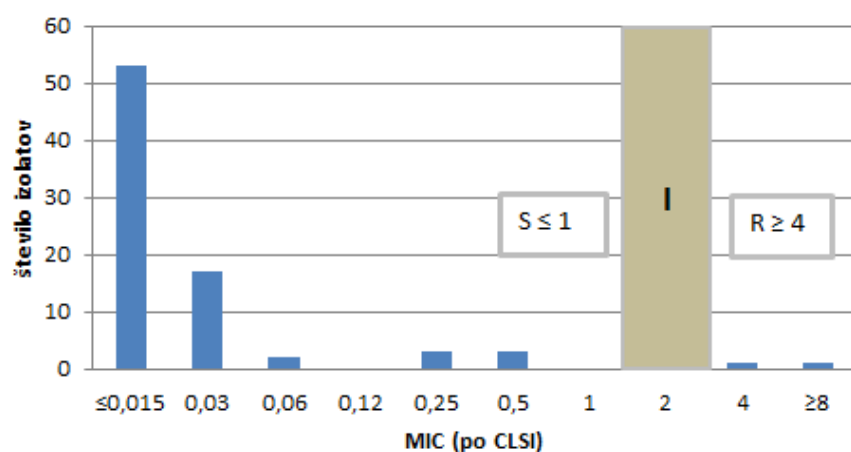
Glede na pridobljene rezultate testiranja protimikrobne odpornosti so spodaj predstavljeni rezultati testov vseh osemdesetih izolatov, ne glede na živilo, za vsak antibiotik posebej. Glede na standarde CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) so predstavljene meje občutljivosti (S), zmerne občutljivosti (I) in odpornosti (R) za vsak antibiotik na katerega smo testirali živila v tej nalogi.



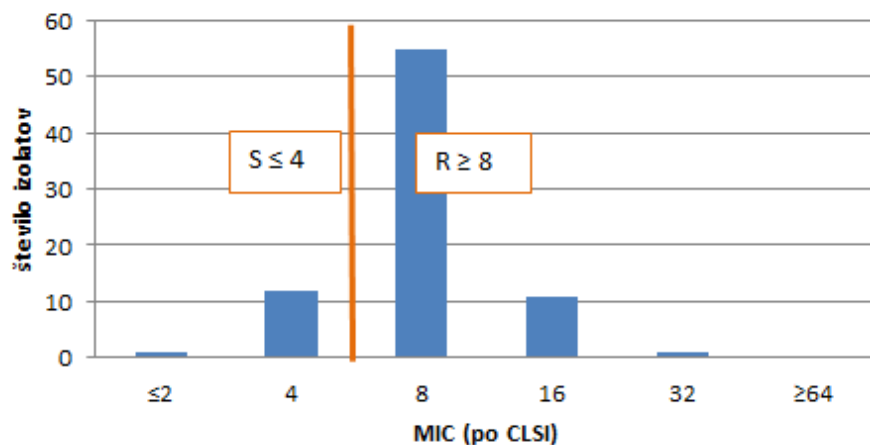
PRILOGA A1: Rezultati protimikrobne odpornosti za sulfametoksazol



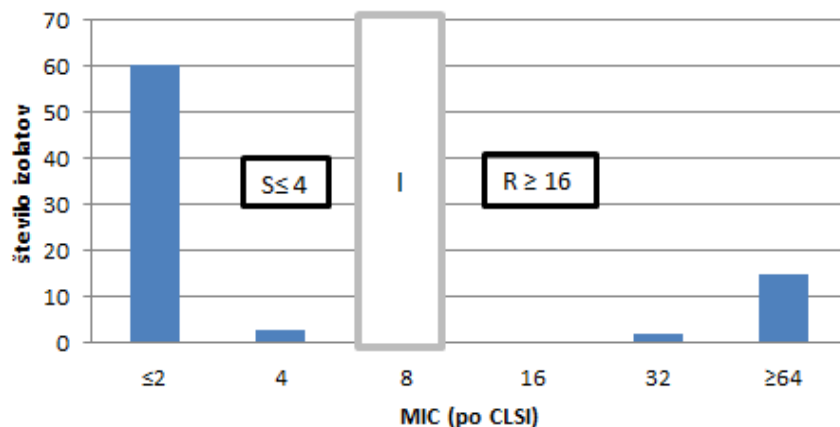
PRILOGA A2: Rezultati protimikrobne odpornosti za trimetoprim



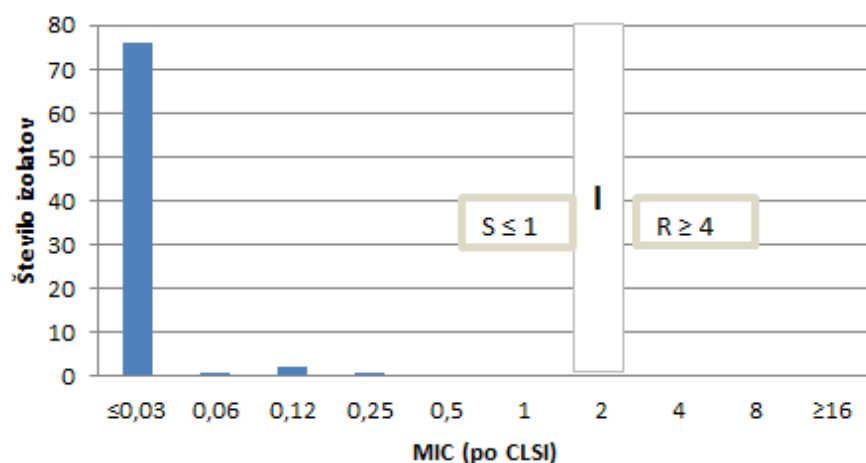
PRILOGA A3: Rezultati protimikrobne odpornosti za ciprofloksacin



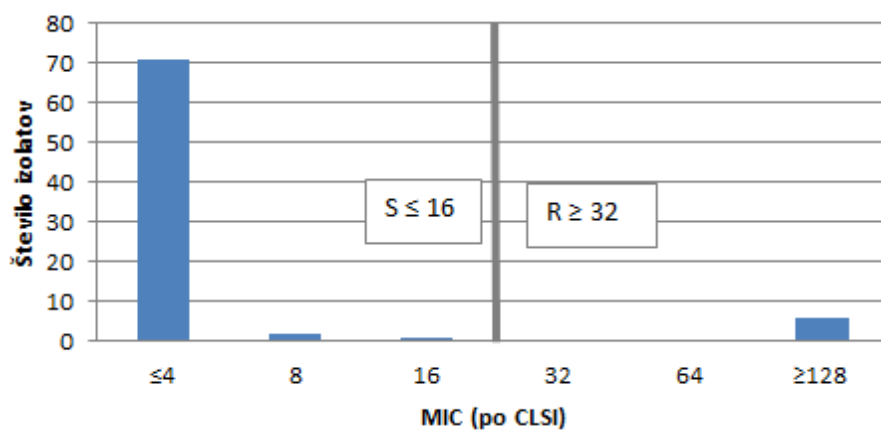
PRILOGA A4: Rezultati protimikrobne odpornosti zaazitromicin



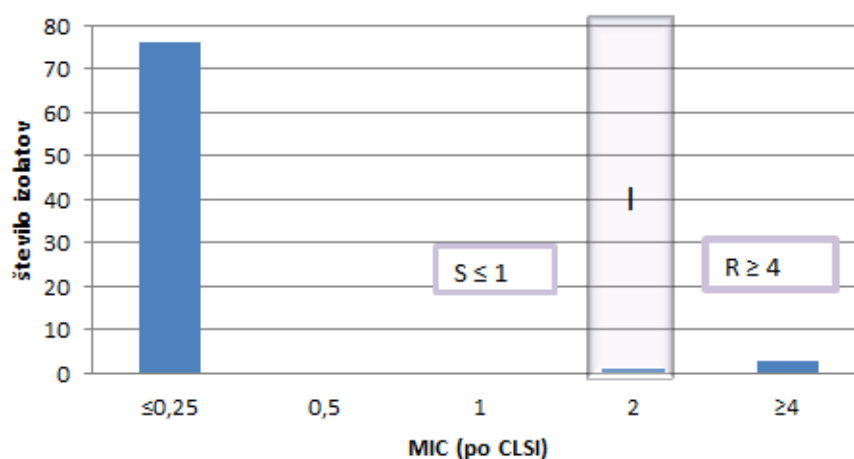
PRILOGA A5: Rezultati protimikrobne odpornosti za tetraciklin



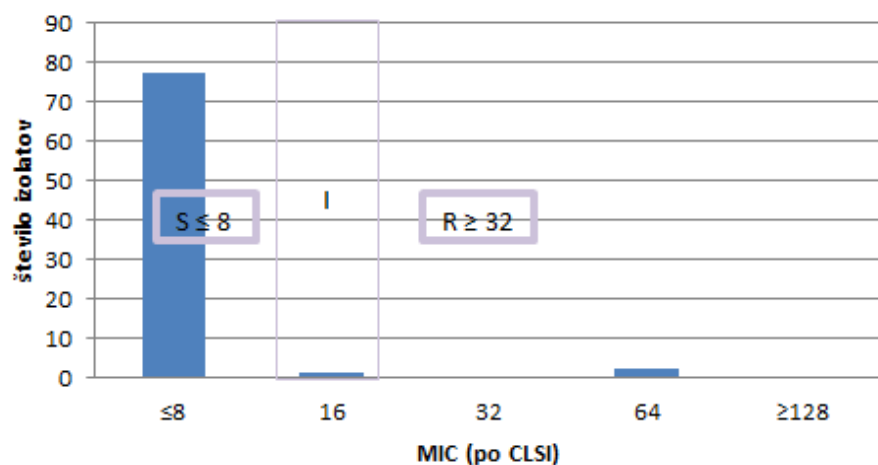
PRILOGA A6: Rezultati protimikrobne odpornosti za meropenem



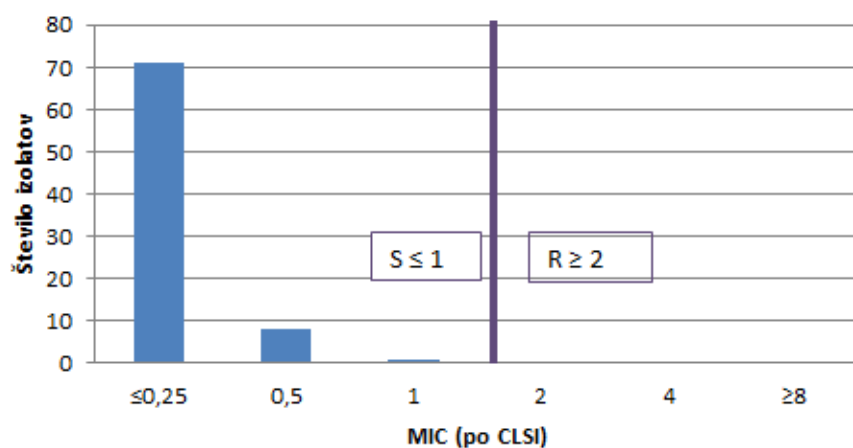
PRILOGA A7: Rezultati protimikrobne odpornosti za nalidiksinsko kislino



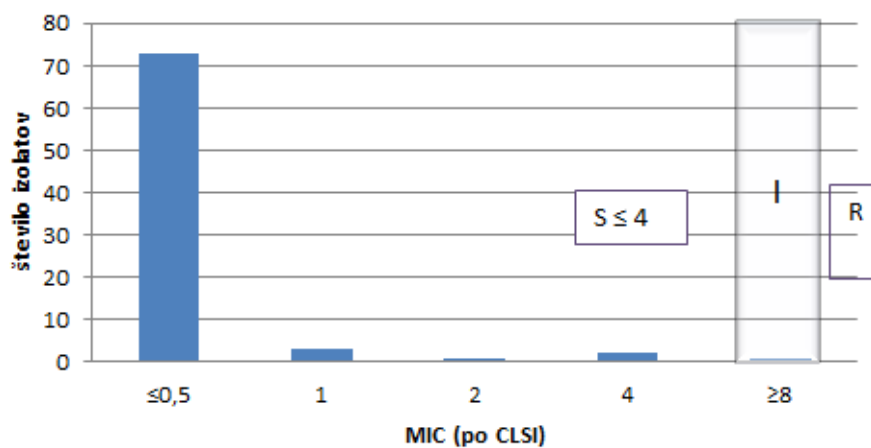
PRILOGA A8: Rezultati protimikrobne odpornosti za cefotaksim



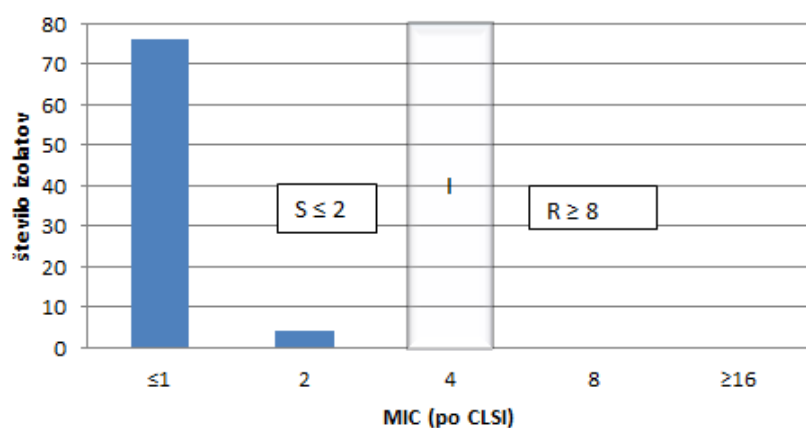
PRILOGA A9: Rezultati protimikrobne odpornosti za kloramfenikol



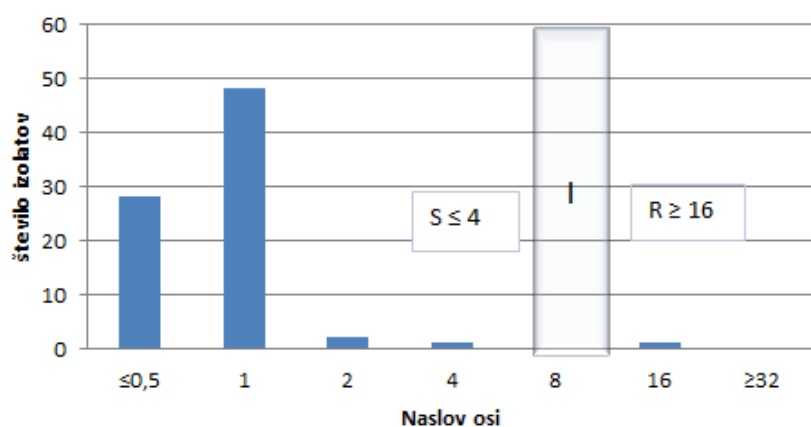
PRILOGA A10: Rezultati protimikrobne odpornosti za tigeciklin



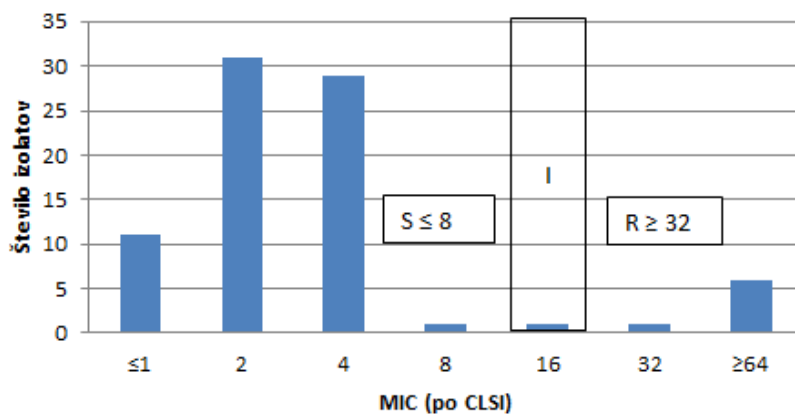
PRILOGA A11: Rezultati protimikrobne odpornosti za ceftazidim



PRILOGA A12: Rezultati protimikrobne odpornosti za kolistin



PRILOGA A13: Rezultati protimikrobne odpornosti za gentamicin



PRILOGA A14: Rezultati protimikrobne odpornosti za ampicilin