



Interdisciplinarni doktorski študijski program Biomedicina
veterinarska medicina

UDK 579.67:579.842.1/.2:615.33:615.015.8:577.21:57.083.1(043.3)

Manja Križman, dr. vet. med.

**RAZŠIRJENOST IN GENOTIPIZACIJA SEVOV *E. COLI* Z
ODPORNOSTJO PROTI BETALAKTAMSKIM
ANTIBIOTIKOM IN FLUOROKINOLONOM V ŽIVILIH
ŽIVALSKEGA IZVORA**

Doktorska disertacija

**PREVALENCE AND GENOTYPING OF *E. COLI* STRAINS
RESISTANT TO BETA-LACTAM ANTIBIOTICS AND
FLUOROQUINOLONES IN FOOD OF ANIMAL ORIGIN**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2017

Manja Križman

Razširjenost in genotipizacija sevov *E. coli* z odpornostjo proti betalaktamskim antibiotikom in fluorokinolonom v živilih živalskega izvora

Delo je bilo opravljeno na Enoti za varno hrano, na Inštitutu za varno hrano, krmo in okolje, Veterinarske fakultete v Ljubljani, na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani in v laboratoriju Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentor: prof. dr. Andrej Kirbiš

Somentor: doc. dr. Irena Zdovc

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednik: viš. znan. sod. dr. Brane Krt

Član: prof. dr. Olga Zorman Rojs

Član: doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin (BF, oddelek za biologijo)

"The most effective way to do it, **I S T O D O I T ."**

Amdia Earhart

IZVLEČEK

Ključne besede: Hrana, mikrobiologija; *Escherichia coli* – encimologija – izolacija in čiščenje – genetika; betalaktamaze - analiza; betalaktamska odpornost; kinoloni – farmakologija; zdravila, rezistenca mikrobna; mikrobni občutljivostni testi; dejavniki virulence; filogeneza

Bakterija *Escherichia coli* je del običajne črevesne mikrobiote ljudi in toplokrvnih živali. Izolati, ki nosijo zapise za specifične dejavnike virulence, lahko povzročajo črevesne ali zunajčrevesne bolezni. Zdravljenje slednjih v zadnjem času postaja težavno, včasih tudi neuspešno, zaradi povečevanja števila izolatov z razširjenim spektrom betalaktamaz – ESBL. Živila živalskega izvora so lahko vir odpornih in patogenih izolatov bakterije *E. coli*, ki v prehransko verigo vstopajo med obdelavo in predelavo živil. V naši raziskavi smo pregledali 245 izolatov *E. coli* iz živil živalskega izvora na prisotnost encimov ESBL in genov za dejavnike virulence. Izolate *E. coli* iz mesa in mesnih izdelkov, mleka in mlečnih izdelkov ter jajc smo pregledali na odpornost proti 22 protimikrobnim snovem z disk difuzijsko metodo. Izolate *E. coli* iz školjk in črevesja ljudi smo testirali na odpornost proti 14 protimikrobnim snovem z mikrodilucijsko metodo. Za prisotnost ESBL sumljivih izolatov smo uporabili metodo z dvojnim diskom po Kirby-Bauerju. Za fenotipsko potrditev smo uporabili test s kombinacijo diskov in mikrodilucijsko metodo. S PCR smo pomnoževali gene za encime ESBL, iz skupin TEM-1b, SHV in CTX-M in PMQR, kot so *qnrA*, *qnrB* in *qnrS*. Prav tako smo s PCR razdelili izolate *E. coli* v filogenetske (pod)skupine in preverjali prisotnost genov za različne dejavnike virulence. Iz 526 vzorcev živil živalskega izvora, odvzetih konec leta 2010 in leta 2011, smo izolirali 245 sevov *E. coli*. Med njimi je bilo 16 (6,5 %) ESBL pozitivnih izolatov bakterij *E. coli*, vsi so bili odporni proti cefotaksimu in/ali cefpodoksimu. Od 16 ESBL pozitivnih izolatov jih je bilo 15 (93,8 %) fenotipsko odpornih tudi proti sulfonamidom, 11 (68,8 %) proti aminoglikozidom, 9 (56,3 %) proti tetraciklinom in 6 (37,5 %) proti kinolonom. Iсти izolati so imeli hkrati tudi različne gene za dejavnike virulence. V raziskavi smo potrdili prisotnost odpornih in potencialno patogenih sevov *E. coli* v živilih živalskega izvora. Rezultati kažejo, da je uživanje surovih ali nezadostno topotno obdelanih izdelkov lahko zdravju škodljivo.

ABSTRACT

Key words: Food microbiology; *Escherichia coli* – enzymology – isolation and purification – genetics; beta-lactamases – analysis; beta-lactam resistance; quinolones – pharmacology; drug resistance, microbial; microbial sensitivity tests; virulence factors; phylogeny

Escherichia coli are a part of the normal gut microbiota of humans and warm-blooded animals. Strains encoding specific virulence factors can cause either intestinal or extraintestinal infections. The treatment of the later has recently become difficult and sometimes unsuccessful due to increasing number of extended spectrum betalactamases – ESBL producing isolates. Food of animal origin can been a possible source of antibiotic resistant and pathogenic *E. coli* strains, which enter the food chain during slaughter or food manipulation. We screened 245 *E. coli* isolates from the food of animal origin for the presence of ESBL enzymes and virulence genes. *E. coli* isolates from meat and meat products, milk and milk products, and eggs were tested for susceptibility to 22 antibiotics by the disc diffusion method. *E. coli* isolates from sea shells and human intestinal tract were tested with microdilution method for susceptibility to 14 antibiotics. ESBLs were detected using the primary double-disk by Kirby-Bauer method, for phenotypically confirmatory methods we used method with combination of disks and microdilution method. We used specific PCR to study the presence of genes encoding TEM-1b, SHV and CTX-M group ESBL and PMQR, like *qnrA*, *qnrB* and *qnrS*. Also by using PCR we classified isolates into phylogenetic groups and subgroups. We analyzed *E. coli* strains for the presence of various virulence genes. From 526 food samples taken in the end of year 2010 and in 2011, we recovered 245 strains of *E. coli*. ESBL *E. coli* isolates were detected in 16 (6.5%) samples; all of them were resistant to cefotaxime and/or cefpodoxime. In 16 ESBL positive isolates 15 (93.8%) exhibited a resistant phenotype also to sulfonamides, 11 (68.8%) to aminoglycosides, 9 (56.3%) to tetracyclines and 6 (37.5%) to quinolones. Same *E. coli* strains had several different virulence factors. In our research we found resistant and potentially pathogen strains of *E. coli* in food of animal origin therefore raw or undercooked food can be potentially harm fool for human health.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD	21
1.1 NAMEN DELA	21
1.2 HIPOTEZE	22
2 PREGLED LITERATURE	23
2.1 PROTIMIKROBNE UČINKOVINE	23
2.1.1 Betalaktamski antibiotiki	24
2.1.2 Kinoloni.....	25
2.2 ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM	27
2.2.1 Odpornost proti betalaktamskim antibiotikom	27
2.2.2 Odpornost proti kinolonom.....	30
2.2.2.1 PMQR – <i>qnr</i>	30
2.3 ŽIVILA	31
2.4 BAKTERIJA <i>Escherichia coli</i>	32
2.4.1 Delitev glede na patogenost in mesto povzročanja okužb	32
2.4.1.1 Črevesni sevi <i>E. coli</i> (IPEC).....	34
2.4.1.2 Zunajčrevesni sevi <i>E. coli</i> (ExPEC)	35
2.4.2 Delitev v filogenetske (pod)skupine po Clermontu	35
2.5 VIRULENTNI DEJAVNIKI	36
2.5.1 Adhezini.....	37
2.5.1.1 Fimbrije tipa 1	37

2.5.1.2 P-fimbrije.....	37
2.5.1.3 Protein intimin	38
2.5.1.4 Curlijeva vlakna.....	38
2.5.1.5 Nefimbrijski adhezini Iha in Hra	39
2.5.2 Avtotransporterji in toksini.....	39
2.5.2.1 Enterohemolizin	39
2.5.2.2 Citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1 (CNF1) in citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 2 (CNF2).....	40
2.5.2.3 Avtotransporterski toksini	40
2.5.2.4 Verotoksini	41
2.5.2.5 Toplotno stabilni enterotoksini	41
2.5.3 Dejavniki, povezani z imunskim sistemom	42
2.5.3.1 KpsMTII	42
2.5.3.2 OmpT _A	43
2.5.3.3 TraT	43
2.5.3.4 Iss.....	44
2.5.3.5 Tcp	44
2.5.4 Mehanizmi za privzem železa.....	44
2.5.4.1 Aerobaktin	45
2.5.4.2 Siderofor	45
2.5.4.3 Jersiniabaktin	45

2.5.5 Mikrocin V	46
2.5.6 Nespecifične nukleaze – genotoksini	46
2.5.6.1 Usp.....	46
2.6 SEKVENČNA SKUPINA ST131	47
3 MATERIAL IN METODE	48
3.1 BAKTERIJSKI IZOLATI	48
3.1.1 Izolati <i>E. coli</i> iz živil živalskega izvora	48
3.1.2 Humani bakterijski izolati za ESBL pozitivne <i>E. coli</i> (klinični izolati).....	50
3.1.3 Humani črevesni izolati <i>E. coli</i> (klinični izolati).....	50
3.2 GOJIŠČA in PUFRI.....	51
3.2.1 Priprava fiziološke raztopine (FR)	51
3.2.2 Priprava peptonske vode (pH = 7,0 ± 0,2) (PV).....	51
3.2.3. Priprava gojišča MMMB (Minerals Modified Glutamate Medium Base).....	51
3.2.4 Priprava gojišča TBX (Tryptone Bile X-Glucuronide Agar).....	51
3.2.5 ChromID ESBL agar	52
3.2.6 Krvni agar (KA)	52
3.2.7 Gojišče Mueller-Hinton (MH).....	52
3.2.8 Etilendiamintetraocetna kislina (angl. Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)	52
3.2.9 Pufer 5 X tris/borat/EDTA (angl. Tris/borate/EDTA, TBE)	52
3.2.10 NaOH (natrijev hidroksid)	52

3.3 PRIBOR IN OPREMA	53
3.4 FENOTIPSKE METODE.....	54
3.4.1 Izolacija in identifikacija sevov	54
3.4.2 Fenotipsko dokazovanje ESBL <i>E. coli</i>	56
3.4.2.1 Antibiogram z disk difuzijsko metodo	56
3.4.2.2 Primarni test z dvojnim diskom (CLSI)	57
3.4.2.3 Potrditvena metoda s kombinacijo diskov (CLSI)	57
3.4.2.4 Potrditvena metoda z antibiotičnimi trakovi (Etest).....	58
3.4.2.5 Potrditveni test z mikrodilucijsko metodo (minimalna inhibitorna koncentracija, MIC).....	58
3.4.2.6 Antibiogram po mikrodilucijski metodi za določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)	60
3.5 GENOTIPSKE METODE	61
3.5.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	61
3.5.1.1 Priprava vzorčne DNA bakterijskega lizata	61
3.5.1.2 Začetni oligonukleotidi in razmere za pomnoževanje z reakcijo PCR.....	61
3.5.1.3 Sestava reakcijskih mešanic za PCR	69
3.5.2 Agarozna gelska elektroforeza.....	70
3.5.3 Čiščenje fragmentov, dobljenih z reakcijo PCR, in ugotavljanje nukleotidnega zaporedja	71
3.6.3 Statistične metode.....	72

4 REZULTATI.....	73
4.1 IZOLACIJA <i>E. coli</i> IZ ŽIVIL ŽIVALSKEGA IZVORA	73
4.2 DOKAZOVANJE <i>E. coli</i> z ESBL iz živil živalskega izvora	74
4.3 REZULTATI TESTIRANJA IZOLATOV <i>E. coli</i> IZ ŽIVIL ŽIVALSKEGA IZVORA GLEDE OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE	75
4.3.1 Občutljivost izolatov <i>E. coli</i>, testiranih z disk difuzijsko metodo.....	75
4.3.2 Antibiogram po mikrodilucijski metodi.....	78
4.4 UGOTAVLJANJE GENOV, KI DOLOČAJO VRSTO ENCIMOV ESBL	81
4.5 UGOTAVLJANJE GENOV ZA PLAZMIDNO POSREDOVANO ODPORNOST PROTI KINOLONOM (PMQR)	83
4.6 FILOGENETSKE (POD)SKUPINE	84
4.7 GENOTIPIZACIJA IZOLATOV <i>E. coli</i> IZ ŽIVIL ŽIVALSKEGA IZVORA	86
4.8 PRIMERJAVA GENOTIPOV ESBL POZITIVNIH <i>E. coli</i> IZ ŽIVIL ŽIVALSKEGA IZVORA, IZOLATOV IZ SPODNJIH DIHALNIH POTI IN UROPATOGENIH IZOLATOV.....	90
4.8.1 Statistična obdelava rezultatov ESBL pozitivnih izolatov <i>E. coli</i> iz živil živalskega izvora v primerjavi z humanimi ESBL pozitivnimi izolati.....	91
4.9 PRIMERJAVA GENOTIPOV IZOLATOV <i>E. coli</i> IZ ŽIVIL ŽIVALSKEGA IZVORA IN HUMANIH ČREVESNIH IZOLATOV.....	92
4.9.1 Statistična obdelava rezultatov izolatov <i>E. coli</i> iz živil živalskega izvora v primerjavi z humanimi črevesnimi izolati	94
4.10 DOLOČANJE SEKVENČNE SKUPINE ST131.....	95

4.10.1 Določanje sekvenčne skupine ST131 pri ESBL pozitivnih izolatih <i>E. coli</i> iz živil živalskega izvora	95
4.10.2 Določanje sekvenčne skupine ST131 pri ESBL pozitivnih izolatih <i>E. coli</i> pri kliničnih uropatogenih izolatih izoliranimi pri ljudeh	96
4.10.3 Določanje sekvenčne skupine ST131 pri ESBL pozitivnih izolatih <i>E. coli</i> iz spodnjih dihalnih poti.....	98
5 RAZPRAVA.....	99
6 ZAKLJUČKI	111
7 POVZETEK.....	113
8 SUMMARY.....	116
9 ZAHVALE	119
10 LITERATURA	121
11 PRILOGE.....	135

KAZALO SLIK

Slika 1: Alexander Fleming je odkril penicilin, prvi naravni antibiotik, leta 1928.....	23
Figure 1: Alexander Fleming discovered penicillin, the first natural antibiotic, in 1928.....	23
Slika 2: Živila	31
Figure 2: Food	31
Slika 3: <i>Escherichia coli</i>	32
Figure 3: <i>Escherichia coli</i>	32
Slika 4: Zalivanje vzorca s tekočim predobogatitvenim gojiščem PV.....	55
Figure 4: Enriching sample with enrichment medium PV	55
Slika 5: Presajanje iz tekočega predobogatitvenega gojišča PV na trdno selektivno gojišče TBX.....	55
Figure 5: Subculturing from enrichment medium PV to a TBX plate	55
Slika 6: Modrozelene kolonije na selektivnem gojišču TBX	55
Figure 6: Blue green colonies on selective TBX agar plate	55
Slika 7: Rdečerjave kolonije na selektivnem gojišču ChromID ESBL agar	55
Figure 7: Red brown colonies on selective ChromID ESBL agar plate.....	55
Slika 8: Etest. Na levem koncu je trak prepojen s cefalosporinom, na desnem pa s cefalosporinom v kombinaciji s klavulansko kislino	58
Figure 8: Etest. On the left side the strip is soped with cephalosporin and on the right with cephalosporin in combination with clavulanic acid	58
Slika 9: Umerjanje gostote bakterijske suspenzije z metoda po McFarlandu	60
Figure 9: Density moderation of bacterial suspension by McFarland method.....	60

Slika 10: Mikrotitrtska plošča ESB1F	60
Figure 10: Microtiter plate ESB1F	60
Slika 11: Število izolatov <i>E. coli</i> iz živil živalskega izvora, odpornih proti določenim skupinam antibiotikov.....	77
Figure 11: Number of <i>E. coli</i> isolates from food of animal origin resistant to different group of antibiotics	77
Slika 12: Porazdelitev ESBL pozitivnih izolatov <i>E. coli</i> iz živil živalskega izvora v skupine CTX-M, SHV, TEM ter CMY-2 (AmpC	81
Figure 12: Distribution of ESBL – positive <i>E. coli</i> isolates from food of animal origin among groups CTX-M, SHV, TEM and CMY-2 (AmpC	81
Slika 13: Primerjava ESBL pozitivnih izolatov <i>E. coli</i> iz živil živalskega izvora, s kliničnimi sevi izoliranimi pri ljudeh iz spodnjih dihalnih poti in urogenitalnega trakta.....	82
Figure 13: Comparison of ESBL – positive <i>E. coli</i> isolates among food of animal origin and human clinical isolates from respiratory and urogenital tract	82
Slika 14: Primerjava prisotnosti genov za PMQR med izolati iz živil in človeškimi kliničnimi izolati iz spodnjih dihalnih poti, urogenitalnega in črevesnega trakta	84
Figure 14: Comparing of presence of genes for PMQR between isolates from food with human clinical isolates from lower respiratory, urogenital and intestinal tract.....	84
Slika 15: Pojav in prenos odpornih bakterij med ljudmi, živalmi in hrano.....	109
Figure 15: The occurrence and transfer of resistant bacteria via humans, animals and foodstuffs	109

KAZALO TABEL

Tabela 1: Skupine betalaktamov in njihovi predstavniki	25
Table 1: Groups of beta-lactam antibiotics and their representatives	25
Tabela 2: Generacije kinolonov, predstavniki, klinična uporaba in delovanje	26
Table 2: Generations of quinolones, members, clinical use and antimicrobial spectrum	26
Tabela 3: Klasifikacijska shema betalaktamaz.....	28
Table 3: Beta-lactamases classification sheme.....	28
Tabela 4: Patogeni tipi <i>E. coli</i>	33
Table 4: <i>E. coli</i> pathogenic types.....	33
Tabela 5: Razdelitev v filogenetske (pod)skupine	36
Table 5: Phylogenetic distribution in (sub)groups	36
Tabela 6: Seznam analiziranih vzorcev živil živalskega izvora	48
Table 6: List of samples of animal origin analyzed in this study	48
Tabela 7: Razpored antibiotikov na mikrotitrski plošči ESB1F (Treck Diagnostic Systems, Velika Britanija) za fenotipsko potrditev sevov ESBL	59
Table 7: Antibiotic distribution on microtiter plate formate ESB1F (Treck Diagnostic Systems, Great Britain) for phenotypic conformation of ESBL strains	59
Tabela 8: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri reakciji PCR, njihovo nukleotidno zaporedje, razmere pomnoževanja, pričakovana velikost pomnožka PCR in referenca.....	61
Table 8: Primers used in PCR reaction, primers, conditions, product size and references	61
Tabela 9: Seznam v raziskavo vključenih sevov <i>E. coli</i> iz živil živalskega izvora.....	73

Table 9: List of <i>E. coli</i> strains isolated from food of animal origin included in this study	73
Tabela 10: Fenotipsko pozitivni ESBL/AmpC izolati <i>E. coli</i> iz živil živalskega izvora	75
Table 10: Phenotypical positive ESBL/AmpC <i>E. coli</i> isolates from food of animal origin.....	75
Tabela 11: Distribucija MIC za indikatorske seve <i>E. coli</i> , izolirane iz školjk (n=72).....	79
Table 11: Distribution of MICs for <i>E. coli</i> strains, isolated from sea shells (n=72).....	79
Tabela 12: Distribucija MIC za indikatorske seve <i>E. coli</i> , izolirane iz fecesa ljudi – klinični vzorci (n=55	80
Table 12: Distribution of MICs for <i>E. coli</i> strains, isolated from human feces – clinical samples (n=55	80
Tabela 13: Uvrstitev živilskih izolatov <i>E. coli</i> v filogenetske (pod)skupine	85
Table 13: Assigment of food <i>E. coli</i> isolates to phylogenetic (sub)groups.....	85
Tabela 14: Primerjava sevov <i>E. coli</i> , izoliranih iz živil in kliničnih vzorcev iz črevesja ljudi	85
Table 14: Comparison of <i>E. coli</i> strains, isolated from food and human clinical intestinal samples.....	85
Tabela 15: Primerjava ESBL pozitivnih izolatov iz živil in humanih kliničnih vzorcev.....	86
Table 15: Comparison of ESBL – positive isolates from food and human clinical samples	86
Tabela 16: Prevalenca genov za dejavnike virulence	87
Table 16: Prevalence of genes for virulence factors.....	87
Tabela 17: Porazdelitev genov za dejavnike virulence glede na filogenetsko (pod)skupino	88

Table 17: Distribution of virulence factors according to phylogenetic (sub)groups	88
Tabela 18: Primerjava dejavnikov virulence med ESBL pozitivnimi izolati <i>E. coli</i>	90
Table 18: Comparing virulence factors between ESBL – positive <i>E. coli</i> isolates	90
Tabela 19: Statistična primerjava ESBL pozitivnih izolatov <i>E. coli</i> med živili živalskega izvora in humanimi kliničnimi izolati.....	92
Table 19: Statistical comparison between ESBL positive <i>E. coli</i> isolates from food of animal origin and human clinical isolates	92
Tabela 20: Primerjava dejavnikov virulence med izolati <i>E. coli</i> iz živil in kliničnimi črevesnimi izolati izoliranimi pri ljudeh.....	93
Table 20: Comparing virulence factors between <i>E. coli</i> isolates from food and human clinical intestinal isolates	93
Tabela 21: Statistična primerjava <i>E. coli</i> izolatov iz živil živalskega izvora z izolati <i>E. coli</i> izoliranimi pri ljudeh z diarejo	94
Table 21: statistical comparison between <i>E. coli</i> isolates from food of animal origin and <i>E. coli</i> isolates from humans with diarrhea.....	94
Tabela 22: Kombinacije alelov dveh »gospodinjskih« genov in gena <i>O25</i> za 22 testiranih živilskih izolatov.....	95
Table 22: Combination of two housekeeping genes and gen <i>O25</i> for 22 tested food isolates	95
Tabela 23: Analiza uropatogenih izolatov za sekvenčno skupino ST131	96
Table 23: Analysis of uropathogen isolates for sequence group ST131	96
Tabela 24: Kombinacije alelov sedmih »gospodinjskih« genov in sekvenčna skupina (ST) za 6 izolatov, uporabljenih za primerjavo z živilskimi izolati.....	98
Table 24: Combination of alels of seven housekeeping genes and sequences types (ST) for 6 isolates, used for comparison with food isolates	98

SEZNAM OKRAJŠAV

AAF	fimbrije za agregativno vezavo (angl. aggregative adherence fimbria)
AIDA	adhezin, vključen v difuzno adherence (angl. adhesin involved in diffuse adherence)
AIEC	adherentno invazivni sevi <i>Escherichia coli</i> (angl. adherent invasive <i>E. coli</i>)
APEC	sevi <i>E. coli</i> , patogeni za ptice (angl. avian pathogenic <i>E. coli</i>)
Arg	arginin (angl. Arginine)
BSBL	betalaktamaze širokega spectra (angl. broad spectrum beta-lactamase)
CA	klavulanska kislina (angl. clavulanic acid)
CFA	antigen kolonizacijskega faktorja (angl. colonization factor antigen)
CLSI	angl. clinical and laboratory standards institute
CNF1	citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1 (angl. cytotoxic necrotizing factor 1)
CNF2	citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 2 (angl. cytotoxic necrotizing factor 2)
cGMP	ciklični gvanozin monofosfat (angl. cyclic guanosine monophosphate)
csg	gen za podenoto curlina (angl. curlin subunit gene)
DAEC	difuzno adherentni sevi <i>Escherichia coli</i> (angl. diffusely adherent <i>E. coli</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid, DNA)
EAEC	enteroagregativni sevi <i>Escherichia coli</i> (angl. enteroaggregative <i>E. coli</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (angl. Ethylenediaminetetraacetic acid)
EHEC	enterohemoragični sevi <i>Escherichia coli</i> (angl. enterohaemorrhagic <i>E. coli</i>)
EIEC	enteroinvazivni sevi <i>Escherichia coli</i> (angl. enteroinvasive <i>E. coli</i>)
EPEC	enteropatogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (angl. enteropathogenic <i>E. coli</i>)
ESBL	betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja (angl. extended-spectrum beta-lactamase)
ESVAC	Evropska agencija za uporabo antibiotikov v veterinarski medicini (angl. European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption)
ETEC	enterotoksigeni sevi <i>Escherichia coli</i> (angl. enterotoxigenic <i>E. coli</i>)
ExPEC	zunajčrevesni patogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (angl. extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i>)
hbp	hemoglobin vezoviči protein (angl. hemoglobine-biding protein)

HIV	human virus imunske pomanjkljivosti (angl. human immunodeficiency virus)
<i>hra</i>	toplotočno stabilni aglutinin (angl. heat-resistant agglutinin)
HPI	otok z visoko patogenostjo (angl. high pathogenicity island)
HUS	hemolitično-uremični sindrom (angl. haemolytic-uraemic syndrome)
IPEC	črevesni patogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (angl. intestinal pathogenic <i>E. coli</i>)
<i>iss</i>	povečana odpornost proti serumu (angl. increased serum survival)
<i>iuc</i>	sistem povezan s privzemom železa (angl. iron uptake chelate)
<i>iut</i>	sistem povezan s privzemom železa (angl. iron uptake transport)
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LT	toplotočno nestabilen (angl. heat-labile)
Lys	lizin (angl. Lysine)
MAC	angl. membrane attack complex
MDR	večkratno odporne (angl. multi drug resistant)
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (angl. minimum inhibitory concentration)
MLST	tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (angl. multilocus sequence typing)
MMMB	angl. Minerals Modified Glutamate Medium Base
NMEC	sevi <i>Escherichia coli</i> , ki povzročajo meningitis pri novorojenčkih (angl. neonatal meningitis <i>E. coli</i>)
PAI	otok patogenosti (angl. pathogenicity island)
PBP	penicillin vezorce beljakovine (angl. penicillin-binding proteins)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PMQR	plazmidno kodirana odpornost proti kinolonom (angl. plasmid mediated quinolone resistance)
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina (angl. ribosomal ribonucleic acid, rRNA)
RTE	izdelki namenjeni za neposredno uporabo (angl. ready to eat)
<i>sat</i>	avtotransporterski toksin, ki se izloča (angl. secreted autotransporter toxin)
<i>S. dysenteriae</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
SHV	sulphydryl variable (skupina betalaktamov)
ST	toplotočno stabilni (angl. heat-stable)
ST131	sekvenčni tip 131 (angl. sequence type 131)

STa	topltno stabilni enterotoksin a (angl. heat-stable enterotoxin a)
STb	topltno stabilni enterotoksin b (angl. heat-stable enterotoxin b)
<i>tcp</i>	protein, ki ima domenco TIR (angl. TIR domain containing protein)
TEM	Temoneira (oseba po kateri se imenuje skupina betalaktamov)
TIR	receptorska domena za toll/interleukin (angl. toll/interleukin – 1 receptor domain)
TLR	tolu podobni receptorji (angl. toll – like receptor)
TZB	tazobaktam (angl. tazobactam)
UPEC	uropatogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (angl. uropathogenic <i>E. coli</i>)
<i>usp</i>	angl. uropathogenic specific protein
UTI	vnetje urinarnega trakta (angl. urinary tract infection)
<i>vat</i>	avtotransporterski toksin, ki povzroča vakuolizacijo (angl. vaccuolating autotransporter toxin)
VT	verotoksin (angl. verotoxin)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (angl. world health organization)
ZZUZIS	Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili

1 UVOD

Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) je običajni del črevesne mikrobiote ljudi in toplokrvnih živali. Večina sevov *E. coli* je komenzalnih, nekateri pa nosijo v svojem genomu številne zapise za virulentne dejavnike, kot so adhezini, avtotransporterji in toksini, dejavnike za izogibanje imunskemu sistemu gostitelja in odpornost proti serumu ter sistem za privzem žeze. Taki sevi so potencialno patogeni in lahko povzročajo črevesne in zunajčrevesne okužbe (Montville in sod., 2012). Živila so najpogostejši vir vnosa tako nepatogenih kot patogenih *E. coli*, ki so hkrati indikator fekalne kontaminacije v živilih živalskega izvora.

Zdravljenje zunajčrevesnih okužb, ki jih povzročajo sevi vrste *E. coli*, poteka s pomočjo protimikrobnih zdravil (v nadaljevanju antibiotikov). Najpogostejša izbira so trimetoprim s sulfametoksazolom ali brez njega in fluorokinoloni. Za zdravljenje okužb zgornjih sečil lahko uporabljamo tudi cefalosporine 2. in 3. generacije (Lindič, 2003).

Dolgotrajna in pogosto tudi neupravičena raba protimikrobnih zdravil v humani in veterinarski medicini je privedla do pridobljene odpornosti bakterij proti različnim skupinam antibiotikov (Livermore, 2009). Eden izmed pomembnih mehanizmov odpornosti je tvorba encimov za razgradnjo antibiotikov, geni za te encime pa se največkrat nahajajo na mobilnih genetskih elementih, kot so plazmidi. V skupino bakterij, ki v zadnjih letih povzročajo največ težav v javnem zdravstvu, uvrščamo bakterije, ki izločajo betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja (angl. extended spectrum beta-lactamase, ESBL) in/ali AmpC ter imajo mehanizme za odpornost proti kinolonom. Encime pogosto izločajo po Gramu negativne bakterije, najpogosteje iz družine *Enterobacteriaceae*, predvsem *E. coli* in *Klebsiella pneumoniae* (Arslan in Özdamir, 2009).

1.1 NAMEN DELA

V okviru doktorske naloge smo preverili prisotnost bakterij vrste *E. coli*, ki so odporne proti betalaktamskim antibiotikom in fluorokinolonom, v živilih živalskega izvora.

Namen dela je bil določiti fenotipske in genotipske lastnosti *E. coli*, ki so bile izolirane iz živil živalskega izvora na Enoti za varno hrano, na Inštitutu za varno hrano, krmo in okolje,

Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Gre za analiziranje oziroma ugotavljanje njihove odpornosti proti različnim protimikrobnim zdravilom, razvrstitev v t. i. filogenetske skupine in ugotavljanje prisotnosti različnih virulentnih dejavnikov.

Da smo potrdili oziroma ovrgli postavljene hipoteze smo primerjali seve *E. coli*, izoliranih iz živil živalskega izvora, z ESBL pozitivnimi sevi, izoliranimi iz spodnjih dihal in urogenitalnega trakta ljudi, ter sevi *E. coli*, izoliranimi iz črevesja ljudi, ki so imeli težave z driskami.

1.2 HIPOTEZE

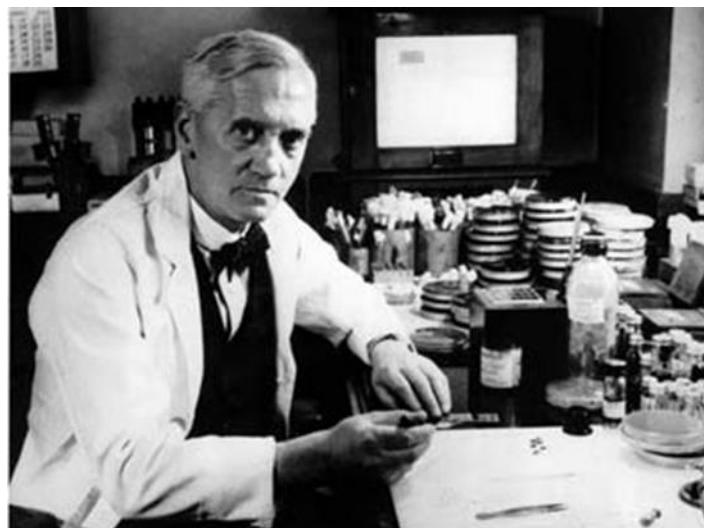
Z raziskavo smo poskušali potrditi naslednje hipoteze:

1. Iz živil živalskega izvora lahko izoliramo seve *E. coli*, ki so odporni proti betalaktamskim antibiotikom in kinolonom.
2. Odporni sevi *E. coli* iz živil živalskega izvora imajo podobno kot klinični sevi enega ali več genov za odpornost proti betalaktamom in gene za odpornost proti kinolonom.
3. Odporni sevi *E. coli*, izolirani iz živil, so odporni proti drugim protimikrobnim zdravilom kot sevi, izolirani pri ljudeh.
4. Geni za izločanje betalaktamaz pri sevih *E. coli*, izoliranih iz živil, se razlikujejo od genov pri sevih *E. coli*, ki jih izoliramo pri ljudeh.
5. Genotipi sevov *E. coli*, izoliranih iz živil živalskega izvora in ljudi, se med seboj razlikujejo.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 PROTIMIKROBNE UČINKOVINE

Protimikrobne učinkovine uporabljamo za zdravljenje ljudi in živali. Antibiotiki so rešili številna življenja in dobesedno spremenili svet medicine. Tudi v času ekstremnih robotskej operacij zdravniki in kirurgi ne podcenjujejo pomembnosti antibiotikov. Obdobje njihove uporabe se je začelo leta 1910, ko je Paul Ehrlich ob pomoči sodelavca Sacharchira Hata po dolgotrajnih raziskavah ugotovil protimikroben delovanje ene od številnih testiranih sintetičnih substanc, ki je delovala na povzročitelja sifilisa. Sledila so odkritja bakteriologa Alexandra Fleminga; ta je leta 1928 presenečen odkril, da je plesen, ki je kontaminirala petrijevo ploščo z gojiščem, zaustavila rast bakterije *Staphylococcus aureus* (Kobal in Snoj, 2015). V nekaj letih je sledil razvoj zdravil na osnovi sulfonamidov, katerim so hitro sledili bolj učinkoviti betalaktami, kloramfenikol, tetraciklini in leta 1950 aminoglikozidi.



Slika 1: Alexander Fleming je odkril penicilin, prvi naravni antibiotik, leta 1928.
(vir: http://www.medicalnewstoday.com/articles/10278.php#what_are_antibiotics).
Figure 1: Alexander Fleming discovered penicillin, the first natural antibiotic, in 1928.
(source: http://www.medicalnewstoday.com/articles/10278.php#what_are_antibiotics).

Antibiotik je naravna spojina, ki že v nizkih koncentracijah zaustavi rast bakterij in ni škodljiva za zdravje ljudi in živali. Antibiotike naravno proizvajajo bakterije in glice, v zadnjem času pa je pomembnejši sintetični in polsintetični način proizvodnje. Delovanje

antibiotikov je lahko bakteriostatično (zaviranje razmnoževanja bakterij) ali baktericidno (ubijanje in propad bakterij) (Madigan in Martinko, 2006). Antibiotiki se uporabljajo kot zdravila za zdravljenje bakterijskih okužb pri ljudeh, živalih in redkeje pri rastlinah.

Danes pogosto uporabljamo izraz antibiotik, zlasti v širši laični javnosti, za protimikrobnne učinkovine, pridobljene s kemijsko modifikacijo naravnih antibiotikov, in tudi za učinkovine, ki so v celoti proizvod kemične sinteze (Krivic in sod., 2004). Znanih je več kot 8000 naravno pridobljenih antibiotikov, vendar je le 1 % vseh teh tudi klinično uporabljenih (Madigan in Martinko, 2006). Trenutno znani antibiotiki izvirajo le iz nekaj rodov mikroorganizmov, predvsem *Streptomyces*, *Penicillium* in *Bacillus* (Kobal in Snoj, 2015).

Odkritje antibiotikov je eden izmed najpomembnejših mejnikov v razvoju medicine. Njihova uporaba je močno povečala uspešnost zdravljenja bakterijskih okužb. Vendar pa zaradi njihove pogoste in nepravilne uporabe vse več bakterij razvija odpornost proti eni ali več skupinam antibiotikov. Naraščanje odpornih sevov v zadnjih letih postaja svetovni zdravstveni problem, na kar opozarja tudi Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organization, WHO) (Gubina in Ihann, 2002; El-Halfawy in Valvano, 2015).

2.1.1 Betalaktamski antibiotiki

Kot je razvidno iz imena skupine teh protimikrobnih zdravil, osnovo zgradbe predstavlja betalaktamski obroč. Laktami so ciklični amidi, betalaktamski obroč pa je štiričlenska struktura s tremi ogljikovimi in enim dušikovim atomom. Betalaktamski antibiotiki se med seboj razlikujejo po preostalem delu kemijske strukture. Penicilini in karbapenemi imajo poleg betalaktamskega obroča še petčlenski tiazolidni obroč, cefalosporini pa šestčlenski dihidrotiazidni obroč. Monobaktami imajo le betalaktamski obroč, lahko pa imajo v stranski verigi različne obroče.

Betalaktamski antibiotiki so največja družina protimikrobnih učinkovin in so hkrati največkrat uporabljeni antibiotiki v sodobni praksi. Njihovo delovanje je časovno odvisno, imajo na splošno dobro distribucijo v telesu in nizko toksičnost. Betalaktamski antibiotiki preprečujejo sintezo bakterijske stene oziroma jo poškodujejo in na ta način delujejo baktericidno.

Modifikacija originalne molekule je omogočila razvoj novih spojin s širšim protimikrobnim delovanjem. Kljub temu pa je uporaba betalaktamskih antibiotikov v nekaterih kliničnih primerih omejena, najpogosteje zaradi vedno pogostejšega pojava odpornih bakterij. Vseeno pa ostaja penicilin prva terapevtska izbira pri številnih okužbah. Cefalosporini različnih generacij imajo širok spekter delovanja, karbapenemi se uporabljam pri okužbah, povzročenih z večkratno odpornimi bakterijami, ki so pogosto pridobljene tudi v bolnišnicah. Inhibitorji betalaktamaz onemogočijo njihovo delovanje in tako omogočijo nemoteno delovanje antibiotikov, pri katerih se pojavi odpornost zaradi proizvodnje betalaktamaz (Suárez in Gudiol, 2009).

Tabela 1: Skupine betalaktamov in njihovi predstavniki (Ihan in Gubina, 2002).

Table 1: Groups of beta-lactam antibiotics and their representatives (Ihan and Gubina, 2002).

BETALAKTAMI	PREDSTAVNIKI
Penicilini	penicilin, ampicilin, meticilin, oksacilin, piperacilin, amoksicilin
Cefalosporini	
1. generacija	cefaleksin, cefalotin, cefazolin, cefaloridin
2. generacija	cefaklor, cefuroksim
3. generacija	ceftriaxon, cefotaksim, cefpodoksim, ceftazidim, cefoperazon, ceftibuten
4. generacija	cefepim, cefpirom
Karbapenemi	imipenem, faropenem, meropenem, ertapenem
Monobaktami	aztreonam
Inhibitorji betalaktamaz	klavulanska kislina, tazobaktam, sulbaktam

2.1.2 Kinoloni

Skupina znanstvenikov je med raziskovanjem lastnosti molekule kinina odkrila, da imajo derivati molekule 1,8-naftiridina protibakterijske lastnosti. Leta 1962 je George Lesher s sodelavci razvil nalidiksno kislino. To je bila prva klinično uporabna spojina in leta 1964 so jo v Veliki Britaniji uporabljali za zdravljenje okužb urinarnega trakta (Lesher in sod., 1962; Norris in Mandell, 1988).

Skoraj 20 let po odkritju nalidiksne kisline je Koga s sodelavci opazil izboljšanje absorpcije in učinkovitosti antibiotika, ko so na mesto C6 dodali fluor, in tako je nastala skupina

fluorokinolonov. Nove spojine imajo prednost zaradi možnosti oralne in parenteralne aplikacije, širši spekter delovanja, dobro distribucijo v tkivih, izboljšane farmakokinetične lastnosti (aplicirajo se 1- do 2-krat dnevno) in manj stranskih učinkov (Mitscher in sod., 1993).

Kinoloni so sintetična protimikrobnna zdravila, ki zavirajo delovanje bakterijske topoizomeraze. Topoizomeraze so prisotne pri vseh bakterijah, zato so kinoloni protimikrobnne spojine s širokim spektrom delovanja. Rutinsko se v humani medicini uporabljajo za zdravljenje urogenitalnih okužb, povzročenih z bakterijami, odpornimi proti trimetoprimu s sulfametoksazolom. V veterini pa se pogosto uporabljajo za preprečevanje okužb dihalnih poti pri govedu in perutnini (Madigan in Martinko, 2006).

Tabela 2: Generacije kinolonov, predstavniki, klinična uporaba in delovanje.

Table 2: Generations of quinolones, members, clinical use and antimicrobial spectrum.

Generacija kinolonov	Predstavnik generacije	Klinična uporaba	Spekter delovanja
PRVA GENERACIJA	Nalidiksna kislina, cinoksacin, rosoksacin, oksolinična kislina	Nekomplicirane okužbe sečil	Zmerna aktivnost proti G-
DRUGA GENERACIJA Razred I	lomefloksacin, norfloksacin, enoksacin,	Nekomplicirane okužbe sečil	Zmerna aktivnost proti G-.
Razred II	ofloksacin, ciprofloksacin, enrofloksacin, marbofloksacin, orbifloksacin, norfloksacin	Zdravljenje zapletenih okužb sečil, okužb zaradi katetrskih vstavkov, gastroenteritis, bolnišnične okužbe, nekatere spolno prenosljive bolezni	Širša aktivnost proti G-, slabša aktivnost proti G+ Deluje sinergistično z betalaktami.
TRETJA GENERACIJA	levofloksacin, sparfloksacin, grepafloksacin, moksifloksacin, gatifloksacin, ceftiofur, danofloksacin, parafloksacin	Zdravljenje vseh zgoraj naštetih okužb ter pljučnic	Širša aktivnost proti G-, izboljšana aktivnost proti G+ in atipičnim patogenom. Odlično deluje proti <i>S. pneumoniae</i> .
ČETRTA GENERACIJA	klinafloksacin, trovalfoksacin, prulifloksacin, moksifloksacin	Zdravljenje intraabdominalnih okužb	Izboljšana aktivnost proti G+ in anaerobom.

Legenda:

G-: po Gramu negativne bakterije

G+: po Gramu pozitivne bakterije

2.2 ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM

Uporaba antibiotikov v humani in veterinarski medicini omogoča učinkovito obrambo v boju pred številnimi bakterijskimi boleznimi, vendar je dolgotrajna in pogosto tudi neupravičena raba privedla do pridobljene odpornosti bakterij proti različnim skupinam antibiotikov (Livermore, 2009). S številnimi študijami so ugotovili, da se po začetku uporabe novega antibiotika poveča odpornost tako patogenih kot komenzalnih bakterij. Slednje lahko predstavljajo rezervoar genov za odpornost, ki se preko plazmidov lahko prenesejo v druge, tudi potencialno patogene bakterije. Nivo odpornosti pri komenzanzih bakterijah je dober pokazatelj, kako močan je seleksijski pritisk na bakterije z uporabo določenega antibiotika ter kakšno odpornost lahko pričakujemo pri patogenih bakterijah. Eden izmed pomembnih mehanizmov odpornosti je tvorba encimov za razgradnjo antibiotikov. V skupino bakterij, ki v zadnjih letih povzročajo največ težav v javnem zdravstvu, uvrščamo bakterije, ki izločajo encime ESBL in/ali AmpC ter imajo mehanizme za odpornost proti kinolonom. Encime pogosto izločajo po Gramu negativne bakterije, najpogosteje iz družine *Enterobacteriaceae*, predvsem *E. coli* in *K. pneumoniae* (Arslan in Özdamir, 2009).

2.2.1 Odpornost proti betalaktamskim antibiotikom

Pojav odpornosti proti betalaktamskim antibiotikom so odkrili še pred začetkom klinične uporabe prvega betalaktamskega antibiotika penicilina (Bradford, 2001). Leta 1963 je bila prvič izolirana proti ampicilinu odporna *E. coli*. Odpornost ji je omogočil encim betalaktamaza TEM-1. Gen *bla*, ki je kodiral ta encim, se je vključil v plazmide in tako se je odpornost razširila v številne vrste družine *Enterobacteriaceae* in nekatere druge bakterije. V naslednjih 20 letih so točkovne mutacije, zaradi katerih je prišlo do sprememb v aminokislinskem zaporedju, bakterijam oz. encimom razširile hidrolitični spekter (Baquero in sod., 2008; Livermore 1995; Paterson in Bonomo, 2005). Glavni vzrok odpornosti bakterij proti betalaktamskim antibiotikom so betalaktamaze. Ti encimi cepijo amidno vez v betalaktamskem obroču in posledično antibiotik ni več učinkovit (Ihan in Gubina, 2002; Bonnet, 2004).

Tabela 3: Klasifikacijska shema betalaktamaz (Bush in sod., 2010).
Table 3: Beta-lactamases classification scheme (Bush et al., 2010).

Funkcionalna skupina	Molekularna skupina	Substrat	Inhibitorji CA/TZB/EDTA	Značilnosti	Skupine encimov
1	C	Cefalosporini	/	Večja aktivnost proti cefalosporinom kot benzilpenicilinom, hidroliza cefamicinov	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cefalosporini	/	Povečana hidroliza ceftazidima in ostalih oksimino betalaktamov	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilini	CA/TZB	Večja aktivnost proti benzilpenicilinom kot cefalosporinom	PC1
2b	A	Penicilini, cefalosporini nižjih generacij	CA/TZB	Podobna hidroliza benzilpenicilinov in cefalosporinov	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporini z razširjenim spektrom delovanja, monobaktami	CA/TZB	Povečana hidroliza oksimino betalaktamov	TEM-3, SHV-2, CTX-M15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilini	/	Odpornost proti klavulanski kislini in tazobaktamu	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporini z razširjenim spektrom delovanja, monobaktami	/	Povečana hidroliza oksimino betalaktamov skupaj z odpornostjo proti klavulanski kislini, sulbaktamu in tazobaktamu	TEM-50
2c	A	Karbenicilin	CA/TZB	Povečana hidroliza karbenicilinov	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Karbenicilin, cefepim	CA/TZB	Povečana hidroliza karbenicilinov, cefepima in cefpiroma	RTG-4
2d	D	Kloksacilin	CA/TZB/EDTA	Povečana hidroliza kloksacilina ali oksacilina	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporini z razširjenim spektrom delovanja	CA/TZB/EDTA	Hidroliza kloksacilina ali oksacilina in oksimino betalaktamov	OXA-11, OXA-15
2df	D	Karbapenemi	CA/TZB/EDTA	Hidroliza kloksacilina ali oksacilina in karbapenemov	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporini z razširjenim spektrom delovanja	CA/TZB	Hidroliza cefalosporinov. Inhibicija s klavulansko kislino	CepA

Se nadaljuje.

Nadaljevanje Tabela 3: Klasifikacijska shema betalaktamaz (Bush in sod., 2010).
Sequel Table 3: Beta-lactamases classification sheme (Bush et al., 2010).

Funkcionalna skupina	Molekularna skupina	Substrat	Inhibitorji CA/TZB/EDTA	Značilnosti	Skupine encimov
2f	A	Karbapenemi	CA/TZB/EDTA	Povečana hidroliza karbapenemov, oksimino betalaktamov, cefamicinov	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B (B1)	Karbapenemi	EDTA	Hidroliza antibiotikov s širokim spektrom delovanja, karbapenemov, ne pa monobaktamov	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
	B (B3)				
3b	B (B2)	Karbapenemi	EDTA	Preferenčna hidroliza karbapenemov	CphA, Sfh-1

Legenda:

CA – klavulanska kislina (angl. clavulanic acid)

TZB – tazobaktam (angl. tazobactam)

EDTA – etilendiamintetraocetna kislina (angl. ethylenediaminetetraacetic acid)

Nekatere betalaktamaze so specifične za peniciline, nekatere za cefalosporine, nekatere pa delujejo na obe skupini antibiotikov. Gen za betalaktamazo lahko nastane kot posledica kromosomske mutacije v PBP (angl. penicillin-binding proteins) ali v regulatornih regijah AmpC oziroma se prenese z mobilnimi genetskimi elementi (plazmidi) med posameznimi sevi ali celo vrstami bakterij.

Danes sta v uporabi dve klasifikacijski shemi za delitev betalaktamaz. Molekularno klasifikacijo je leta 1980 uvedel Ambler. Temelji na aminokislinskem zaporedju in deli betalaktamaze v štiri razrede. Razredi A, C in D za hidrolizo betalaktama uporablajo serin, medtem ko v razred B spadajo encimi, ki za hidrolizo uporablajo Zn ion (Ambler, 1980). Leta 1995 je Karen Bush s sodelavci predlagala še funkcionalno klasifikacijo, ki upošteva encimske substrate in inhibitorje ter jih razvršča v štiri skupine (Bush in sod., 1995).

Izraz betalaktamaze razširjenega spektra (ESBL) je bil prvič uporabljen za derivate encimov TEM in SHV, ki so bili sposobni hidrolizirati oksimino-cefalosporine (Livermore, 2008). V novejšem času se izraz ESBL uporablja za betalaktamaze iz razreda A (po Amblerjevi klasifikaciji), ki hidrolizirajo oksimino betalaktame ter 2. in 3. generacijo cefalosporinov. V skupino ESBL spadajo tudi oblike encimov TEM in SHV, ki hidrolizirajo peniciline in encimi

iz skupine CTX-M. ESBL ločimo od ostalih betalaktamaz, ki omogočajo bakterijam odpornost proti 2. in 3. generaciji cefalosporinov na drug način, npr. s hiperprodukциjo betalaktamaz AmpC pri rodu *Enterobacter* ali pa s plazmidno vneseno betalaktamazo AmpC pri vrstah *Klebsiella spp.* in *E. coli* (Livermore in Woodford, 2004). Razmoževanje bakterij z encimi ESBL zavirajo antibiotiki, ki imajo dodane inhibitorje betalaktamaz, kot je klavulanska kislina (Paterson in Bonomo, 2005).

Do leta 2000 je bila večina zapisov za ESBL povezana z mutiranimi oblikami betalaktamaz iz skupine TEM in SHV pri bolnišnični bakteriji *Klebsiella spp.* V današnjih časih pa tako v Evropi kot v Aziji prevladujejo betalaktamaze iz skupine CTX-M, ki so se razvile z mutacijo iz gena na kromosому bakterije vrste *Kluyvera spp.* Encimi se zaradi širjenja s horizontalnim prenosom ne pojavljajo samo pri *K. pneumoniae*, ampak tudi pri *E. coli* (Livermore 2009).

2.2.2 Odpornost proti kinolonom

Odpornost bakterij proti kinolonom je poznana že več kot 40 let, od začetka uporabe nalidiksne kisline v klinični praksi. Do nedavnega je veljalo, da so mutacije v kromosomskih genih edini mehanizem odpornosti proti kinolonom. Vendar so znanstveniki odkrili, da je nizka raven odpornosti proti kinolonom lahko kodirana tudi na plazmidih (angl. plasmid mediated quinolone resistance, PMQR). Na teh so poleg genov z zapisom za odpornost proti kinolonom pogosto tudi genski zapisi za encime ESBL in/ali AmpC (Jacoby, 2005).

2.2.2.1 PMQR – *qnr*

Proteini QnrA, QnrB in QnrS varujejo pred inhibicijo tarčne encime, in sicer DNA-girazo in tip IV topoizomerazo. Znanih je sedem različic gena za encim *qnrA*, osem inosemdeset različic *qnrB* in devet različic *qnrS* (Jacoby in sod., 2008).

QnrA posreduje odpornost proti kinolonom in poveča minimalno inhibitorno koncentracijo (angl. Minimal Inhibitory Concentration, MIC) fluorokinolonov tudi do dvajsetkrat. Protein QnrA je bil do danes ugotovljen vsepo vsod po svetu, tudi med nesorodnimi bakterijskimi

vrstami (Cattoir in sod., 2008). Protein QnrB ščiti encim DNA-girazo pred delovanjem kinolonov. Prvič je bil opisan pri sevih *K. pneumoniae* iz Indije (Jacoby in sod., 2006). Gen *qnrS* je bil odkrit na plazmidu pri sevu *Shigella flexneri* na Japonskem (Hata in sod., 2005).

2.3 ŽIVILA

Živilo je vse, kar ljudje uporabljajo za prehranske namene v nepredelani, polpredelani ali predelani obliki, vključno s pitno vodo in pijačami (Uradni list RS št. 52/2000). Živilo je varno, kadar ne vsebuje bioloških, kemijskih in fizikalnih dejavnikov tveganja. Biološka tveganja so patogene bakterije, glivice, virusi in paraziti. Kemijska tveganja predstavljajo ostanki pesticidov, težkih kovin, zdravil, detergentov, nedovoljenih aditivov in drugih strupenih snovi, medtem ko med fizikalne dejavnike tveganja prištevamo mehanične trdne delce, kot npr. les, kamenje, kosti, steklo (Uredba (ES) 178/2002).

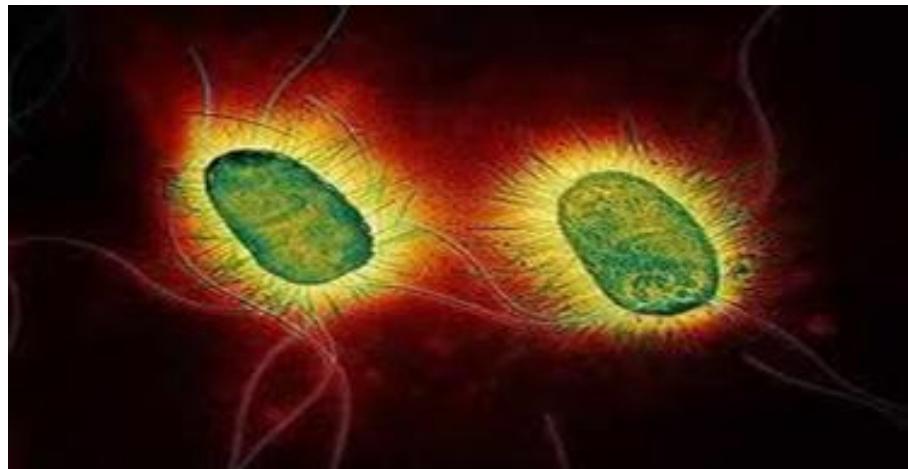


Slika 2: Živila (Vir: <http://www.mojaalergija.si/prispevki/histaminska-intoleranca/>)
Figure 2: Food (Source: <http://www.mojaalergija.si/prispevki/histaminska-intoleranca/>)

Po evropski zakonodaji se vsa živila na trgu preverjajo glede mikrobiološke varnosti in higienskega stanja v proizvodnji in prometu z živili ter prisotnosti patogenih dejavnikov mikrobnega izvora, ki lahko škodljivo vplivajo na zdravje ljudi. Eden izmed pomembnih patogenov je tudi *E. coli*, predvsem sevi, ki sintetizirajo verotoksine (VTEC).

2.4 BAKTERIJA *Escherichia coli*

Bakterije vrste *E. coli* uvrščamo med po Gramu negativne bakterije, v razred Gamma Proteobacteria, v red Enterobacteriales, družino Enterobacteriaceae in rod *Escherichia* (Singleton in Sainsbury, 2001). Kot komenzal je normalno prisotna v črevesju sesalcev, tudi človeka, in predstavlja velik del tako imenovane normalne črevesne mikrobiote. Odkril jo je nemški pediater in bakteriolog Theodor Escherich leta 1885 in po njem je tudi dobila ime. *E. coli* je zelo razširjena bakterija v črevesju. Le nekateri sevi te vrste bakterije so patogeni za človeka in živali. *E. coli* je eden najbolj raziskanih organizmov.



Slika 3: *Escherichia coli* (Vir: <https://www.pinterest.com/pin/25966135325283569/> 12.2.2016)
Figure 3: *Escherichia coli* (: <https://www.pinterest.com/pin/25966135325283569/> 12.2.2016)

2.4.1 Delitev glede na patogenost in mesto povzročanja okužb

V preteklosti so bili sevi *E. coli* klasificirani na podlagi serološke identifikacije somatskih antigenov – O (lipopolisaharid, LPS), kapsularnih antigenov – K (polisaharid) in flagelarnih antigenov – H (proteini bičkov).

Danes seve *E. coli* ločimo na podlagi določenih genov za dejavnike virulence in kliničnih simptomov pri bolniku. Opisanih je najmanj sedem podskupin pri črevesnih sevih (angl. Intestinal Pathogenic *E. coli*, IPEC) in tri podskupine pri zunajčrevesnih sevih (angl. Extraintestinal Pathogenic *E. coli*, ExPEC).

Tabela 4: Patogeni tipi *E. coli* (Allocati in sod., 2013).
Table 4: *E. coli* pathogenic types (Allocati et al., 2013).

Patotip (akronim)	Bolezen	Simptomi	Dejavnik virulence	Referanca
Črevesna <i>E. coli</i> (IPEC)				
Enteropatogena <i>E. coli</i> (EPEC)	Driska pri otrocih	Vodena driska in bruhanje	Bfp, Eae, LEE	Kaper in sod., 2004
Enterohemoragična <i>E. coli</i> (EHEC)	Hemoragični kolitis, HUS	Krvava driska	Stx, Eae, Bfp	Kaper in sod., 2004; Bilinski in sod., 2012
Enterotoksigena <i>E. coli</i> (ETEC)	"Potovalna" driska	Vodena driska in bruhanje	LT in ST toksini CFA	Qadri in sod., 2005; Al-Abri in sod., 2005
Enteroagregativne <i>E. coli</i> (EAEC)	Driska pri otrocih	Sluzasta driska in bruhanje	AAF, citotoksini	Weintraub 2007; Nataro in sod., 1998
Difuzno adherentna <i>E. coli</i> (DAEC)	Akutna driska pri otrocih	Vodena driska, ponavljajoči UTI	Daa, AIDA	Servin 2005
Enteroinvazivna <i>E. coli</i> (EIEC)	Podobna šigelozni	Vodena driska in griža	Stx, Hly, celična invazija, Ipa	Kaper in sod., 2004; Nataro in sod., 1998
Adherentno invazivna <i>E. coli</i> (AIEC)	Povezana z Chronovo boleznijo	Kronično vnetje črevesja	Tip 1 fimbriji, celična invazija	Negroni in sod., 2012
Zunajčrevesna <i>E. coli</i> (ExPEC)				
Uropatogena <i>E. coli</i> (UPEC)	Spodnji UTI in sistemske infekcije	Cistitis in pielonefritis	Tip 1 in P fimbrije, AAF, Hly	Kaper in sod., 2004; Johnson in Stell 2000
Neonatalni Meningitis <i>E. coli</i> (NMEC)	Neonatalni meningitis	Akutni meningitis, sepsa	S fimbriji, K1 kapsule	Gaschignard in sod., 2011; Pouillot in sod., 2012
Aviarno patogena <i>E. coli</i> (APEC)	Verjetni vir s hrano prenosljivih bolezni	-	Tip 1 in P fimbrije, K1 kapsule	Johnson in sod., 2007; Rodriguez-Siek in sod., 2005

Legenda:

HUS – hemolitično uremični sindrom, LT (angl. heat-labile), topotno labilni enterotoksin, ST (angl. heat-stabile) topotno stabilni enterotoksin, CFA (angl. colonization factor antigen), AAF (angl. aggregative adhesion fimbria), AIDA (angl. adhesin involved in diffuse adherence), UTI (angl. urinary tract infections), okužbe sečil

2.4.1.1 Črevesni sevi *E. coli* (IPEC)

Črevesni sevi se širijo preko fekalno oralne poti z zaužitjem kontaminirane vode in/ali hrane. EPEC povzročajo drisko predvsem pri otrocih, še posebej v okolju s slabimi higieniskimi razmerami, npr. v državah v razvoju. Sevi EPEC povzročajo driske tudi pri živalih. Človek predstavlja pomembni vir sevov EPEC. Sevi povzročajo hude lezije na celicah, na katere se pritrди. Sevi EPEC so sposobni tudi vdreti v črevesne celice (Kaper in sod., 2004; Montville in sod., 2012).

Sev EHEC je bil prvič priznan kot človeški patogen leta 1982, ko so izolirali *E. coli* O157:H4 kot povzročitelja dveh izbruhih krvavih drisk. Sevi EHEC so tipični predstavniki skupine s hrano prenosljivih povzročiteljev bolezni. Povzročajo hemoragični kolitis. Vsi sevi proizvajajo šigi podoben toksin (angl. Shiga like toxin), podoben tistemu, ki ga proizvaja bakterija *S. dysenteriae*, zato so sevi EHEC eni najbolj virulentnih sevov na svetu (Bilinski in sod., 2012; Montville in sod., 2012).

Sevi ETEC so najpogosteji patogeni in povzročajo "potovalno" drisko. Klinični znaki so blaga ali huda vodena driska pri ljudeh vseh starostnih skupin. Sevi ETEC kolonizirajo tanko črevo s pomočjo fimbrijskih adhezinov in proizvajajo toksin LT ali ST, ki povzroča akumulacijo vode v črevesju in posledično drisko. Glavni rezervar sevov ETEC so ljudje (Qadri in sod., 2005; Al-Abri in sod., 2005; Montville in sod., 2012).

Sevi EAEC so povezani z vztrajajočimi driskami pri ljudeh. Pogosto jih najdemo pri asimptomatskih prenašalcih in so drugi najpogosteji vzrok za "potovalne" driske. Sevi EAEC so pogosto povezani z driskami pri otrocih v državah v razvoju in pri ljudeh, okuženih z humanim imunodeficientnim virusom (angl. Human immunodeficiency virus, HIV) (Weintraub 2007; Nataro in sod., 1998; Montville in sod., 2012).

DAEC povzroča drisko pri otrocih, starih od 1 do 5 let. Tipični klinični znak je blaga driska brez primesi krvi. Sevi DAEC navadno ne proizvajajo toksinov LT, ST ali Stx (Servin 2005; Montville in sod., 2012).

Sevi EIEC so pogost povzročitelj vodene driske ali griže pri otrocih in odraslih in so sorodstveno zelo podobni sevom *Shigella spp.* Osnovno mesto naselitve teh bakterij je debelo

črevo, kjer sevi EIEC vdrejo in rastejo v epitelnih celicah ter s tem povzročajo celično smrt (Kaper in sod., 2004; Montville in sod., 2012).

AIEC je nedavno odkrit tip, ki ga povezujejo z lezijami pri Chronovi bolezni (Darfeuille-Michaud 2002; Negroni in sod., 2012).

2.4.1.2 Zunajčrevesni sevi *E. coli* (ExPEC)

Seve ExPEC pogosto povezujemo z bolnišničnimi okužbami in okužbami iz okolja.

Sevi UPEC so fenotipsko in po prisotnosti dejavnikov virulence različni od komenzalnih sevov *E. coli*. Najpogosteje povzročajo vnetja urinarnega trakta (angl. Urinary Tract Infections, UTI) pri ljudeh. Kar v 80 % primerov okužb sečil so povzročitelji sevi UPEC (Kaper in sod., 2004; Johnson in Stell, 2000).

Sevi NMEC so v razvitih državah pogosti povzročitelji neonatalnih bakterijskih meningitisov z nevrološkimi posledicami pri preživelih pacientih (Gaschignard in sod., 2011). V zadnjih letih opažajo vedno več večkratno odpornih sevov NMEC (Pouillot in sod., 2012).

APEC je dodatni patogeni živalski tip. Izolirali so ga iz črevesne mikrobiote zdravih ptic in je odgovoren za številna zunajčrevesna obolenja pri številnih vrstah gostiteljev. Nedavne študije so pokazale, da imajo sevi APEC in ExPEC številne podobnosti glede seroloških skupin in dejavnikov virulence, kar bi lahko kazalo na potencialnega povzročitelja s hrano prenosljivih bolezni (Johnson in sod., 2007; Rodriguez-Siek in sod., 2005; Tivendale in sod., 2010; Manges in Johnson, 2012).

2.4.2 Delitev v filogenetske (pod)skupine po Clermontu

Obstaja več molekularnih metod, s katerimi lahko razvrščamo seve bakterije *E. coli* v različne skupine. Primer je razdelitev na osnovi primerjave nukleotidnega zaporedja sedmih »gospodinjskih« genov (angl. "housekeeping genes") z metodo tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij (angl. multilocus sequence typing, MLST). Glede na razlike v aleilih

in kombinacije alelov posameznih genov seve uvrščamo v t. i. sekvenčne tipe (angl. sequence type, ST). Ker je metoda kompleksna in je težje izvedljiva za večje število vzorcev, se pogosto uporablja razvrščanje sevov *E. coli* v t. i. filogenetske (pod)skupine po Clermontu.

S primerjavo nukleotidnih zaporedij kromosomskih odsekov različnih sevov *E. coli* so Clermont in sodelavci ugotovili, da lahko seve *E. coli* razdelimo v štiri glavne filogenetske skupine: A, B1, B2 in D (Herzer in sod., 1990; Clermont in sod., 2000).

Tabela 5: Razdelitev v filogenetske (pod)skupine (Branger in sod., 2005).
Table 5: Phylogenetic distribution in (sub)groups (Branger et al., 2005).

Filogenetska skupina	Filogenetska (pod)skupina	<i>chuA</i>	<i>YjaA</i>	TspE4.C2
A	A₀	-	-	-
	A₁	-	+	-
B1		-	-	+
	B ₂	+	+	-
B2	B ₂ ₃	+	+	+
	D	+	-	-
D	D ₁	+	-	+
	D ₂	+	-	

Postopek, s katerim lahko bakterije hitro uvrstimo v filogenetske (pod)skupine, temelji na verižni reakciji s polimerazo (angl. Polymerase chain reaction, PCR). Ta temelji na pomnoževanju genov *chuA* in *yjaA* ter fragmenta DNA TspE4.C2. Gen *chuA* je odgovoren za transport železa v enterohemoragičnem sevu O157:H7, funkciji gena *yjaA* in fragmenta DNA TspE4.C2 pa nista znani (Bonacorsi in sod., 2000). Metodo je predlagal Clermont s sodelavci na podlagi testiranja 230 sevov, ki so bili že predhodno razvrščeni v filogenetske skupine z uporabo drugih metod (Clermont in sod., 2000).

2.5 VIRULENTNI DEJAVNIKI

Virulenta pomeni stopnjo patogenosti mikroorganizmov (bakterij, virusov, gliv) in je definirana kot zmožnost organizma, da povzroči bolezen pri določenem gostitelju. Pri *E. coli* je virulenta rezultat ene ali več specifičnih lastnosti oziroma dejavnikov virulence. Dejavniki

virulence ločujejo potencialno patogene seve od komenzalnih črevesnih sevov (Johnson, 1991).

Virulentne dejavnike lahko razdelimo v več skupin: adhezine, toksine in avtotransporterje, invazine, mehanizme za privzem železa in faktorje za izogibanje obrambnemu sistemu gostitelja (Bahrani-Mougeot in sod., 2002).

2.5.1 Adhezini

Pritrditev na substrat je značilnost številnih patogenih mikroorganizmov. S pritrditvijo na gostiteljske strukture mikrobeni patogeni preprečijo, da jih odplaknejo telesne tekočine (kri, urin, črevesna vsebina) in s tem odstranijo iz telesa. Pritrditev patogenov je prvi nujni pogoj za kolonizacijo sluznic gostitelja (Reid in Sobel, 1987; Svanberg, 1986; Wineberg, 1984).

2.5.1.1 Fimbrije tipa 1

Pritrditev bakterij s fimbrijami tipa 1 blokira raztopina D-manoze, kar pomeni, da so te fimbrije občutljive za manozo (Ofek in sod., 1977). Receptorji za fimbrije tipa 1 so na eritrocitih številnih vrst (Duguid in sod., 1979). Bakterije s tem tipom adhezinov se pritrdijo na epitelne celice ust, črevesne sluznice in vaginalne sluznice, kar pomeni, da predstavljajo pomemben faktor pri kolonizaciji *E. coli* v omenjenih organih (Falkowski in sod., 1986).

2.5.1.2 P-fimbrije

P-fimbrije so, podobno kot fimbrije tipa 1, nitaste strukture na površini bakterijske celice (Antão in sod., 2009).

P-fimbrije so heteropolimeri, sestavljeni iz glavnega pilina PapA, manjših pilinov PapE in PapF ter adhezina PapG. PapE, PapF in PapG so locirani na vrhu fimbrije. PapF in PapG sta nujna za vezavo bakterije na gostiteljsko celico (Ulett in sod., 2007; Antão in sod., 2009).

Adhezini PapG se pojavljajo v treh molekulskih variantah: PapGI, PapGII, PapGIII. PapGIII je prevladujoča varianta med bakterijskimi izolati *E. coli* pri ženskah in otrocih z vnetjem sečnega mehurja, PapGII pa je povezan z okužbami ledvic in bakteriemijo pri ljudeh. P-fimbrije so ključne determinante, ki so povezane z virulenco *E. coli* pri okužbah urinarnega trakta. Potrebne so za vezavo na uroepitelne celice in povezročajo močan vnetni odgovor, ki nastane kot posledica bakterijske kolonizacije ledvic. To pa vodi v okvaro ledvic pri akutnemu pielonefritisu (Antão in sod., 2009). V živalskih modelih in v urinarnem traktu človeka sprožijo P-fimbrije prirojen imunski odgovor (Ulett in sod., 2007).

2.5.1.3 Protein intimin

Intimin je 94-97 kDa velik protein zunanje membrane in je edini črevesni kolonizacijski dejavnik, ki je bil doslej identificiran pri sevih EHEC. Zapis za intimin ima gen *eae* in je izražen tako pri sevih EPEC kot pri sevih EHEC (Delahay in sod., 2001).

Intimin je zadolžen za takojšnjo pritrditev sevov EHEC na gostiteljsko celico in ima pomembno vlogo v patogenezi. Na podlagi aminokislinskih sekvenčev so odkrili več različnih tipov intimina. Glavni tipi se imenujejo po grških črkah α , β , ϵ in γ . Intimin α se po navadi nahaja v sevih EPEC, medtem ko sta ϵ in γ tesno povezana s sevi EHEC. Intimin γ sintetizirajo *E. coli* iz seroskupine O157, O111 in O145, intimin ϵ pa iz seroskupin O103 in O121. Intimin β najdemo tako pri sevih EPEC kot pri sevih EHEC (Oswald in sod., 2000).

2.5.1.4 Curlijeva vlakna

Poleg flagel in fimbrij so Curlijeva vlakna tretja skupina struktur na površini celic *E. coli*. Sestavljena so samo iz ene podenote, imenovane curlin, ki se razlikuje od vseh poznanih fimbrijskih proteinov. Večina naravnih izolatov *E. coli* ima gen za curlin, vendar lahko samo nekateri sestavijo podenote v Curlijeva vlakna. Curlijeva vlakna so kodirana z gručo genov *csg* (angl. Curlin subunit gene). Izražanje genov, ki kodirajo Curlijeva vlakna, je kompleksno, z več kontrolnimi elementi, kot so H-NS, RpoS in OmpR (Antão in sod., 2009).

2.5.1.5 Nefimbrijski adhezini Iha in Hra

Gen *iha* kodira nehemaglutinacijski adhezin, ki omogoča *in vitro* vezavo *E. coli* K-12 na nevezoče HeLa celice. Gen je bil prvič identificiran pri izolatu *E. coli* O157:H7 pri pacientu s hemoragičnim kolitisom (Johnson in sod., 2000).

Nefimbrijski adhezin Hra (angl. heat-resistant agglutinin) je proti vročini odporen protein zunanje membrane, ki zleplja človeške ter živalske eritrocite in črevesne celice neodvisno od prisotnosti manoze. Gen *hra* je eden od značilnih označevalcev, ki so povezani z bakterijemijo. V eni od raziskav so gen *hra* ugotovili pri 45 % sevov, izoliranih iz krvi, pri fekalnih izolatih pa je bil prisoten le v 20 % (Johnson in sod., 2008).

2.5.2 Avtotransporterji in toksini

Nekatere patogene bakterije med kolonizacijo gostiteljevega tkiva ali po njej sproščajo različne toksine in invazine, ki poškodujejo gostiteljeve celice ali ekstracelularni matriks med njimi. Na ta način lahko prodrejo v globlje celične plasti, kjer so bolj zaščitene pred delovanjem imunskega sistema in protimikrobnimi snovmi (Kaper in sod., 2004).

2.5.2.1 Enterohemolizin

Plazmidi velikosti 90 kbp, ki jih pogosto najdemo pri sevih O157:H7, kodirajo gen za enterohemolizin. Najdemo ga praktično pri vseh sevih O157:H7, v velikem deležu je prisoten tudi pri sevih STEC. Gen *ehxA*, ki ima zapis za enterohemolizin, ima 60 % podobnost z genom *hlyA* za zapis hemolizina pri uropatogenih sevih *E. coli* (Schmidt in sod., 1994).

Njegova vloga je še vedno dokaj slabo raziskana, najverjetneje je povezana s privzemom železa (Baure in Welch, 1996).

2.5.2.2 Citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1 (CNF1) in citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 2 (CNF2)

Citotoksični nekrotizirajoči dejavnik je virulenten dejavnik, ki ga pogosto povezujejo z vnetjem urinarnega trakta. Izolacija CNF je pogosteja pri sevih, izoliranih iz urinarnega trakta, kot pri izolatih iz fecesa.

Njun genetski zapis se pogosto nahaja skupaj z zapisom za hemolizin alfa. CNF1 in CNF2 sta 110-115 kDa velika proteina, ki ju kodirata gena *cnf1* in *cnf2*. V mehurju verjetno povzročata nekrozo uroepitelnih celic, v črevesju pa uničenje mikrovilov, kar poveča prepustnost črevesnih celic in zmanjša fagocitozo obrambnih celic (Bahrani-Mougeot in sod., 2002; Toth in sod., 2003).

2.5.2.3 Avtotransporterski toksini

Avtotransporterski toksini so družina proteinov, ki jih izločajo po Gramu negativne bakterije. Značilnost avtotransporterskega mehanizma je, da so njegovi produkti sposobni sami usmerjati svoje izločanje skozi zunanjo membrano (Restieri in sod., 2007).

Protein Sat (angl. secreted autotransporter toxin) je 107 kDa velik avtotransporterski protein, ki povzroča vakuolizacijo in posledično propad epitelnih celic ledvic ali mehurja. V gostitelju sproži imunski odgovor, kot serinska proteaza pa ima tudi proteolitično aktivnost (Restieri in sod., 2007).

Protein Vat (angl. vacuolating autotransporter toxin) povzroča vakuolizacijo embrionalnih fibroblastov kokoši in je ključen za virulenco sevov APEC. V primeru okužb urinarnega trakta povzroči lizo uroepitelnih celic in omogoči kolonizacijo globljih tkiv.

Hbp (angl. hemoglobine-binding protein) razgraje hemoglobin in veže hem (Kostakioti in Stathopoulos, 2004).

Antigen 43 (Ag43) je v zunanji membrani številnih sevov *E. coli*. V sevu *E. coli* K-12 ga kodira gen *fluA* (*agn43*). Odgovoren je za agregacijo bakterij znotraj gostitelja in nastanek biofilma, s čimer bakterijam omogoča dolgotrajno preživetje v gostitelju (Ulett in sod., 2007).

Glikolizacija Ag43 vpliva na sposobnost vezave bakterij na evkariotske celice (Restieri in sod., 2007).

2.5.2.4 Verotoksini

Verotoksini (VT) so podobni šigatoksinom, ki jih proizvaja *S. dysenteriae* tipa 1 (Karmali in sod., 2010). Verotoksine sintetizira nad 100 različnih serotipov *E. coli*, najpogosteje serološke skupine O pa so O157, O6, O26, O91, O103, O111, O113, O117, O118, O121, O128, O145 (Trkov in sod., 2008). Poznamo dve glavni skupini verotoksinov, VT1 in VT2, in dva podtipa, VT2c in VT2d. V bakteriji je lahko prisoten zapis za enega, dva ali tri različne VT (Karmali in sod., 2010).

Splošen način delovanja takih toksinov vključuje vezavo podenote B (7,5 kDa) na glikolipidni receptor Gb3 (angl. globotriaosylceramide) na tarčni celici, toksini vstopijo z receptorskno posredovano endocitozo. Podenota A (32 kDa) se sprosti v citosol in povzroči depurinacijo adenina v 28S ribosomske ribonukleinsko kislino (rRNA), kar inhibira sintezo proteinov in povzroči apoptozo v evkariotski celici (Karmali in sod., 2010).

Viri bakterij, ki sintetizirajo VT, so različni. Pogosto so to zdrave domače živali, zlasti govedo. Z iztrebki okuženih živali se širijo v okolje, vodo, na zelenjavu in sadje (Trkov in sod., 2008). V prebavilu goveda največkrat ugotovijo prisotnost verotoksina tipa VT2c (Fröhlich in sod., 2009). V mleku in siru pa so pogosteje zasledili prisotnost verotoksinov iz skupine VT2 (Stephan in sod., 2008).

2.5.2.5 Toplotno stabilni enterotoksini

STa in STb (angl. Heat-stable enterotoxin a in Heat-stable enterotoxin b) sta enterotoksina, značilna za seve ETEC pri ljudeh in živalih. STa je predstavnik družine visoko homolognih enterotoksinov, ki jih povezujejo tudi z drugimi bakterijskimi enteropatogeni, kot sta *Vibrio cholerae* in *Yerinia enterocolitica* (Savarino in sod., 1993).

Tridekapeptid predstavlja domeno za družino enterotoksinov STa. Toksin se direktno veže na črevesno gvanilat ciklazo in hkrati stimulira njen izločanje na celicah COS-7. Posledica je proizvodnja cGMP (angl. cyclic guanosine monophosphate) (Savarino in sod., 1993).

Gen *astA* predstavlja strukturni gen toksinu EAST1 (angl. heat-stable enterotoxin 1). Toksin EAST1 najdemo pri vseh EAEC, ki jih povezujemo z dolgotrajnimi driskami pri otrocih. EAST1 je homologen topotopno stabilnemu enterotoksinu a (STa), ki ga izločajo vse ETEC. Gen *astA* ima 40 % sevov EAEC in je odgovoren za pojav agregativne pritrditve na črevesne celice (Savarino in sod., 1993).

2.5.3 Dejavniki, povezani z imunskim sistemom

Bakterije, ki se pojavijo v človeškem serumu, lahko aktivirajo komplementni sistem. V primeru odsotnosti specifičnih protiteles bakterije namreč lahko sprožijo alternativno pot aktivacije komplementa. Komplementni sistem sestavljajo molekule, ki sprožijo nastanek membranskega kompleksa ali MAC (angl. membrane attack complex). Ta v zunanjji membrani bakterije naredi pore, skozi katere lizocimi dosežejo peptidoglikansko celično steno in jo razgradijo. Bakterije se pred delovanjem komplementnega sistema zavarujejo s pomočjo posameznih ali kombiniranih učinkov, kot so blokada aktivacije komplementne kaskade (kisli polisaharidi), onemogočanje dostopa komplementnih komponent do kritičnih membranskih tarčnih mest (O polisaharidne stranske verige) ali oviranje normalnega delovanja kompleksa MAC, tudi kadar ta že doseže zunanjou membrano bakterije (površinska proteina TraT in Iss) (Johnson, 1991).

2.5.3.1 KpsMTII

Kapsularni polisaharidi so linearni polimeri ponavljajočih se ogljikohidratnih podenot, v katere so lahko vključene tudi aminokislinske ali lipidne komponente. Pri *E. coli* trenutno poznamo nekaj več kot 80 tipov kapsularnih polisaharidov, ki jih označujemo kot antigeni K (Schembri in sod., 2004). Glede na genetske in biosintetske lastnosti delimo kapsule na štiri skupine (Whitfield in Roberts, 1999).

Kapsule iz skupine 2 so tanke in termostabilne. Zgrajene so iz kislih polisaharidov z visoko koncentracijo anionov. Kodirajo jih tri skupine genov: ena skupina je odgovorna za sintezo in polimerizacijo podenot, druga za postpolimerizacijske modifikacije polisahardov (dodajanje fosfatidne kisline) in transport preko citoplazemske membrane, tretja pa za translokacijo preko zunanje membrane, v katero so vključeni produkti genov *kpsM* (transmembranska komponenta), *kpsT* (komponenta ATPazna), *kpsS* in *kpsC* (Johnson, 1991; Whitfield in Roberts, 1999).

Kisli kapsularni polisaharidi onemogočajo fagocitozo in komplementno ubijanje bakterijskih celic. Stopnja fagocitoze je obratno sorazmerna količini polisahardov (Johnson, 1991).

2.5.3.2 OmpT_A

Protein zunanje membrane OmpT je površinska proteaza po Gramu negativnih bakterij, ki z visoko katalitično učinkovitostjo cepi peptidno vez med dvema zaporednima bazičnima aminokislinsama, kot so Arg in Arg, Lys in Arg ter Lys in Lys (Baaden in Sansom, 2004).

OmpT razgraje številne pozitivno nabite protimikrobine peptide, katalizira aktivacijo človeškega plazminogena v plazmin in razgraje nekatere rekombinantne heterologne proteine. Najverjetneje ima pri uropatogenih sevih *E. coli* zaščitno vlogo (Baaden in Sansom, 2004).

2.5.3.3 TraT

Protein TraT je 25 kDa velik lipoprotein zunanje membrane, ki sevom omogoča odpornost proti serumu z oviranjem delovanja komplementnega sistema. Gen *traT* se prenaša z velikim plazmidom iz inkompatibilnostne skupine IncF. Pri sevih, ki nimajo kapsule, že majhno število izvodov gena *traT* poviša odpornost proti serumu, medtem ko mora biti pri sevih s kapsulo prisotno večje število izvodov gena, da pride do spremembe v odpornosti proti serumu (Johnson, 1991).

2.5.3.4 Iss

Protein Iss (angl. increased serum survival) 100-kratno poviša odpornost proti serumu in virulenco pri sevu *E. coli*, ki je občutljiv za delovanje seruma. Ne vpliva na sestavljanje komplementa, temveč inhibira aktivnost kompleksa MAC na zunanjih membranah (Johnson, 1991). Gen *iss* je že dolgo poznal po svoji virulentni vlogi pri ExPEC sevih *E. coli*. Gen je bil identificiran kot razpoznavna lastnost aviarnih ExPEC sevov, ne pa tudi humanih (Johnson in sod., 2008).

2.5.3.5 Tcp

Patogene bakterije ovirajo delovanje človeškega TLR (angl. toll-like receptor) z izločanjem homolognega proteina, ki vsebuje domeno TIR (Tcp ali angl. TIR domain-containing protein; TIR ali angl. toll/interleukin-1 receptor domain). TLR so pomembni senzorji mikrobnega napada, ki vodijo prirojeno imunsko obrambo proti številnim mikroorganizmom. Z inhibicijo TLR in MyD88 specifičnega signaliziranja zavirajo prirojen imunski odziv gostitelja in bakterijam omogočajo preživetje (Cirl in sod., 2008).

2.5.4 Mehanizmi za privzem železa

Železo potrebujejo vse žive celice. *E. coli* uporablja železo za transport in hrambo kisika, sintezo deoksiribonukleinske kisline DNA (angl. deoxyribonucleic acid), transport elektrolitov in metabolizem peroksidaze. Mnogi patogeni sevi *E. coli* so razvili/pridobili posebne sisteme za privzem železa, s katerimi lahko preživijo v okolju, kjer je železo omejujoč dejavnik. *E. coli* uporablja različne vire železa, da izpolni svoje prehranske zahteve po njem. Uporablja lahko gostiteljske proteine, kot sta transferin ali laktoferin, ki jih s pomočjo receptorjev zunanje membrane prenesejo v notranjost celice (Krewulak in Vogel, 2008). Bakterije vsebujejo od 10^5 do 10^6 železovih atomov na bakterijsko celico in čeprav je skupna koncentracija v bioloških tekočinah večja od $20 \mu\text{M}$, je večina tega železa vezanega na proteine. Del obrambnega mehanizma gostitelja proti okužbi je zmanjšanje količine železa za

patogene s tem, da zmanjšajo absorpcijo železa iz črevesja, sinteza dodatnih železovih proteinov in premik železovih ionov iz plazme v znotrajcelična skladišča (Weinberg, 1987).

2.5.4.1 Aerobaktin

Aerobaktinski sistem je plazmidno ali kromosomsko kodiran sistem za privzem železa, ki je prisoten v številnih črevesnih mikroorganizmih. Vključuje najmanj pet genov za sintezo (*iuc* ali angl. iron uptake chelate) in transport (*iut* ali angl. iron uptake transport) sideroforja. Aerobaktin je majhna molekula, ki nastane s kondenzacijo dveh molekul lizina in ene molekule citrata (Neilands in sod., 1985). Po izločanju iz bakterije *E. coli* aerobaktin privzeme Fe³⁺ iz železa vezoih proteinov in ga vnese v celico skozi 74 kDa velik zunajmembranski proteinski receptor (Johnson in sod., 1991).

2.5.4.2 Siderofor

IroN je sideroforni receptor, ki se močneje izraža v urinu. Receptor je bil izoliran iz arheološkega seva ExPEC CP9 kot del otoka patogenosti (angl. pathogenicity island, PAI). IroN je pogosteji pri sevih *E. coli*, izoliranih iz vzorcev pri vnetjih urinarnega trakta, kar potrjuje dejstvo, da gre za virulentni dejavnik pri zunajčrevesnih okužbah (Johnson in sod., 2000).

2.5.4.3 Jersiniabaktin

Skupina genov *fyuA-irp* je deloma odgovorna za virulenco patogenih bakterij iz rodu *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterolitica* IB). Pri sintezi sideroforja jersiniabaktina sodelujejo ključni proteini YbtS, YbtE, YbtU, HMWP1 in HMWP2. HMWP1 in HMWP2 sta zapisana z genoma *irp1* in *irp2*. Sta del otoka patogenosti HPI (angl. High Pathogenicity Island). Receptor za jersiniabaktin FyuA je zapisan z genom *fyuA*, deluje tudi kot receptor za pesticin. Skupen genov *fyu* je zelo pomemben dejavnik pri patogenezi bakterij *Y. pestis* in *Y. enterocolitica*. Skupina genov *fyuA-irp* se je iz bakterij *Y. pestis* v bakterije *E. coli*

najverjetneje prenesla s horizontalnim genskim prenosom. Gene *fyuA*, *irp1* in *irp2* najdemo pri številnih patogenih sevih *E. coli* (Schubert in sod., 1998).

2.5.5 Mikrocin V

Bakterija *E. coli* izdeluje bakteriocine, imenovane kolicini. To so toksični eksoproteini, ki jih tvorijo kolicinogene *E. coli*. Njihova naloga je zaviranje in preprečevanje rasti sevov iste vrste ali sorodnih vrst (*Salmonella*, *Shigella*). Približno tretjina vseh sevov *E. coli* v črevesju ljudi je kolicinogenih, podobno je tudi pri govedu (Kelly, 2006).

V stresnih pogojih se inducira manjši ali večji del potencialno kolicin sintetizirajočih celic. Te začnejo proizvajati toksičen protein kolicin, ki se sprosti z lizo celice. Sproščen kolicin je letalen za vse bližnje celice, ki niso odporne (Riley, 1993).

Na zunanji membrani tarčnih celic kolicini prepoznajo določen receptor in se nanj vežejo. Na celice deluje na tri načine: tvorijo pore v celični membrani, delujejo kot RNA-aza ali DNA-aza in razgrajujejo dedni material ter inhibirajo proteinsko sintezo ali sintezo mureina (Riley in Wartz, 2002).

2.5.6 Nespecifične nukleaze – genotoksini

2.5.6.1 Usp

Leta 2000 so poročali o domnevнем otoku patogenosti, ki je bil najpogosteje prisoten pri uropatogenih sevih *E. coli*, izoliranih iz fekalnih vzorcev. Ugotovili so, da je na otoku patogenosti tudi gen *usp*, z zapisom za 346 aminokislin velik protein. Zaradi mnenja, da je protein specifičen za uropatogene seve, so ga poimenovali *usp* (angl. uropathogenic specific protein, *Usp*) (Kurazono in sod., 2000).

2.6 SEKVENČNA SKUPINA ST131

E. coli iz sekvenčne skupine ST131 pripada filogenetski podskupini B2₃ in serološki skupini O25b:H4 (Clermont in sod., 2009). Za *E. coli* iz omenjene skupine je značilno, da ima pogosto genske zapise za odpornost proti betalaktamom in kinolonom. Prav tako je opažena več kot 90-odstotna podobnost v prisotnosti genskih zapisov za dejavnike virulence (Nicolas-Chanoine in sod., 2007).

E. coli iz skupine ST131 lahko izloča različne tipe encimov ESBL (Coelho in sod., 2010). Najpogosteje jo povezujejo z encimi iz skupine CTX-M, predvsem s CTX-M-15 (Nicolas-Chanoine s sod., 2007). Sevi, ki imajo encim CTX-M-15, pogosto izločajo tudi betalaktamazi OXA-1 in TEM-1 ter različico aminoglikozidno modificiranega encima AAC(6')-Ib-cr, ki je odgovoren za zmanjšano občutljivost bakterije za aminoglikozide in fluorokinolone (Peirano in Pitout, 2010).

Pogosto opisani geni za dejavnike virulence pri izolatih *E. coli* ST131 so *iha*, *fimH*, *sat*, *kpsM*, *fyuA*, *iutA*, *usp*, *traT*, *ompT*, *flu* in *malX* (Nicolas-Chanoine in sod., 2007; Johnson in sod., 2009; Johnson in sod., 2010).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 BAKTERIJSKI IZOLATI

3.1.1 Izolati *E. coli* iz živil živalskega izvora

V raziskavi smo analizirali 526 vzorcev živil živalskega izvora, in sicer perutninsko, svinjsko, goveje in konjsko meso. Pregledali smo tudi mesne izdelke (mleto meso, mesne pripravke, pasterizirane mesnine, sušene mesnine, tatarski biftek in zaseko), mleko (kravje, kozje) in mlečne izdelke (jogurt, sir, skuto, smetano in maslo), jajca in jajčne izdelke (beljak, cela jajca, jajčni melanž, jajca v prahu in rumenjak) ter morske sadeže in izdelke iz ribjega mesa (bakala) in školjke (klapavice, ladinke in ostrige). Vzorci so bili pridobljeni v okviru nacionalnega monitoringa ali pa so vzorce prinesli na Inštitut za varno hrano, krmo in okolje nosilci živilske dejavnosti sami. Iz živil smo izolirali 245 sevov *E. coli*, ki smo jih uporabili v naši raziskavi.

Tabela 6: Seznam analiziranih vzorcev živil živalskega izvora.

Table 6: List of samples of animal origin analyzed in this study.

Vzorci	Št. preiskanih vzorcev na <i>E. coli</i> 2010	Št. (%) pozitivnih na <i>E. coli</i> 2010	Št. preiskanih vzorcev na <i>E. coli</i> 2011	Št. (%) pozitivnih na <i>E. coli</i> 2011	Skupno št. pregledanih vzorcev
Meso in mesni izdelki					
Goveje meso	20	6 (30,0 %)	13	7 (53,8 %)	33
Konjsko meso	0	0	1	1 (100 %)	1
Svinjsko meso	10	3 (30,0 %)	3	1 (33 %)	13
Puranja koža	7	3 (42,9 %)	0	0	7
Puranje meso	8	2 (25,0 %)	0	0	8
Mesni pripravki	14	6 (42,9 %)	90	49 (54,4 %)	104
Mleto meso	4	2 (50,0 %)	40	27 (67,5 %)	44
Pasterizirane mesnine	0	0	35	3 (8,6 %)	35
Sušene mesnine	1	1 (100 %)	82	13 (15,9 %)	83
Tatarski biftek	0	0	6	5 (83,3 %)	6
Zaseka	0	0	10	3 (30,0 %)	10

Se nadaljuje.

Nadaljevanje Tabela 6: Seznam analiziranih vzorcev živil živalskega izvora.
 Sequel Table 6: List of samples of animal origin analyzed in this study.

Vzorci	Št. preiskanih vzorcev na <i>E. coli</i> 2010	Št. (%) pozitivnih na <i>E. coli</i> 2010	Št. preiskanih vzorcev na <i>E. coli</i> 2011	Št. (%) pozitivnih na <i>E. coli</i> 2011	Skupno št. pregledanih vzorcev
Mleko					
in mlečni izdelki					
Kozji jogurt	0	0	1	0	1
Kozji sir	0	0	1	1 (100 %)	1
Kozja skuta	0	0	2	2 (100 %)	2
Kozje mleko	0	0	5	4 (80,0 %)	5
Kravji jogurt	0	0	4	0	4
Kravji sir	0	0	10	0	10
Kravja skuta	0	0	6	3 (50,0 %)	6
Kravje mleko	1	0	15	9 (60,0 %)	16
Ovčji jogurt	0	0	1	0	1
Ovčja skuta	0	0	1	0	1
Maslo	0	0	1	1 (100 %)	1
Smetana	0	0	1	0	1
Jajca in jajčni izdelki					
Beljak	0	0	2	1 (50,0 %)	2
Cela jajca	0	0	4	0	4
Jajčni melanž	0	0	7	4 (57,1 %)	7
Jajca v prahu	0	0	5	0	5
Rumenjak	0	0	2	1 (50,0 %)	2
Školjke in ribji izdelki					
Klapavice	3	1 (33,3 %)	97	76 (78,4 %)	100
Ladinke	2	2 (100 %)	6	6 (100 %)	8
Ostrige	1	0	0	0	1
Morski sadeži	0	0	2	1 (50,0 %)	2
Bakala	0	0	2	1 (50,0 %)	2
	71	26	455	219	526

3.1.2 Humani bakterijski izolati za ESBL pozitivne *E. coli* (klinični izolati)

Zaradi primerjave z človeškimi izolati smo v doktorskem delu uporabili podatke iz diplomske naloge (Molan, 2013) zbirko izolatov ESBL pozitivnih *E. coli* iz spodnjih dihal, ki so jih izolirali in identificirali na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani. V okviru doktorskega dela smo izolate še dodatno analizirali na prisotnost dejavnikov virulence, in sicer na adhezin Hra in genotoksin Usp. Uporabili smo 43 izolatov, izoliranih pri istem številu bolnikov in zbranih v letu 2011. Vključeni so bili samo prvi izolati pri posameznem bolniku.

Poleg podatkov o izolatih iz spodnjih dihalnih poti smo v raziskavi uporabili še podatke o skupini ESBL, uvrstitvi sevov v filogenetsko skupino in prisotnosti virulenčnega dejavnika adhezina FimH dobljene iz analize 56 ESBL pozitivnih sevov *E. coli* iz diplomske naloge (Velikonje, 2013). Izolati so bili pridobljeni iz različnih kužnin (urogenitalnega trakta, krvi, brisov ran in rektuma), izolirali in identificirali so jih v bolnišnici Dr. Franca Derganca v Šempetru pri Novi Gorici. Izolati so bili pridobljeni v letih 2009 in 2010. V okviru našega doktorskega dela smo izolate analizirali še na prisotnost genov *qnrA*, *B* in *S* ter na prisotnost 13 dejavnikov virulence. Preverjali smo prisotnost genov za (*iha*, *hra*, *sat*, *vat*, *fluA*, *kpsMTII*, *ompT*, *traT*, *iss*, *iutA*, *FyuA*, *irp-2* in *usp*).

3.1.3 Humani črevesni izolati *E. coli* (klinični izolati)

V raziskavi smo analizirali tudi 55 izolatov, osamljenih leta 2010 in 2011, iz vzorcev iztrebkov bolnikov z diarejo. Izolati so bili osamljeni in identificirani v Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano (NLZOH).

Vsi vzorci iztrebkov so bili nasajeni na krvni agar (Blood agar base No. 2, Oxoid, VB, z dodatkom 5 % goveje krvi) in dodatno na gojišče brom timol modro (Blood agar base No. 2, Oxoid, VB, barvilo brom thymol blue, z dodatkom 1 % kristal violet, natrijevtiosulfat pentahidrat, lakoza monohidrat; BTB). Plošče so bile inkubirane 16–20 ur aerobno pri 37 °C. Izolati s tipično morfologijo za *E. coli* na krvnem in agarju BTB so bili potrjeni s klasično biokemično metodo IMViC (Indol, metil rdeče, Voges-Proskauer in citrat).

Pri vseh izolatih so na NLZOH preverili prisotnost naslednjih genov, povezanih z virulenco: *vtx1*, *vtx2*, *eae*, *eltA*, *estA*, *ipaH*, *aap* in *aggR*. Samo en izolat je bil pozitiven za gen *aap*, vsi ostali so bili negativni za vse testirane dejavnike virulence.

3.2 GOJIŠČA in PUFRI

3.2.1 Priprava fiziološke raztopine (FR)

Fiziološko raztopino smo pripravili tako, da smo v 1000 ml destilirane vode raztopili 8,5 g NaCl (Merck, Nemčija) in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

3.2.2 Priprava peptonske vode (pH = 7,0 ± 0,2) (PV)

Peptonsko vodo smo pripravili tako, da smo 30 g liofiliziranega peptona (Buffered Peptone Water, Biolife, Italija) raztopili v 1500 ml destilirane vode in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

3.2.3. Priprava gojišča MMMB (Minerals Modified Glutamate Medium Base)

Tekoče gojišče smo pripravili tako, da smo zatehtali 11,40 g gojišča (Mineral Modified Medium Base, Oxoid, Velika Britanija), 6,35 g natrijevega glutamata (Oxoid) in 2,5 g amonijevega klorida (Merck, Nemčija). Vse skupaj smo raztopili v 1000 ml destilirane vode in avtoklavirali 10 minut pri 116 °C.

3.2.4 Priprava gojišča TBX (Tryptone Bile X-Glucuronide Agar)

Trdno gojišče TBX smo pripravili tako, da smo 36,6 g liofiliziranega gojišča (Tryptone Bile X-Glucuronide Agar, Biolife, Italija) raztopili v 1000 ml destilirane vode. Raztopljeno gojišče smo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Ko se je gojišče ohladilo na približno 55 °C, smo ga vlili v sterilne plastične petrijeve plošče in ga pustili, da se strdi.

3.2.5 ChromID ESBL agar

Kupljeno komercialno pripravljeno gojišče ChromID ESBL agar (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, Francija).

3.2.6 Krvni agar (KA)

Krvni agar smo pripravili tako, da smo 40,0 g liofiliziranega gojišča (Blood agar base, No. 2, Oxoid, VB) raztopili v 1000 ml destilirane vode in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Po ohlajanju na približno 48 °C smo dodali 50 ml defibrinirane ovčje krvi, ga dobro premešali in razlili v sterilne petrijeve plošče.

3.2.7 Gojišče Mueller-Hinton (MH)

Gojišče Mueller-Hinton smo pripravili tako, da smo 38,0 g liofiliziranega gojišča (Mueller-Hinton agar, Merck, Nemčija) raztopili v 1000 ml destilirane vode in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Po avtoklaviranju smo ga razlili v sterilne petrijeve plošče po 28 ml oziroma toliko, da je bila končna debelina gojišča 4 mm.

3.2.8 Etilendiamintetraocetna kislina (angl. Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)

EDTA smo pripravili tako, da smo zatehtali 93,6 mg EDTA (Sigma-Aldrich, ZDA) in dodali destilirano vodo do oznake 500 ml. Dodajali smo 10 mM NaOH do želenega pH 8,0.

3.2.9 Pufer 5 X tris/borat/EDTA (angl. Tris/borate/EDTA, TBE)

Pufre 5X TBE smo pripravili tako, da smo zatehtali 54 g baze Tris (Sigma-Aldrich, ZDA) in 27,5 g borove kisline (Riedel de haën, Nemčija) ter dodali 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0). Vse skupaj smo raztopili v destilirani vodi do končnega volumna 1000 ml.

3.2.10 NaOH (natrijev hidroksid)

1 M NaOH smo pripravili tako, da smo zatehtali 4g NaOH (Merck, Nemčija) ter dodali destilirano vodo do oznake 100 ml.

3.3 PRIBOR IN OPREMA

- accu-jet (Brand, Nemčija),
- autoinokulator Sensititer AIM (Trek Diagnostic Systems, Velika Britanija),
- avtoklav (Kambič, Semič, Slovenija),
- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija),
- cepilne zanke za enkratno uporabo (1 µl, 10 µl) (Biostea, Golias labortehnika, Slovenija),
- ciklični termostat GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, ZDA),
- ciklični termostat UNO II (Biometra GmbH, Nemčija),
- ciklični termostat BIO-RAD MyCycler™ (Hercules, ZDA),
- dozirne glavice (Trek Diagnostic Systems, Velika Britanija),
- gnetilnik (Interscience, Francija),
- kadičke za elektroforezo Hoefer™-HE33, mini horizontal submarine unit (Amersham Biosciences, Velika Britanija),
- laboratorijske rokavice za enkratno uporabo (Kimtech, Velika Britanija),
- magnetno mešalo (Tehtnica, Železniki, Slovenija),
- MALDI-TOF (angl. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry, Bruker Daltonics, Nemčija)
- mikrocentrifugirke (Eppendorf, Nemčija),
- mikrocentrifugirke za verižno reakcijo s polimerazo (PCR) – 200 µl (MicroAmp, Perkin Elmer, ZDA),
- mikrovalovna pečica (Gorenje, Slovenija),
- namizna centrifuga, Eppendorf Centrifuge 5417C (Eppendorf, Nemčija),
- namizna centrifuga, Eppendorf Centrifuge 29571 MiniSpin Plus (Eppendorf, Nemčija),
- nastavki za avtomatske pipete z različnim volumnom,
- nosilec za vlivanje agaroznega gela in glavnik za jamice (Amersham Biosciences, Velika Britanija),
- plastične epruvete (Sarstedt AG & Co., Nemčija),
- plastične Petrijeve posode – petrijevke (Golias labortehnika, Slovenija),
- plinski gorilnik (Tlos, Hrvaška),

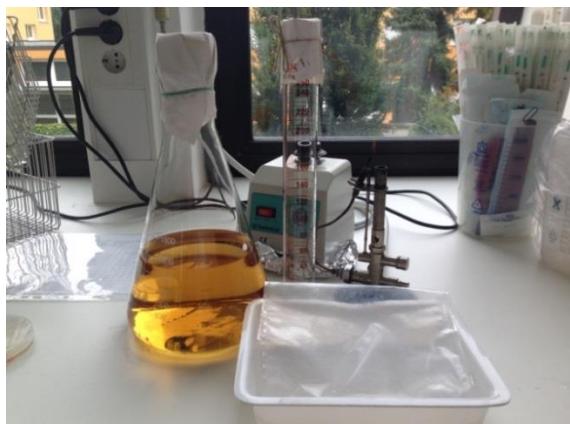
- serološke pipete z različnim volumnom (Eppendorf, Nemčija),
- sistem za elektroforezo DNA 2301 Macrodrive 1 (LKB Bromma, Švedska),
- sterilne vrečke za gnetilnik brez filtra (Golias, Slovenija),
- tehtnica (KernPFB, Nemčija),
- tehtnica (Sartorius AX2202, Nemčija),
- termostati (Ehret, Velika Britanija), kalibrirani za temperaturo 36–38 °C,
- termostat (Binder, Nemčija), kalibriran za temperaturo 34–36 °C,
- termostat (Kambič, Semič, Slovenija), kalibriran za temperaturo 36–38 °C,
- transiluminator BIO View UV-light UXDT-20ML-15R (Biostep GmbH, Nemčija),
- vibracijski mešalnik (Tehtnica, Železniki, Slovenija),
- vodna kopel Multitemp II 2219 (LKB Bromma, Švedska).

3.4 FENOTIPSKE METODE

3.4.1 Izolacija in identifikacija sevov

E. coli smo iz mesa in mesnih izdelkov, mleka in mlečnih izdelkov ter jajc izolirali tako, da smo sterilno odvzeli po 25 g vzorca, dodali 225 ml peptonske vode in homogenizirali v gnetilniku. Tako pripravljen vzorec smo inkubirali 16–20 ur pri 37 °C. Naslednji dan smo vzorec precepili na dve trdni selektivni gojišči, in sicer TBX in ChromID ESBL agar. Kulturo na gojišču TBX smo inkubirali 24–48 ur pri 44 °C, na gojišču ChromID ESBL pa pri 37 °C. Po inkubaciji smo pregledali kulture na TBX na prisotnosti modrih in modrozelenih kolonij, ki so značilne za betaglukuronidaza pozitivne bakterije *E. coli* (ISO/TS 16649-1). Na gojišču ChromID ESBL pa so bile potencialne ESBL *E. coli* kolonije, roza do rdečerjavo obarvane.

Iz školjk smo *E. coli* izolirali z uporabo metode MPN. Sterilno smo odvzeli 50 g celotne vsebine školjk in dodali 9 kratno količino fiziološke raztopine. Homogeniziran vzorec smo nasadili v obogatitveno gojišče MMMB (angl. Minerals modified glutamate medium base) v 4 različnih razrečitvah. Tako pripravljene vzorce smo inkubirali 24 ur pri 37 °C. V primeru, da se je spremenila barva gojišča iz vijolične v rumeno, smo z 10 µl zanko precepili na plošči TBX in ChromID ESBL agar. Nadalje smo postopali enako kot zgoraj.



Slika 4 (levo): Zalivanje vzorca s tekočim predobogatitvenim gojiščem PV.

Figure 4 (left): Enriching sample with enrichment medium PV.



Slika 5 (desno): Presajanje iz tekočega predobogatitvenega gojišča PV na trdno selektivno gojišče TBX.

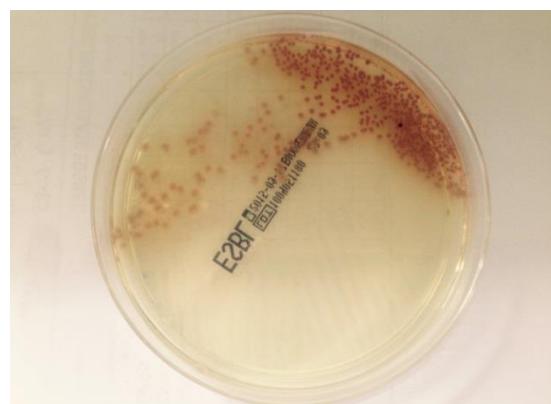
Figure 5 (right): Subculturing from enrichment medium PV to a TBX plate.

Modre in modrozelene kolonije z gojišča TBX smo presadili na gojišče KA ter inkubirali čez noč pri 37 °C. Bakterije vrste *E. coli* tvorijo na gojišču KA sive gladke kolonije. Bakterije iz rodu *Escherichia* razgrajujejo številne ogljikove hidrate, pri tem pa nastajata kislina in plin. S testi IMViC (Indol, metil rdeče, Voges-Proskauer in citrat) oziroma kratke biokemijske preiskave smo ločili *E. coli* od ostalih predstavnikov družine *Enterobacteriaceae*. Seve smo dodatno determinirali s komercialnim biokemijskim kompletom API 20 E (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francija). Kasneje smo izolate bakterije *E. coli* dodatno identificirali še z metodo masne spektrometrije za identifikacijo bakterij s tehnologijo MALDI-TOF.



Slika 6 (levo): Modrozelene kolonije na selektivnem gojišču TBX.

Figure 6 (left): Blue green colonies on selective TBX agar plate.



Slika 7 (desno): Rdečerjave kolonije na selektivnem gojišču ChromID ESBL agar.

Figure 7 (right): Red brown colonies on selective ChromID ESBL agar plate.

3.4.2 Fenotipsko dokazovanje ESBL *E. coli*

3.4.2.1 Antibiogram z disk difuzijsko metodo

Izolate bakterij, izoliranih iz živil živalskega izvora (meso in mesni izdelki, mleko in mlečni izdelki ter jajca), smo za ugotavljanje občutljivosti za antibiotike gojili na trdnem neselektivnem gojišču KA. Kulturo bakterij smo po 24-urni inkubaciji prenesli v 5 ml fiziološke raztopine ter dobro suspendirali. Tako smo dobili primerno gostoto suspenzije, kar pomeni, da smo po inkubaciji dobili difuzno rast kolonij, ki so se med seboj stikale, a smo še vedno lahko razločili njihove robove.

Sterilno vatenko smo namočili v pripravljeno bakterijsko suspenzijo, jo pritisnili ob steno epruvete, da smo iztisnili odvečno tekočino, nato pa jo prenesli na trdno gojišče MH. Z vatenko smo nežno premazali gojišče v treh smereh, ki so si pod kotom 60 °. Na koncu smo premazali še rob gojišča. Gojišče smo pustili pri sobni temperaturi približno 3–5 minut, da se je tekočina dobro vpila. S sterilno pinceto smo nanesli izbrane antibiotične diske (Sensi-Discs Antimicrobial Susceptibility, Becton Dickinson and Company, Sparks, ZDA), ki smo jih rahlo pritisnili na površino gojišča. Razdalja med središči diskov je bila večja od 24 mm. Penicilinske in cefalosporinske diske smo namestili najmanj 10 mm od roba petrijevke, njihovi centri pa so bili med seboj oddaljeni najmanj 30 mm.

Najkasneje po 15 minutah od nanosa diskov smo plošče inkubirali aerobno, 16–18 ur pri 37 °C. Po inkubaciji smo izmerili cono inhibicije ter v ustrezni tabeli odčitali rezultate skladno s priporočili standarda CLSI (angl. Clinical and Laboratory Standards Institute, (Standard M100-S25, 2015)).

Z disk difuzijsko metodo smo izolate *E. coli* iz mesa in mesnih izdelkov, mleka in mlečnih izdelkov ter jajc in jajčnih izdelkov, preverjali glede občutljivosti za naslednje antibiotike: ampicilin, amoksicilin s klavulansko kislino, ciprofloksacin, cefalotin, enrofloksacin, gentamicin, kanamicin, kloramfenikol, nalidiksna kislina, neomicin, streptomycin, trimetoprim s sulfametoksazolom, trimetoprim, tetraciklin, florfenikol, sulfonamide, imipenem in ertapenem. Indikatorski antibiotiki za ESBL so bili cefpodoksim, cefotaksim, cefotaksim s klavulansko kislino, ceftazidim, ceftazidim s klavulansko kislino. Indikatorski antibiotik za AmpC je bil cefoksitin.

Občutljivost za indikatorske antibiotike za ESBL in AmpC smo ocenili glede na odčitane koncentracije po sledečih kriterijih:

• Cefpodoksim (10 µg)	≤ 17 mm	Zmanjšanje cone inhibicije rasti bakterij okrog diska z indikatorskim antibiotikom pod predpisano mejo nakazuje na sev z ESBL oz. AmpC.
• Ceftazidim (30 µg)	≤ 22 mm	
• Cefotaksim (30 µg)	≤ 27 mm	
• Ceftriakson (30 µg)	≤ 25 mm	
• Cefoksitin (30 µg)	≤ 14 mm	

3.4.2.2 Primarni test z dvojnim diskom (CLSI)

Postopek temelji na disk-difuzijskem testu po Kirby-Bauerju. Rezultat smo ocenili kot pozitiven, če se je premer cone inhibicije okrog diska s cefalosporinom (ceftazidima in/ali cefotaksima) povečal v smeri diska z amoksicilinom in klavulansko kislino, ki smo ga namestili med oba cefalosporina. Ceftriakson in cefpodoksim smo uporabili kot dodatna indikatorska antibiotika. Z uporabo večjega števila potrditvenih testov smo izboljšali občutljivost metode.

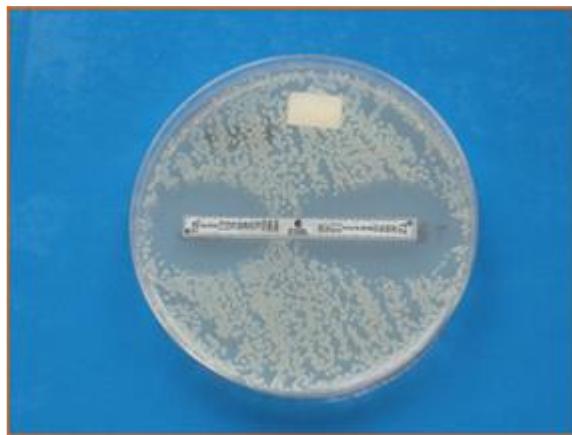
V primeru zmanjšanja cone pri enem ali več indikatorskih diskih smo opravili še potrditveni test s kombinacijo diskov.

3.4.2.3 Potrditvena metoda s kombinacijo diskov (CLSI)

Test smo prav tako opravili na podlagi disk difuzijske metode v skladu s priporočili CLSI. Uporabili smo diske za ceftazidim in cefotaksim ter enaka diskova v kombinaciji s klavulansko kislino. Kadar je bil premer cone inhibicije okrog diska s samim antibiotikom vsaj 5 mm manjši kot okrog diska z enakim antibiotikom s klavulansko kislino, smo sev fenotipsko opredelili kot pozitiven za ESBL. Za potrditev je zadoščalo, da smo razliko ugotovili vsaj pri eni kombinaciji diskov.

3.4.2.4 Potrditvena metoda z antibiotičnimi trakovi (Etest)

V začetku naše raziskave smo uporabljali Etest (bioMerieux SA, Marcy l'Etoile, Francija) za potrditveno fenotipsko metodo. Ta temelji na uporabi testnih lističev, ki imajo na obeh koncih nanesen antibiotik v gradientnih koncentracijah. Na eni strani je indikatorski antibiotik sam, na drugi strani pa v kombinaciji s klavulansko kislino. Rezultate smo odčitali kot minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) za vsak posamezni antibiotik, zato so bili primerljivi z rezultati mikrodilucijske metode na mikrotitrskih ploščah, ki smo jo uvedli kasneje.



Slika 8: Etest. Na levem koncu je trak prepojen s cefalosporinom, na desnem pa s cefalosporinom v kombinaciji s klavulansko kislino.

Figure 8: Etest. On the left side the strip is soped with cephalosporin and on the right with cephalosporin in combination with clavulanic acid.

Ker se je v času poteka naše raziskave mikrodilucijska metoda uveljavila kot potrditveni test, smo pri novejših izolatih metodo z antibiotičnimi trakovi (Etest) opustili.

3.4.2.5 Potrditveni test z mikrodilucijsko metodo (minimalna inhibitorna koncentracija, MIC)

Osnova testa je mikrotitrská ploščica s 96 jamicami, v katerih so različni antibiotiki v več zaporednih dvakratnih koncentracijah.

Tabela 7: Razpored antibiotikov na mikrotitrski plošči ESB1F (Treck Diagnostic Systems, Velika Britanija) za fenotipsko potrditev sevov ESBL.

Table 7: Antibiotic distribution on microtiter plate formate ESB1F (Treck Diagnostic Systems, Great Britan) for phenotypic confirmation of ESBL strains.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AXO 1	AXO 2	AXO 4	AXO 8	AXO 16	AXO 32	AXO 64	AXO 128	MERO 1	MERO 2	MERO 4	MERO 8
B	CEP 8	CEP 16	POD 0,25	POD 0,5	POD 1	POD 2	POD 4	POD 8	POD 16	POD 32	CIP 1	CIP 2
C	FOT 0,25	FOT 0,5	FOT 1	FOT 2	FOT 4	FOT 8	FOT 16	FOT 32	FOT 64	GEN 4	GEN 8	GEN 16
D	F/C 0,12/4	F/C 0,25/4	F/C 0,5/4	F/C 1/4	F/C 2/4	F/C 4/4	F/C 8/4	F/C 16/4	F/C 32/4	F/C 64/4	AMP 8	AMP 16
E	TAZ 0,25	TAZ 0,5	TAZ 1	TAZ 2	TAZ 4	TAZ 8	TAZ 16	TAZ 32	TAZ 64	TAZ 128	FAZ 8	FAZ 16
F	T/C 0,12/4	T/C 0,25/4	T/C 0,5/4	T/C 1/4	T/C 2/4	T/C 4/4	T/C 8/4	T/C 16/4	T/C 32/4	T/C 64/4	T/C 128/4	POS CON
G	IMI 0,5	IMI 1	IMI 2	IMI 4	IMI 8	IMI 16	P/T 4/4	P/T 8/4	P/T 16/4	P/T 32/4	P/T 64/4	POS CON
H	FEP 1	FEP 2	FEP 4	FEP 8	FEP 16	FOX 4	FOX 8	FOX 16	FOX 32	FOX 64	NEG CON	POS CON

Legenda:

TAZ Ceftazidim

FAZ Cefazolin

FEP Cefepim

FOX Cefoksitin

CEP Cefalotin

POD Cefpodoksim

FOT Cefotaksim

AXO Ceftriakson

IMI Imipenem

MERO Meropenem

GEN Gentamicin

AMP Ampicilin

CIP Ciprofloksacin

P/T4 Piperacilin/tazobaktam

T/C Ceftazidim/klavulanska kislina

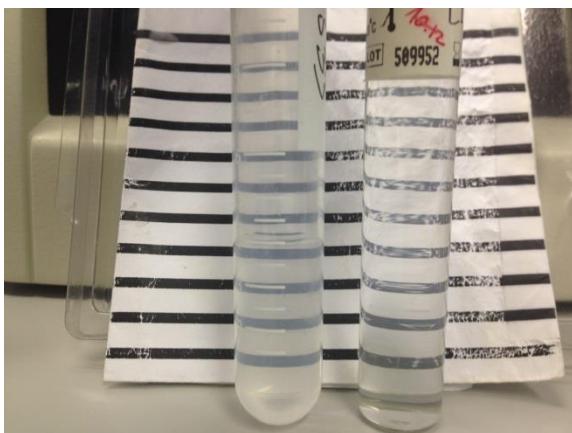
F/C Cefotaksim/klavulanska kislina

POS CON pozitivna kontrola

NEG CON negativna kontrola

V plastično epruveto smo odpipetirali 4 ml destilirane vode in v njej resuspendirali dve bakterijski koloniji. Z metodo po McFarlandu (slika 9: levo) smo umerili gostoto bakterijske suspenzije na 0,5. V komercialno pripravljeno gojišče Mueller-Hinton Broth (TREK Diagnostic Systems, ZDA) smo odpipetirali 10 µl bakterijske suspenzije in premešali z vibracijskim mešalnikom. S pomočjo avtoinokulatorja smo v vsako jamico na plošči ESB1F

(TREK Diagnostic Systems, ZDA) nanesli 50 µl pripravljene bakterijske suspenzije. Plošče smo inkubirali 24 ur pri 36 °C. Bakterijsko suspenzijo smo hkrati nasadili na gojišče KA in s tem preverili ustreznost gostote preiskovane kulture in morebitno kontaminacijo z drugimi bakterijami. Plošče smo inkubirali 16–20 ur pri 35 °C in nato odčitali rezultate na podlagi rasti bakterij pri različnih koncentracijah antibiotika. Vsaj 3-kratno zmanjšanje vrednosti MIC za ceftazidim in cefotaksim v prisotnosti klavulanske kisline je kazalo na ESBL. Na ploščo so naneseni tudi drugi antibiotiki, cefalosporini, karbapenemi, aminoglikozidi, penicilini, fluorkinoloni, kar nam je omogočilo ugotavljanje drugih oblik odpornosti (npr. cefoksitin za AmpC).



Slika 9 (levo): Umerjanje gostote bakterijske suspenzije z metodo po McFarlandu.
Figure 9 (left): Density moderation of bacterial suspension by McFarland method.



Slika 10 (desno): Mikrotitrská plošča ESB1F.
Figure 10 (right): Microtiter plate ESB1F.

3.4.2.6 Antibiogram po mikrodilucijski metodi za določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)

Seve *E. coli*, izolirane iz školjk, in seve *E. coli*, izolirane iz kliničnih vzorcev ljudi z driskami, smo pregledali glede odpornosti proti 14 različnim antibiotikom z mikrodilucijsko metodo. Za analizo smo uporabljali komercialno pripravljene plošče EUMVS2 oziroma EUVSEC (Trek Diagnostic Systems, Velika Britanija). Pregledali smo jih glede odpornosti proti sulfonamidom, gentamicinu, ciprofloksacinu, ampicilinu, cefotaksimu, ceftazidimu, tetraciklinu, meropenemu, azitromicinu, tigeziklinu, streptomicinu, trimetoprimu, kloramfenikolu, kolistinu, florfenikolu, kanamicinu in nalidiksni kislini.

3.5 GENOTIPSKE METODE

3.5.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

3.5.1.1 Priprava vzorčne DNA bakterijskega lizata

V mikrocentrifugirko (1,5 ml) smo odpipetirali 200 µl sterilne destilirane vode. Iz trdnega gojišča smo nato v mikrocentrifugirko prenesli polno cepilno zanko bakterij in jih suspendirali s kratkim mešanjem na vibracijskem mešalniku. Mikrocentrifugirke s suspendiranimi celicami smo segrevali 10 minut v vreli vodi. Potem smo jih centrifugirali v mini centrifugi pri 14.000 vrt./min pri sobni temperaturi. V novo mikrocentrifugirko smo odpipetirali 150 µl supernatanta, v katerem je bila celokupna celična DNA, ki smo jo uporabili kot matrično DNA za verižno reakcijo s polimerazo.

3.5.1.2 Začetni oligonukleotidi in razmere za pomnoževanje z reakcijo PCR

V tabeli 8 so navedeni začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri reakciji PCR za pomnoževanje genskih zapisov. V preglednici so navedene tudi razmere za pomnoževanje, pričakovana velikost pomnožka PCR ter referenca za metodo.

Tabela 8: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri reakciji PCR, njihovo nukleotidno zaporedje, razmere pomnoževanja, pričakovana velikost pomnožka PCR in referenca.

Table 8: Primers used in PCR reaction, primers, conditions, product size and references.

Gen/fragment DNA	Začetni oligonukleotidi (nukleotidno zaporedje 5' → 3')	Razmere pomnoževanja	Velikost pomnožka PCR(bp)	Referenca
Filog. skupine				
<i>chuA</i>	ChuA-1 GACGAACCAACGGTCAGGAT ChuA-2 TGCGGCCAGTACCAAAGACA	94 °C; 5 min 1x	279	Clermont in sod., 2000
		94 °C; 30 s		
<i>YjaA</i>	YjaA-1 TGAAGTGTCAAGGAGACGCTG YjaA-2 ATGGAGAATGCGTCCCTAAC	60 °C; 30 s 30x 72 °C; 30 s	211	
TspE4.C2	TspE4.C2-1 GAGTAATGTCGGGGCATTCA TspE4.C2-2 CGGCCAACAAAGTATTACG	72 °C; 7 min 1x	152	

Nadaljevanje Tabela 8: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri reakciji PCR, njihovo nukleotidno zaporedje, razmere pomnoževanja, pričakovana velikost pomnožka PCR in referenca.

Sequel Table 8: Primers used in PCR reaction, primers, conditions, product size and references.

Gen/fragment DNA	Začetni oligonukleotidi (nukleotidno zaporedje 5' → 3')	Razmere pomnoževanja	Velikost pomnožka PCR(bp)	Referenca
Adhezini				
<i>crl</i>	Crl-F TTTCGATTGTCTGGCTGTATG Crl-R CTTCAGATTCAAGCGTCGTC	95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s 64 °C; 30 s 30x 72 °C; 30 s 72 °C; 7 min 1x	250	Maurer in sod., 1998
		95 °C; 5 min 1x		
		94 °C; 30 s		
		55 °C; 30 s 30x		
<i>fimH</i>	FimH-1 AACAGCGATGATTCCAGTTGTGTG FimH-2 ATTGCGTACCAAGCATTAGCAATGTCC	72 °C; 60 s	465	Johnson in sod., 2000
		72 °C; 10 min 1x		
<i>iha</i>	Iha-F CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA Iha-R TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA	95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s 60 °C; 30 s 30x 72 °C; 60 s 72 °C; 10 min 1x	827	
		95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s 60 °C; 30 s 30x 72 °C; 60 s 72 °C; 10 min 1x		
<i>hra</i>	Hra-F TACGGTATTCACTGGCGGTATC Hra-R TCGTCCCTGTAACTCACACTGC	95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s 60 °C; 30 s 30x 72 °C; 60 s 72 °C; 10 min 1x	474	Trkov in sod., 2014
		95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s 60 °C; 30 s 30x 72 °C; 60 s 72 °C; 10 min 1x		
		95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s 55 °C; 30 s 30x 72 °C; 45 s 72 °C; 7 min 1x		
		95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s 55 °C; 30 s 30x 72 °C; 45 s 72 °C; 7 min 1x		
		95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s 55 °C; 30 s 30x 72 °C; 45 s 72 °C; 7 min 1x		
<i>papGII</i>	PapGII-F GGGATGAGCGGGCCTTGAT PapGII-R CGGGCCCCAAGTAACCTCG	95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s 55 °C; 30 s 30x 72 °C; 45 s 72 °C; 7 min 1x	190	Johnson in Brown, 1996
		95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s 55 °C; 30 s 30x 72 °C; 45 s 72 °C; 7 min 1x		
<i>eae</i>	EaeF GGYCAGCGTTTTCCCTCCTG ^a EaeR TCGTCACCARAGGAATCGGAG ^a	95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s 55 °C; 30 s 30x 72 °C; 45 s 72 °C; 7 min 1x	376	Glej opombo ^b
		95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s 55 °C; 30 s 30x 72 °C; 45 s 72 °C; 7 min 1x		
Avtotransporterji in toksini				
<i>sat</i>	Sat-F ACTGGCGGACTCATGCTGT Sat-R AACCTGTAAAGAAGACTGAGC	95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s 53 °C; 30 s 30x	387	Ruiz in sod., 2002
		72 °C; 60 s 72 °C; 10 min 1x		
<i>hbp</i>	Hbp-1 GGCGGACAATAAAGGACAGG Hbp-2 GGAGTTATCTGCCTGGATGG	72 °C; 60 s 72 °C; 10 min 1x	829	Trkov in sod., 2014
		72 °C; 60 s 72 °C; 10 min 1x		

Se nadaljuje.

Nadaljevanje Tabela 8: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri reakciji PCR, njihovo nukleotidno zaporedje, razmere pomnoževanja,pričakovana velikost pomnožka PCR in referenca.

Sequel Table 8: Primers used in PCR reaction, primers, conditions, product size and references.

Gen/fragment DNA	Začetni oligonukleotidi (nukleotidno zaporedje 5' → 3')	Razmere pomnoževanja	Velikost pomnožka PCR(bp)	Referenca
<i>astA</i>	AstA-F TGCCATCAACACAGTATATCC	95 °C; 5 min 1x	116	Yamamoto in Echeverria, 1996
	AstA-R TCAGGTCGCGAGTGACGGC	94 °C; 30 s 55 °C; 30 s 30x		
<i>vat</i>	Vat-F GAACACAGTTCATCTGATCTCC	72 °C; 90 s	419	Parham in sod., 2005
	Vat-R GAATATATCAAATTGGTCCCC	72 °C; 10 min 1x		
<i>fluA</i>	FluA-F GCGGTGTACTGCTGGCCG	95 °C; 5 min 1x	1637	Ambrožič Avguštin, neob.
	FluA-R CGTTGTGGCTGCCAGAC	94 °C; 30 s 55 °C; 30 s 30x 72 °C; 2 min 72 °C; 7 min 1x		
	Vtx1-F GTTTGCAGTTGATGTCAGAGGGA	95 °C; 5 min 1x		
	Vtx1-R CAACGAATGGCGATTATCTGC	94 °C; 30 s 50 °C; 30 s 30x		
	Vtx2-F GCCTGTCGCCAGTTATCTGACA	72 °C; 40 s		
<i>vtx2</i>	Vtx2-R GGAATGCAAATCAGTCGTCACTC	72 °C; 10 min 1x	421	Glej opombo ^b
	Cnf-1 TCGTTATAAAATCAAACAGTG	95 °C; 5 min 1x		
	Cnf-2 CTTTACAATATTGACATGCTG	94 °C; 30 s 50 °C; 30 s 30x 72 °C; 45 s 72 °C; 10 min 1x		
	Cnf2-F TATCATACGGCAGGAGGAAGCACC	95 °C; 5 min 1x		
	Cnf2-R GTCACAATAGACAATAATTTCG	94 °C; 30 s 55 °C; 30 s 30x 72 °C; 90 s 72 °C; 7 min 1x		
<i>sta</i>	STa-1 TCTTCCCCTCTTTAGTCAG	95 °C; 5 min 1x	166	Chapman in sod., 2006
	STa-2 ACAGGCAGGATTACAACAAAC	94 °C; 30 s 53 °C; 30 s 30x		
<i>eltA</i>	EltA-F GCACACGGAGCTCCTCAGTC	72 °C; 30 s	218	Vidal in sod., 2005
	EltA-R TCCTTCATCCTTCAATGGCTTT	72 °C; 10 min 1x		

Se nadaljuje.

Nadaljevanje Tabela 8: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri reakciji PCR, njihovo nukleotidno zaporedje, razmere pomnoževanja, pričakovana velikost pomnožka PCR in referenca.

Sequel Table 8: Primers used in PCR reaction, primers, conditions, product size and references.

Gen/fragment DNA	Začetni oligonukleotidi (nukleotidno zaporedje 5' → 3')	Razmere pomnoževanja	Velikost pomnožka PCR(bp)	Referenca
<i>estII</i>	STb-1 ATCGCATTCTTCTTCATC STb-2 GGGCGCCAAAGCATGCTCC	95 °C; 5 min 1x	172	Chapman in sod., 2006
		94 °C; 30 s		
		50 °C; 30 s 30x		
		72 °C; 30 s		
		72 °C; 10 min 1x		
<i>ehxA</i>	Hlyen 1 GGTGAGCAGAAAAAGTTGTAG Hlyen 2 TCTCGCCTGATAGTGTGTTGGTA	95 °C; 5 min 1x	1551	Trkov in sod., 2014
		94 °C; 30 s		
		60 °C; 30 s 30x		
		72 °C; 90 s		
		72 °C; 10 min 1x		
Dejavniki povezani z imunskim sistemom				
<i>kpsMTII</i>	KpsMTII-F GCGCATTGCTGATACTGTTG KpsMTII-R CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	95 °C; 5 min 1x	272	Johnson in Stell, 2000
		94 °C; 30 s		
		55 °C; 30 s 30x		
		72 °C; 60 s		
		72 °C; 10 min 1x		
<i>iss</i>	Iss-F ACGATACTCCGTAGCCAGAGAT Iss-R ATGAACAGTGCAGATGAGCTCC	95 °C; 5 min 1x	309	Ambrožič Avguštin, neob.
		94 °C; 30 s		
		53 °C; 30 s 30x		
		72 °C; 60 s		
		72 °C; 10 min 1x		
<i>traT</i>	TraT-F GGTGGGTGCGATGAGCACAG TraT-R CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	95 °C; 5 min 1x	280	Johnson in Stell, 2000
		94 °C; 30 s		
		55 °C; 30 s 30x		
		72 °C; 45 s		
<i>ompT_A</i>	OmpT _A -F CAGAGTATCTGCGGTGCCTCA OmpT _A -R TACGGTCCATGTTCCCTCGAC	72 °C; 10 min 1x	581	Trkov in sod., 2014
		95 °C; 5 min 1x		
<i>tcp</i>	tcpC for GGCAACAATATGTATAATATCCT tcpC rev GCCAGTCTATTCTGCTAAA	94 °C; 30 s	386	Cirl in sod., 2008
		50 °C; 30 s 30x		
		72 °C; 30 s		
		72 °C; 10 min 1x		

Se nadaljuje.

Nadaljevanje Tabela 8: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri reakciji PCR, njihovo nukleotidno zaporedje, razmere pomnoževanja, pričakovana velikost pomnožka PCR in referenca.

Sequel Table 8: Primers used in PCR reaction, primers, conditions, product size and references.

Gen/fragment DNA	Začetni oligonukleotidi (nukleotidno zaporedje 5' → 3')	Razmere pomnoževanja	Velikost pomnožka PCR (bp)	Referenca
Privzem železa				
<i>iucD</i>	AERA s ACAAAAAAGTTCTATCGCTTCC AERA as CCTGATCCAGATGATGCTC	95 °C; 5 min 1x	714	Janßen in sod., 2001
		94 °C; 30 s		
		53 °C; 30 s 30x		
		72 °C; 60 s		
		72 °C; 10 min 1x		
<i>iroN</i>	IroN-1 AAGTCAAAGCAGGGTTGCCG IroN-2 GACGCCGACATTAAGACGCAG	95 °C; 5 min 1x	665	Johnson in sod., 2000
		94 °C; 30 s		
		55 °C; 30 s 30x		
		72 °C; 45 s		
		72 °C; 7 min 1x		
<i>irp2</i>	Irp2-F AAGGATTGCTGTTACCGGAC Irp2-R TCGTGGGCAGCGTTCTTCT	95 °C; 5 min 1x	286	Schubert in sod., 1998
		94 °C; 30 s		
		53 °C; 30 s 30x		
		72 °C; 30 s		
		72 °C; 10 min 1x		
<i>fyuA</i>	FyuA-F TGATTAACCCCCGCGACGGAA FyuA-R CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	95 °C; 5 min 1x	880	Schubert in sod., 1998
		94 °C; 30 s		
		60 °C; 30 s 30x		
		72 °C; 60 s		
		72 °C; 10 min 1x		
<i>iutA</i>	IutA-F GGCTGGACATCATGGAACTGG IutA-R CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	95 °C ; 5 min 1x	302	Johnson in sod., 1991
		94 °C – 30 s		
		64 °C; 30 s 30x		
		72 °C; 60 s		
		72 °C; 7 min 1x		

Se nadaljuje.

Nadaljevanje Tabela 8: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri reakciji PCR, njihovo nukleotidno zaporedje, razmere pomnoževanja,pričakovana velikost pomnožka PCR in referenca.

Sequel Table 8: Primers used in PCR reaction, primers, conditions, product size and references.

Gen/fragment DNA	Začetni oligonukleotidi (nukleotidno zaporedje 5' → 3')	Razmere pomnoževanja	Velikost pomnožka PCR (bp)	Referenca
Mikrocin V				
<i>cvi</i>	Cvi-F TGGTAGAATGTGCCAGAGCAAG Cvi-R GAGCTGTTGTAGCGAAGCC	95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s 55 °C; 30 s 30x 72 °C; 90 s 72 °C; 10 min 1x	1181	Dozois in sod., 1992
Genotoksin				
<i>usp</i>	UspDe-F ATGCTACTGTTCCGGGTAGTGTGT UspDe-R CRTGTAGTCKGGGSGTAACAAT ^c	95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s 55 °C; 30 s 30x 72 °C; 120 s 72 °C; 7 min 1x	1024	Ambrožič Avguštin, neob.
PMQR				
<i>qnrA</i>	QnrAm-F AGAGGATTCTCACGCCAGG QnrAm-R TGCCAGGCACAGATCTTGAC	95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s	580	Cattoir in sod., 2008
<i>qnrB</i>	QnrBm-F GGMATHGAAATTGCCACTG ^a QnrBm-R TTTCYGYCGCCAGTCGAA ^a	50 °C; 30 s 30x 72 °C; 60 s 72 °C; 7 min 1x	264	
<i>qnrS</i>	QnrSm-F GCAAGTTCATTGAACAGGGT QnrSm-R TCTAAACCGTCGAGTCGGCG		428	

Se nadaljuje.

Nadaljevanje Tabela 8: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri reakciji PCR, njihovo nukleotidno zaporedje, razmere pomnoževanja, pričakovana velikost pomnožka PCR in referenca.
Sequel Table 8: Primers used in PCR reaction, primers, conditions, product size and references.

Gen/fragment DNA	Začetni oligonukleotidi (nukleotidno zaporedje 5' → 3')	Razmere pomnoževanja	Velikost pomnožka PCR (bp)	Referenca
Beta-laktamaze				
Skupina CTX – M1	CTX-M1-F AAAAATCACTGCGCCAGTTC CTX-M1-R AGCTTATTACATGCCACGTT	94 °C; 5 min 1x	415	Woodford in sod., 2006
Skupina CTX – M2	CTX-M2-F CGACGCTACCCCTGCTATT CTX-M2-R CCAGCGTCAGATTTTCAGG		552	
Skupina CTX – M8	CTX-M8-F TCGCGTTAACGGATGATGC CTX-M8-R AACCCACGATGTGGGTAGC	94 °C; 25 s 52 °C; 40 s 30x 72 °C; 50 s	666	
Skupina CTX – M9	CTX-M9-F CAAAGAGAGTGCAACGGATG CTX-M9-R ATTGGAAAGCGTTCATCACC	72 °C; 6 min 1x	205	
Skupina CTX – M25	CTX-M25-F GCACGATGACATTGGGG CTX-M25-R AACCCACGATGTGGGTAGC	95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s 55 °C; 30 s 30x 72 °C; 60 s 72 °C; 10 min 1x	327	Horton in sod., 2011
<i>bla</i> CTX-M1	CTXM-1seqF CCCATGGTTAAAAAACACTGC CTXM-1seqR CAGCGCTTTGCCGTCTAAG		945	
<i>bla</i> CTX-M9	CTXM-9seqF GTGACAAAGAGAGTGCAACGG CTXM-9seqR ATGATTCTGCCGCTGAAGCC	95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s 55 °C; 30 s 30x 72 °C; 60 s 72 °C; 10 min 1x	856	Briñas 2003
tsoTEM	TSO-T_for CATTCCGTGTCGCCCTTATT TSO-T_rev CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s 55 °C; 30 s 30x 72 °C; 60 s 72 °C; 10 min 1x	800	Dallenne in sod., 2010
tsoSHV	TSO-S_for AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC TSO-S_rev ATCCCGCAGATAAATCACCAC	95 °C; 3 min 1x 94 °C; 30 s 50 °C; 30 s 30x 72 °C; 80 s 72 °C; 10 min 1x	730	
<i>bla</i> TEM	TEM-F ATAAAATTCTTGAAGACGAAA TEM-R GACAGTTACCAATGCTTAATCA	95 °C; 3 min 1x 94 °C; 30 s 50 °C; 30 s 30x 72 °C; 80 s 72 °C; 10 min 1x	1080	Ling Ma in sod., 2005

Se nadaljuje.

Nadaljevanje Tabela 8: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri reakciji PCR, njihovo nukleotidno zaporedje, razmere pomnoževanja, pričakovana velikost pomnožka PCR in referenca.

Sequel Table 8: Primers used in PCR reaction, primers, conditions, product size and references.

Gen/fragment DNA	Začetni oligonukleotidi (nukleotidno zaporedje 5' → 3')	Razmere pomnoževanja	Velikost pomnožka PCR (bp)	Referenca
<i>blaSHV</i>	SHV-F GGGTTATTCTTATTGTGCGC SHV-R TTAGCGTTGCCAGTGCTC	95 °C; 3 min 1x 94 °C; 30 s 55 °C; 30 s 30x 72 °C; 90 s 72 °C; 10 min 1x	927	Ling Ma in sod., 2005
AmpC				
<i>dha</i>	DHAMF AACTTCACAGGTGTGCTGGGT DHAMR CCGTACGCATACTGGCTTG		405	Pérez-Pérez in Hanson, 2002
<i>acc</i>	ACCMF AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA ACCMR TTCGCCGCAATCATCCCTAGC		346	
<i>cit</i>	CITMF TGGCCAGAACTGACAGGCAAA CITMR TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	94 °C; 5 min 1x	462	
<i>ebc</i>	EBCMF TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG EBCMR CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	64 °C; 30s 30x 72 °C; 60 s	302	
<i>fox</i>	FOXMF AACATGGGTATCAGGGAGATG FOXMR CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	72 °C; 7 min 1x	190	
<i>mox</i>	MOXMF GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT MOXMR CACATTGACATAGGTGTGGTGC		520	
<i>blaCMY - 2</i>	CMY-2-Fseq ATGATGAAAAAATCGTTATGCTGC CMY-2-Rseq GCTTTCAAGAATGCGCCAGG	95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s 50 °C; 30 s 30x 72 °C; 90 s 72 °C; 10 min 1x	1117	Heider in sod., 2009

Se nadaljuje.

Nadaljevanje Tabela 8: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri reakciji PCR, njihovo nukleotidno zaporedje, razmere pomnoževanja, pričakovana velikost pomnožka PCR in referenca.

Sequel Table 8: Primers used in PCR reaction, primers, conditions, product size and references.

Gen/fragment DNA	Začetni oligonukleotidi (nukleotidno zaporedje 5' → 3')	Razmere pomnoževanja	Velikost pomnožka PCR (bp)	Referenca
<i>O25:H4</i>				
<i>o25b</i>	O25pabBspe-F TCCAGCAGGTGCTGGATCGT O25pabBspe-R GCGAAATTTCGCCGTACTGT	94 °C; 4 min 1x 94 °C; 30 s	347	Clermont in sod., 2009
		65 °C; 20 s 30x 72 °C; 45 s		
<i>trpA</i>	TrpA-F GCTACGAATCTCTGTTGCC TrpA-R GCAACGCAGCTGGCGGAAG	72 °C; 5 min 1x	427	
<i>mah36</i>	Mdh36_forward GTTAACGTTAACGCCGGT Mdh36_reverse GGTAACACCAGAGTGACCA	95 °C; 5 min 1x 94 °C; 30 s	275	Johnson in sod., 2009
		65 °C; 20 s 32x		
<i>gyrB47</i>	gyrB47_forward CGCGATAAGCGCGAC gyrB47_reverse ACCGTCTTTCCGGTGGAA	68 °C – 35s 72 °C; 10 min 1x	132	

^a M = A ali C, H = A ali C ali T, Y = C ali T, R = A ali G.

^b Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov je povzeto iz kompleta "DEC Primer Mix" (Statens Serum Institut (SSI), Danska).

^c R = A ali G, K = G ali T, S = C ali G.

3.5.1.3 Sestava reakcijskih mešanic za PCR

Za reakcije PCR smo uporabili Dream Taq Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA) (0,05 enot/µl Taq DNA polimeraze v reakcijskem pufru: 2 × Dream Taq Green buffer, 4 mM MgCl₂, 0,4 mM vsakega od dNTPjev (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)). Kot vzorčno DNA smo uporabili 2 µl bakterijskega lizata. Poleg vzorčne DNA smo v vse reakcijske mešanice odpipetirali po 1 µl vsakega od začetnih oligonukleotidov, 12,5 µl PCR Master mixa ter sterilno destilirano vodo do skupnega volumna 25 µl.

Reakcijske mešanice za pomnoževanje odsekov DNA, ki določajo gene *iss*, *sat*, *iucD* in *hpB*, smo pripravili tako, da smo sestavili multiplo reakcijo PCR. V mikrocentrifugirko z volumnom 200 µl smo odpipetirali 12,5 µl Master mixa, po 1 µl vsakega od začetnih oligonukleotidov (skupno 8 µl), 2 µl bakterijskega lizata in 2,5 µl sterilne destilirane vode.

Reakcijske mešanice za pomnoževanje odsekov DNA, ki določajo filogenetske (pod)skupine (*chuA*, *yjaA* in fragment TspE4.C2), smo pripravili tako, da smo sestavili multiplo reakcijo PCR. V mikrocentrifugirko z volumnom 200 µl smo odpipetirali 12,5 µl Master mixa, po 1 µl

vsakega od začetnih oligonukleotidov (skupno 6 µl), 2 µl bakterijskega lizata in 4,5 µl sterilne destilirane vode. Na enak način smo pripravili tudi reakcijsko mešanico za pomnoževanje genov *qnrA*, *qnrB* in *qnrS* ter genov *fimH*, *iha*, *kpsMTII* in *astA*, *vat*, *cvi* in *papGII*, *eae*, *iroN*.

Reakcijske mešanice za pomnoževanje genov *vtx1* in *vtx2* smo pripravili tako, da smo v 200 µl mikrocentrifugirko odpipetirali po 1 µl vsakega od začetnih oligonukleotidov (skupno 4 µl), 12,5 µl Master mixa, 2 µl bakterijskega lizata in 6,5 µl sterilne destilirane vode. Na enak način smo pripravili reakcijsko mešanico za pomnoževanje genov *sta* in *eltA*, *stb* in *tcp*, *traT* in *ompTA* ter *fyuA* in *hra*, *tsoTEM* in *tsoSHV* ter »gospodinjskih« genov *O25b* in *trpA*.

Reakcijsko mešanico za pomnoževanje genov *bla_{CTX}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *ehxA*, *cnf1*, *cnf2*, *irp2*, *iutA*, *crl* in *usp* smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirko z volumnom 200 µl odpipetirali po 1 µl vsakega začetnega oligonukleotida (skupno 2 µl), 12,5 µl Master mixa, 2 µl bakterijskega lizata in 8,5 µl sterilne destilirane vode. Na enak način smo pripravili reakcijsko mešanico za pomnoževanje »gospodinjskih« genov *mah36* in *gyrB47*.

Reakcijsko mešanico za določanje skupin CTX-M smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirko odpipetirali po 1 µl vsakega od začetnih oligonukleotidov (skupno 10 µl), 12,5 µl Master mixa, 2 µl bakterijskega lizata in 0,5 µl sterilne destilirane vode.

Reakcijsko mešanico za pomnoževanje genov za AmpC *dha*, *acc*, *cit*, *ebc*, *fox* in *mox* smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirko z volumnom 200 µl odpipetirali po 1 µl vsakega od začetnih oligonukleotidov (skupno 12 µl), 25 µl Master mixa, 2 µl bakterijskega lizata in 11 µl sterilne destilirane vode.

3.5.2 Agarozna gelska elektroforeza

S to metodo detektiramo nastale pomnožke PCR in ugotovimo njihovo velikost. Glede na pričakovano velikost pomnožka smo pripravili gele z različnim odstotkom (0,9–2 %) agaroze (SIGMA-ALDRICH, Co., St. Luis, ZDA). Agarozo smo raztopili v 30 ml pufra 1 X TBE in jo segrevali v mikrovalovni pečici. Nato smo gel ohladili do približno 55 °C in mu dodali etidijev bromid (SIGMA-ALDRICH, Co., St. Luis, ZDA) do končne koncentracije 0,5 µg/ml. Tako pripravljen gel smo vlili v pripravljen nosilec, vstavili glavnik za jamice in počakali, da

se je gel strdil. Iz gela smo odstranili glavnik in nosilec prestavili v elektroforezno banjico ter ga prelili s pufom TBE (1x).

V prvo in zadnjo jamico smo vnesli označevalec velikosti (standardna lestvica linearnih fragmentov DNA – Fermentas), v preostale jamice pa po 5 µl pomnožka PCR . Po končanem nanosu smo elektroforezno banjico priključili na vir električne napetosti.

Po končani elektroforezi smo gel presvetlili s svetlobo UV (302 nm) in ga slikali. Glede na prepotovano dolžino fragmentov standardne lestvice in pomnožka PCR smo ugotavljalni približno velikost dobljenih fragmentov DNA.

Pri delu smo uporabljali naslednje standardne DNA lestvice (Fermentas, Waltham, ZDA):

- standardna DNA lestvica »50 bp DNA Ladder« #SM0371, pri kateri zasledimo fragmente naslednje velikosti (v baznih parih): 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50;
- standardna DNA lestvica »1 kb DNA Ladder« #SM0311/2/3, pri kateri zasledimo fragmente naslednje velikosti (v baznih parih): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250;

3.5.3 Čiščenje fragmentov, dobljenih z reakcijo PCR, in ugotavljanje nukleotidnega zaporedja

Izbrane pomnožke PCR, pri katerih nas je zanimalo nukleotidno zaporedje pomnoženega gena, smo po končani elektroforezi izrezali iz agaroznega gela in očistili. V primeru, da smo na gelu zasledili tudi nespecifične pomnožke, smo iz gela izrezali fragment, ki je ustrezal pričakovani velikosti. Izrezan košček agaroze smo prenesli v mikrocentrifugirko in ga stehtali. S kompletom GeneJET Gel Extraction Kit (Fermentas, Waltham, ZDA) smo po navodilih proizvajalca fragment očistili in ga poslali na sekvenciranje (Macrogen inc., Nizozemska). Dobljene sekvene smo s programom DNASTAR uredili in primerjali s podatki na internetni strani (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Izbrane sekvene smo poslali v gensko banko.

3.6.3 Statistične metode

Statistično značilne povezave med dobljenimi podatki smo ugotavljali s Fisherjevim eksaktnim testom (<http://www.langsrud.com/fisher.htm>; dne 14.12.2016), ki je prilagojen za majhno število vzorcev. Primerjana podatka sta statistično značilno povezana takrat, kadar je vrednost $P \leq 0,05$ (Agresti A, 1992).

4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA *E. coli* IZ ŽIVIL ŽIVALSKEGA IZVORA

Iz 526 vzorcev živil živalskega izvora smo izolirali in potrdili 245 sevov *E. coli*. Večino sevov, to je 132 (54 %), smo izolirali iz mesa in mesnih izdelkov, sledijo školjke in morski izdelki, 87 (36 %) ter mleko in mlečni izdelki, 20 (8 %). Najmanj sevov *E. coli* je bilo izoliranih iz jajc in jajčnih izdelkov, 6 (2 %).

Tabela 9: Seznam v raziskavo vključenih sevov *E. coli* iz živil živalskega izvora.

Table 9: List of *E. coli* strains isolated from food of animal origin included in this study.

	2010	2011	Skupaj
Meso in mesni izdelki	23	109	132
Goveje meso	6	7	13
Konjsko meso	0	1	1
Svinjsko meso	3	1	4
Puranja koža	3	0	3
Puranje meso	2	0	2
Mesni pripravki	6	49	55
Mleto meso	2	27	29
Pasterizirane mesnine	0	3	3
Sušene mesnine	1	13	14
Tatarski biftek	0	5	5
Zaseka	0	3	3
Mleko in mlečni izdelki	0	20	20
Kozji sir	0	1	1
Kozja skuta	0	2	2
Kozje mleko	0	4	4
Kravja skuta	0	3	3
Kravje mleko	0	9	9
Maslo	0	1	1
Jajca in jajčni izdelki	0	6	6
Beljak	0	1	1
Jajčni melanž	0	4	4
Rumenjak	0	1	1

Se nadaljuje.

Nadaljevanje Tabela 9: Seznam v raziskavo vključenih sevov *E. coli* iz živil živalskega izvora.
Sequel Table 9: List of *E. coli* strains isolated from food of animal origin included in this study.

	2010	2011	Skupaj
Školjke in morski izdelki	3	84	87
Klapavice	1	76	77
Ladinke	2	6	8
Morski sadeži	0	1	1
Bakala	0	1	1
	26	219	245

4.2 DOKAZOVANJE *E. coli* z ESBL iz živil živalskega izvora

Med 245 izolati *E. coli* je bilo 16 (6,5 %) izolatov fenotipsko pozitivnih za ESBL. Vseh 16 izolatov je bilo odpornih proti cefpodoksimu in cefotaksimu, 5 izolatov je bilo hkrati odpornih tudi proti ceftazidimu. Pri potrditveni metodi s kombinacijo diskov je bil pri vseh 16 izolatih premer cone inhibicije diska s cefalosporinom in klavulansko kislino vsaj 5 mm večji kot premer cone inhibicije diska brez klavulanske kisline. Prav tako je vseh 16 izolatov imelo vsaj 3-kratno zmanjšanje vrednosti MIC za ceftazidim in cefotaksim v prisotnosti klavulanske kisline, kar fenotipsko dokazuje sev ESBL. Med 245 izolati *E. coli* smo našli tudi 3 (1,2 %) izolate, ki so bili fenotipsko odporni proti cefoksitinu, ki je indikatorski antibiotik za AmpC.

Med 16 ESBL pozitivnim izolati *E. coli* jih 7 (43,7 %) izvira iz mesnih pripravkov, 5 (31,2 %) iz mletega mesa, 2 (12,5 %) iz sušenih mesnin ter 1 (6,2 %) izolat iz svinjskega mesa in 1 (6,2 %) izolat iz školjk. Med tremi fenotipsko AmpC pozitivnimi izolati *E. coli* sta bila 2 (66,6 %) iz mesnih pripravkov in 1 (33,3 %) iz svinjskega mesa.

Tabela 10: Fenotipsko pozitivni ESBL/AmpC izolati *E. coli* iz živil živalskega izvora.
 Table 10: Phenotypical positive ESBL/AmpC *E. coli* isolates from food of animal origin.

Oznaka izolata	Izvor izolata	cefpodoksim	ceftazidim	cefotaksim	Ceftazidim + klavulanska k.	Cefotaksim + klavulanska k.	cefoksitin
Ž 4	Mesni pripravek	R	S	R	≥ 5	≥ 5	S
Ž 8	Svinjsko meso	R	S	R	≥ 5	≥ 5	S
Ž 16	Svinjsko meso	S	S	S	Ø	Ø	R
Ž 38	Sušene mesnine	R	S	R	≥ 5	≥ 5	S
Ž 39	Sušene mesnine	R	S	R	≥ 5	≥ 5	S
Ž 102	Mesni pripravek	R	S	R	≥ 5	≥ 5	S
Ž 131	Mesni pripravek	S	S	S	Ø	Ø	R
Ž 178	Mesni pripravek	S	S	S	Ø	Ø	R
Ž 183	Mesni pripravek	R	R	R	≥ 5	≥ 5	S
Ž 202	Mesni pripravek	R	S	R	≥ 5	≥ 5	S
Ž 208	Mleto meso	R	S	R	≥ 5	≥ 5	S
Ž 209	Mesni pripravek	R	S	R	≥ 5	≥ 5	S
Ž 210	Mleto meso	R	S	R	≥ 5	≥ 5	S
Ž 211	Mesni pripravek	R	S	R	≥ 5	≥ 5	S
Ž 212	Mleto meso	R	R	R	≥ 5	≥ 5	S
Ž 213	Mesni pripravek	R	R	R	≥ 5	≥ 5	S
Ž 214	Mleto meso	R	R	R	≥ 5	≥ 5	S
Ž 215	Mleto meso	R	R	R	≥ 5	≥ 5	S
Š 22	Školjke	R	R	R	≥ 5	≥ 5	S

R = resistant (odporen), S = sensitive (dobro očutljiv), Ø = ni razlike v premeru cone ob dodatku inhibitorja betalaktamaz (klavulanske kisline)

4.3 REZULTATI TESTIRANJA IZOLATOV *E. coli* IZ ŽIVIL ŽIVALSKEGA IZVORA GLEDE OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE

4.3.1 Občutljivost izolatov *E. coli*, testiranih z disk difuzijsko metodo

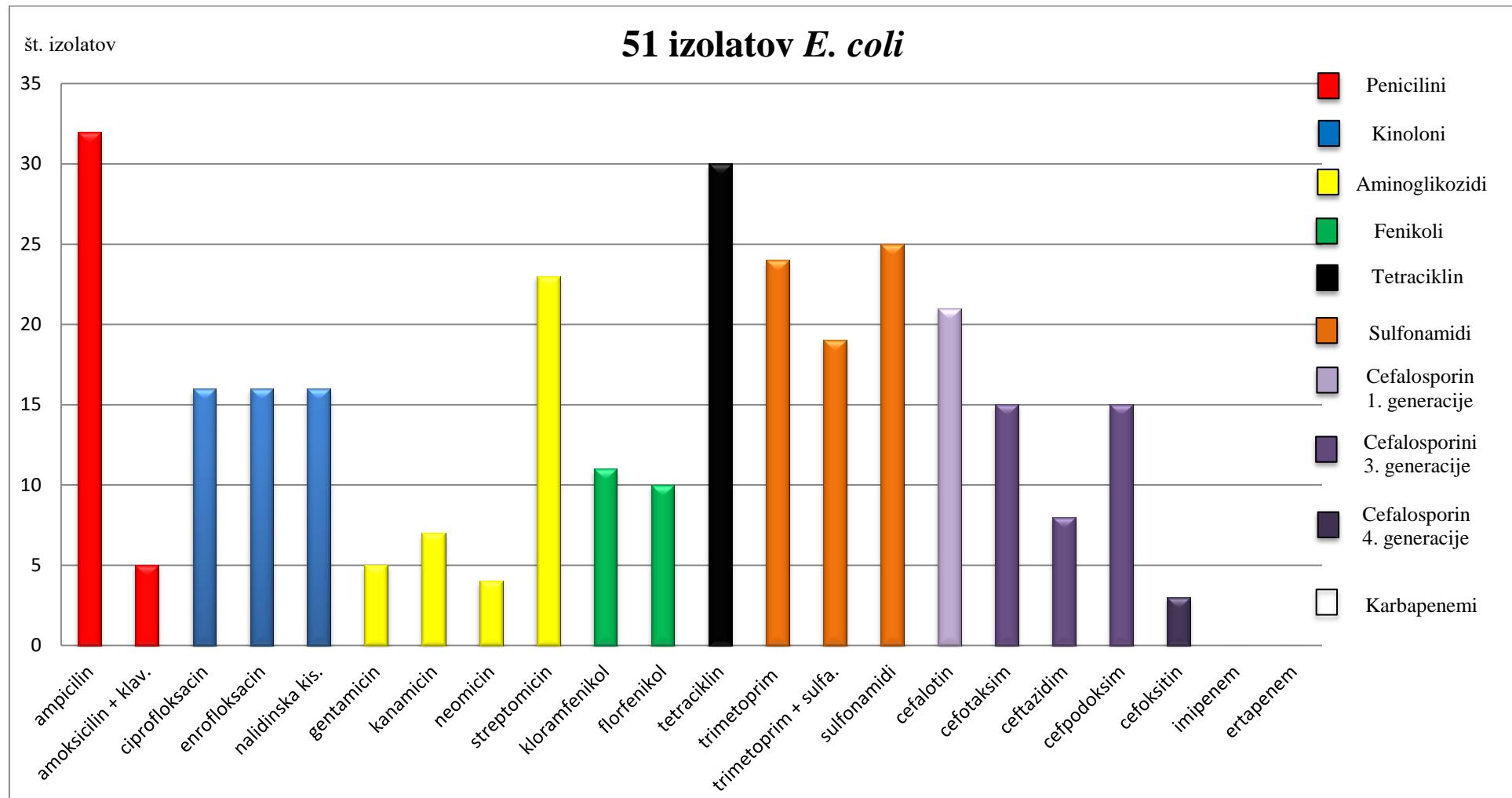
Z disk difuzijsko metodo smo testirali 158 izolatov iz živil živalskega izvora, 107 (67,7 %) jih je bilo občutljivih za vseh 22 testiranih antibiotikov. Med njim jih je bilo 82 (76,6 %) iz skupine mesa in mesnih izdelkov: največ, 33 (30,8 %), iz mesnih pripravkov, sledi 20 (18,7

%) izolatov iz mletega mesa, 13 (12,1 %) iz govejega mesa, 7 (6,5 %) iz sušenih mesnin, 5 (4,7 %) iz tatarskega biftka, 2 (1,9 %) iz zaseke in po 1 (0,9 %) izolat s kože purana, konjskega mesa in pasteriziranih mesnin. Vseh 20 izolatov iz mleka in mlečnih izdelkov je bilo občutljivih za 22 preizkušenih antibiotikov. Občutljivi za antibiotike so bili tudi 4 (3,7 %) izolati iz jajc in 1 (0,9 %) izolat iz bakalaja.

Med 158 izolati *E. coli* jih je bilo 51 (32,3 %) takih, ki so bili odporni proti enemu ali več antibiotikom. Na sliki 11 je razvidno, da jih je bilo največ, 32 (20,3 %), odpornih proti ampicilinu. Kar 30 (19,0 %) je bilo odpornih proti tetraciklinu, 25 (15,8 %) proti sulfonamidom, 24 (15,2 %) proti trimetoprimu, 23 (14,6 %) proti streptomycinu, 21 (13,3 %) proti cefalotinu in 19 (12,0 %) proti trimetoprimu s sulfametoksazolom. Sledi 16 (10,1 %) izolatov, odpornih proti kinolonom, 15 (9,5 %) odpornih proti cefalosporinoma 3. generacije (cefotaksimu in cefpodoksimu) ter 8 (5,1 %) odpornih proti ceftazidimu. Manjše število izolatov je bilo odpornih proti kanamicinu, in sicer 7 (4,4 %), proti gentamicinu 5 (3,2 %) in neomicinu 4 (2,5 %). Proti amoksicilinu s klavulansko kislino je bilo odpornih 5 (3,2 %) izolatov, 3 (1,9 %) so bili odporni proti cefoksitinu iz 4. generacije cefalosporinov, ki je tudi indikator za AmpC. Noben preiskovan izolat *E. coli* ni bil odporen proti imipenemu in ertapenemu.

Od 51 odpornih izolatov jih je bilo 13 (25,5 %) odpornih samo proti enemu antibiotiku, najpogosteje proti tetraciklinu. Sedem (13,7 %) izolatov je bilo odpornih proti dvema antibiotikoma, in sicer kombinaciji trimetoprima in sulfametoksazola. Ostalih 31 (60,8 %) izolatov je bilo odpornih proti vsaj trem skupinam antibiotikov. En izolat *E. coli* pa je bil hkrati odporen proti 17 antibiotikom. Rezulati kažejo, da je bilo med odpornimi izolati kar 60,8% izolatov *E. coli*, ki so bili večkratno odporni.

Za mikrodilucijsko metodo ni bilo več možno oživeti 13 izolatov *E. coli* iz školjk, vendar so bili vsi predhodno testirani z disk difuzijsko metodo. Deset izolatov je bilo občutljivih za vseh 22 preiskovanih antibiotikov, en izolat je bil odporen samo proti tetraciklinu, eden samo proti ampicilinu in en izolat je bil hkrati odporen proti ampicilinu, kinolonom in tetraciklinu.



Slika 11: Število izolatov *E. coli* iz živil živalskega izvora, odpornih proti določenim skupinam antibiotikov.
Figure 11: Number of *E. coli* isolates from food of animal origin resistant to different group of antibiotics.

4.3.2 Antibiogram po mikrodilucijski metodi

Med 72 sevi *E. coli*, izoliranimi iz školjk, je bilo največ, to je 25 (34,7 %) sevov odpornih proti tetraciklinu. Številčno so bili sevi odporni tudi proti ampicilinu, in sicer 21 (29,2 %) sevov, 20 (27,8 %) proti sulfonamidom in 13 (18,1 %) proti trimetoprimu. V manjšem deležu so bili sevi *E. coli* odporni proti ceftazidimu in cefotaksimu, in sicer po 3 (4,2 %), proti gentamicinu 2 (2,7 %) ter kanamicinu, kinolonom, kloramfenikolu in kolistinu po 1 (1,4 %). Nobeden od sevov pa ni bil odporen proti meropenemu, azitromicinu in tigeciklinu. Rezultati so prikazani v tabeli 11.

Med 55 sevi *E. coli*, izoliranimi iz fecesa ljudi, jih je bilo odpornih proti tetraciklinu 20 (36,4 %). Sledilo je 17 (30,9 %) sevov, ki so bili odporni proti ampicilinu, 14 (25,5 %) proti kinolonom, 13 (23,6 %) proti sulfonamidom in 8 (14,5 %) proti trimetoprimu. V nizkem odstotku so bili sevi odporni proti kloramfenikolu, in sicer 4 (7,3 %), proti cefotaksimu, ceftazidimu in azitromicinu pa po 2 (3,8 %). En (1,8 %) sam sev je bil odporen proti gentamicinu. Noben sev ni bil odporen proti kolistinu, meropenemu in tigeciklinu. Rezultati so prikazani v tabeli 12.

Tabela 11: Distribucija MIC za indikatorske seve *E. coli*, izolirane iz školjk (n = 72).
 Table 11: Distribution of MICs for *E. coli* strains, isolated from sea shells (n = 72).

Delež odpornih		ANTIBIOTIK	Koncentracija antibiotika																		
S	R		0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	>1024
51	21 (29,2 %)	ampicilin							1		12	35	3	2		2	17				
69	3 (4,2 %)	cefotaksim					69			2	1										
67	3 (4,2 %)	ceftazidim						66	3	1	1				1						
72	0	ciprofloksacin	59	7	5	1															
72	0	nalid. kislina									72										
71	1 (1,4 %)	kloramfenikol								1		63	7		1						
*13	0	florfenikol								1		9	3								
69	2 (2,7 %)	gentamicin						43	2	22	3	2									
*13	0	streptomycin											5	4	2	2					
*12	1	kanamicin									8		4	1							
47	25 (34,7 %)	tetraciklin							43	3	1			1	5	9	10				
60	12 (18,1 %)	trimetoprim					37	7	16								12				
52	20 (27,8 %)	sulfonamidi										32		16	2	2		1		19	
71	1 (1,4 %)	kolistin							58	13		1									
59	0	meropenem	59																		
59	0	azitromicin								15		28	16								
59	0	tigeciklin					50		9												

Legenda:

Rumeno obarvano polje: območje testiranja

Desno ojačana črta || Mejna vrednost za S/R

*na ploščah EUMVS2

Tabela 12:Distribucija MIC za indikatorske seve *E. coli*, izolirane iz fecesa ljudi – klinični vzorci (n = 55).

Table 12: Distribution of MICs for *E. coli* strains, isolated from human feces – clinical samples (n = 55).

Delež odporih		ANTIBIOTIK	Koncentracija antibiotika																				
S	R		0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	>1024		
38	17 (30,9 %)	ampicilin							7		12	19						17					
53	2 (3,8 %)	cefotaksim					53							2									
53	2 (3,8 %)	ceftazidim						53						1	1								
41	14 (25,5 %)	ciprofloksacin	38		3		1	3	3					1	6								
41	14 (25,5 %)	nalid. kislina									41							1	7	6			
51	4 (7,3 %)	kloramfenikol										50		1	1	1	1	1					
54	1 (1,8 %)	gentamicin						43		10	1	1											
35	20 (36,4 %)	tetraciklin								35							1	7	12				
47	8 (14,5 %)	trimetoprim					26		20	1								8					
42	13 (23,6 %)	sulfonamidi										8		30	3	1					13		
55	0	kolistin							55														
55	0	meropenem		55																			
53	2 (3,8 %)	azitromicin								7		28	17	1		2							
55	0	tigeciklin						52		3													

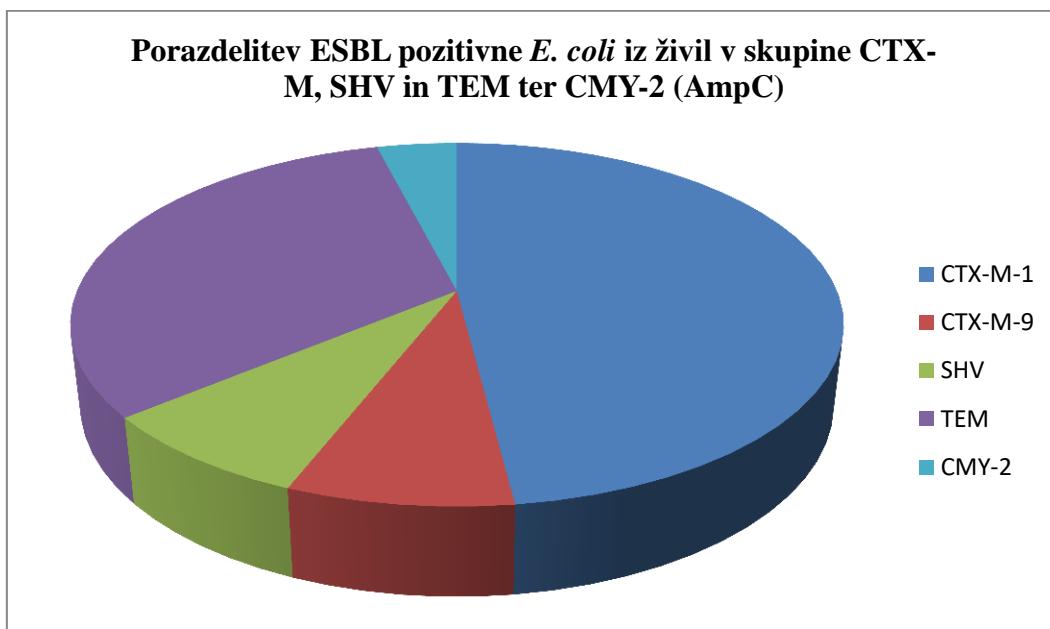
Legenda:

Rumeno obarvano polje: območje testiranja

Desno ojačana črta || Mejna vrednost za S/R

4.4 UGOTAVLJANJE GENOV, KI DOLOČAJO VRSTO ENCIMOV ESBL

Pri vseh izolatih za ESBL pozitivne *E. coli* iz živil živalskega izvora smo z metodo PCR preverili prisotnost genskih zapisov za betalaktamaze iz skupin TEM, SHV,CTX-M in AmpC. Pri izolatih iz skupine CTX-M smo določili tudi podskupino (CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9 in CTX-M25). Vse dokazane gene za betalaktamaze smo pomnožili z metodo PCR in pri tem uporabili sekvensijske začetne oligonukleotide opisane v študijah (Brinas, 2003; Ling Ma in sod., 2005; Cattoir in sod., 2008; Horton in sod., 2011). Nukleotidne sekvene za *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{TEM-1} so bile poslane v podatkovno banko nukleotidnih zaporedij, v kateri so jim dodelili pristopne številke KU664678, KU664679, KU664680, KU664681.



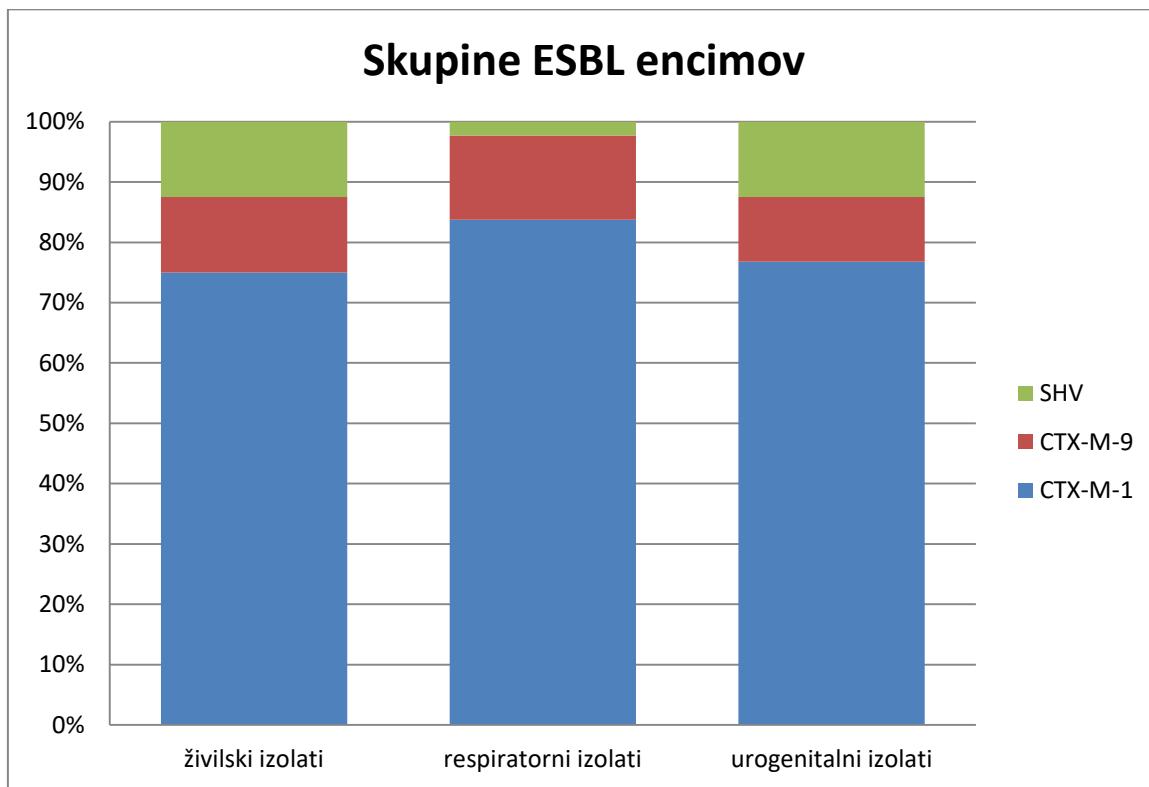
Slika 12: Porazdelitev ESBL pozitivnih izolatov *E. coli* iz živil živalskega izvora v skupine CTX-M, SHV, TEM ter CMY-2 (AmpC).

Figure 12: Distribution of ESBL – positive *E. coli* isolates from food of animal origin among groups CTX-M, SHV, TEM and CMY-2 (AmpC).

Največ ESBL pozitivnih izolatov je imelo gen *bla*_{CTX-M-1}, in sicer 12 (75 %). Šest (50 %) sevov je bilo izoliranih iz mesnih pripravkov in pet (41,6 %) iz mletega mesa. En (8,3 %) je bil izoliran iz svinskega mesa. Po 2 (12,5 %) izolata sta imela gen *bla*_{CTX-M-9} in *bla*_{SHV-12}. Gen *bla*_{CTX-M-9} sta imela seva, izolirana iz sušenih mesnin, gen *bla*_{SHV-12} pa je bil ugotovljen pri izolatih iz mesnega pripravka in školjk klapavic. Izolirali smo tudi šest sevov z genom *bla*_{TEM-1}, ki sicer ne spada med ESBL, ampak v skupino betalaktamaz širokega spektra (BSBL) (ang.

Broad-spectrum beta-lactamases). Po 2 (33.3 %) seva sta bila izolirana iz kože purana in mesnih pripravkov. En (16,6 %) sev je bil izoliran iz puranjega mesa in en (16,6 %) iz svinjskega mesa. Med tremi fenotipsko odpornimi izolati *E. coli* AmpC smo uspeli pomnožiti gen *bla*_{CMY-2} samo pri enem. Sev z genom *bla*_{CMY-2} je bil izoliran iz svinjskega mesa.

Nato smo vrsto genov primerjali s skupinami ESBL pri kliničnih sevih iz spodnjih dihal in urogenitalnega trakta izoliranih pri ljudeh. Črevesnih izolatov tukaj nismo mogli primerjati, ker smo identificirali samo en ESBL pozitivni izolat, in sicer iz skupine ESBL CTX-M-1.



Slika 13: Primerjava ESBL pozitivnih izolatov *E. coli* iz živili živalskega izvora, s kliničnimi sevi izoliranimi pri ljudeh iz spodnjih dihalnih poti in urogenitalnega trakta.

Figure 13: Comparison of ESBL – positive *E. coli* isolates among food of animal origin and human clinical isolates from respiratory and urogenital tract.

Če primerjamo porazdelitev ESBL – pozitivnih izolatov med skupine za encime ESBL vidimo, da pri vseh treh skupinah prevladuje skupina CTX-M-1. V najvišjem deležu je zastopan pri izolatih spodnjih dihalnih poti, in sicer v 83,7 %. Delež je med izolati iz živil živalskega izvora in uropatogenimi izolati pa je precej podoben. Pri prvih ga najdemo v 75 % in pri uropatogenih v 76,8 %. Skupina CTX-M-9 je pri vseh treh skupinah zastopan v

podobnem deležu, in sicer v 12,5 % pri živilskih izolatih, v 13,9 % pri izolatih spodnjih dihalnih poti in v 10,7 % pri uropatogenih izolatih. Podobno kot pri skupini CTX-M-1 je tudi odstotek zastopanosti skupine SHV-12 enak pri živilskih in uropatogenih izolatih 12,5 %, medtem ko je pri izolatih iz spodnjih dihalnih poti prisoten samo v 2,3 %.

Pri vseh treh skupinah smo našli tudi encime BSBL iz skupine TEM. Pri izolatih iz živil živalskega izvora smo ga našli pri 6 (2,4 %) od vseh izolatov *E. coli*. Pri sevih spodnjih dihalnih poti in uropatogenih sevih je bil ta odstotek precej višji. Pri prvih smo ga našli pri 48,8 % in pri uropatogenih pri 41,1 %. Pri obeh skupinah so imeli skoraj vsi izolati poleg encima iz skupine TEM še vsaj en encim iz skupine CTX-M ali SHV, razen dveh uropatogenih izolatov, ki sta imela samo encim iz skupine TEM. Pri živilskih izolatih nismo našli seva, ki bi imel hkrati dva ali več encimov za betalaktamaze. Vendar tukaj primerjava ni mogoča, ker so bili vsi izolati spodnjih dihalnih poti in uropatogeni izolati ESBL pozitivni.

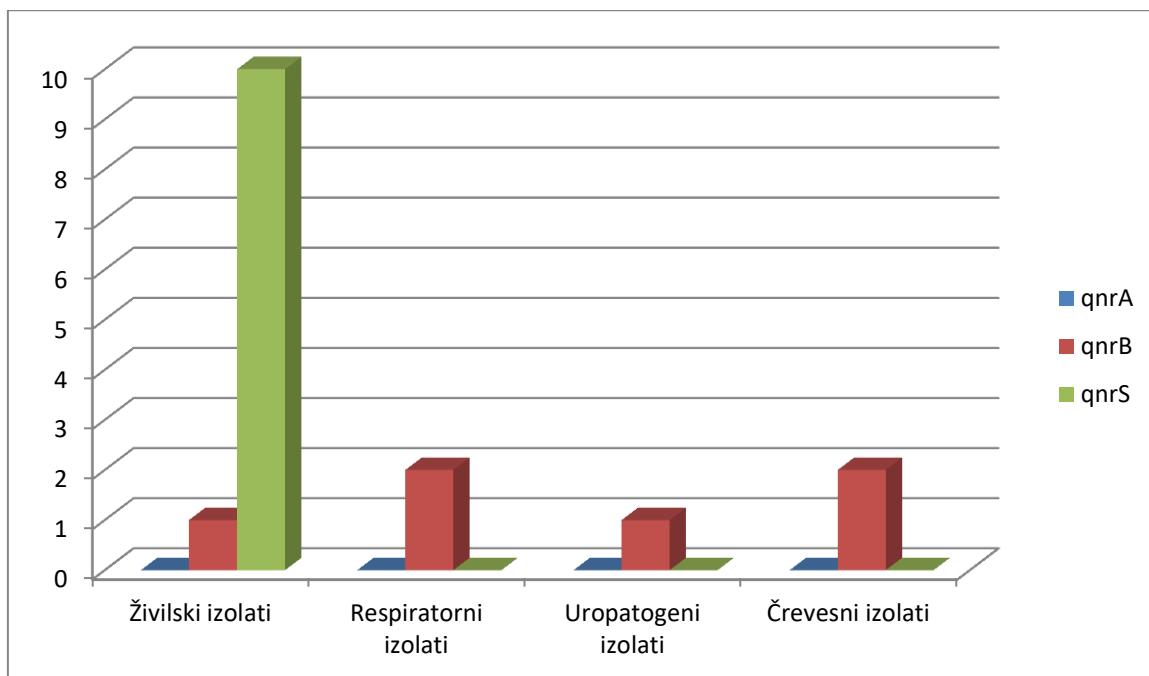
4.5 UGOTAVLJANJE GENOV ZA PLAZMIDNO POSREDOVANO ODPORNOST PROTI KINOLONOM (PMQR)

Pri vseh izolatih smo z metodo PCR preverili prisotnost genov *qnrA*, *qnrB* in *qnrS*. Ti so povezani z nizko ravnijo odpornosti proti fluorokinolonom. Rezultate živilskih izolatov smo primerjali z rezultati človeških kliničnih izolatov iz spodnjih dihalnih poti, urogenitalnega in črevesnega trakta.

Pri vseh štirih skupinah nismo našli gena za *qnrA*, *qnrS* smo našli samo pri izolatih iz živil živalskega izvora, in sicer pri 10 (4,1 %) izolatih. Gen *qnrB* smo potrdili pri vseh skupinah v majhnem številu: pri živilskih izolatih smo potrdili 1 (0,4 %), pri izolatih spodnjih dihalnih poti 2 (4,7 %), pri uropatogenih 1 (1,8 %) in pri črevesnih izolatih 2 (3,6 %). Nukleotidno sekvenco za *qnrS1*, iz vzorca živil živalskega izvora, smo poslali v gensko banko, v kateri je dobila pristopno številko KU664682.

Ko primerjamo prisotnost genov *qnr* s prisotnostjo genov za betalaktamaze med vsemi štirimi skupinami, vidimo, da imata dva živilska izolata ob genu *qnrS* tudi gen *bla_{TEM-1}*, en izolat z *qnrS* ima še gen *bla_{CTX-M-9}* in en izolat z *qnrB* ima še gen *bla_{CTX-M-1}*. Pri izolatih spodnjih

dihalnih poti imata oba izolata ob genu *qnrB* še ESBL encim iz skupine CTX-M-1, eden pa še encim iz skupine SHV. Urogenitalni izolat z *qnrB* ima še ESBL encim iz skupine CTX-M-1 in SHV. Črevesni izolat ob genu *qnrB* ni imel gena za betalaktamaze.



Slika 14: Primerjava prisotnosti genov za PMQR med izolati iz živil in človeškimi kliničnimi izolati iz spodnjih dihalnih poti, urogenitalnega in črevesnega trakta.

Figure 14: Comparing of presence of genes for PMQR between isolates from food with human clinical isolates from lower respiratory, urogenital and intestinal tract.

4.6 FILOGENETSKE (POD)SKUPINE

Z metodo po Clermontu smo živilske izolate *E. coli* uvrstili v filogenetske skupine in podskupine. V tabeli 13 je prikazano skupno število izolatov iz posamezne filogenetske skupine in podskupine.

Od 245 živilskih izolatov *E. coli* smo jih največ, to je 107 (43,7 %) uvrstili v filogenetsko skupino A, od tega 67 (27,3 %) v podskupino A₀ in 40 (16,3 %) v podskupino A₁. Sledi skupina B1 z 99 (40,4 %) izolati; 25 (10,2 %) izolatov smo uvrstili v filogenetsko skupino D, od tega 14 (5,7 %) v podskupino D₁ in 11 (4,5 %) v podskupino D₂. Najmanj izolatov je bilo iz filogenetske skupine B2, in sicer 12 (4,9 %) iz podskupine B2₃ in 2 (0,8 %) iz podskupine B2₂.

Tabela 13: Uvrstitev živilskih izolatov *E. coli* v filogenetske (pod)skupine.
Table 13: Assignment of food *E. coli* isolates to phylogenetic (sub)groups.

Filogenetska skupina	Število izolatov <i>E. coli</i>	Filogenetska podskupina	Število izolatov <i>E. coli</i>
A	107 (43,7%)	A ₀	67 (27,3%)
		A ₁	40 (16,3%)
B1	99 (40,4%)		
B2	14 (5,7%)	B2 ₂	2 (0,8%)
		B2 ₃	12 (4,9%)
D	25 (10,2%)	D ₁	14 (5,7%)
		D ₂	11 (4,5%)

V tabeli 14 smo naredili primerjavo med izolati *E. coli* iz živil živalskega izvora in izolati *E. coli*, izoliranimi pri ljudeh z diarejo.

Tabela 14: Primerjava sevov *E. coli*, izoliranih iz živil in kliničnih vzorcev iz črevesja ljudi.
Table 14: Comparison of *E. coli* strains, isolated from food and human clinical intestinal samples.

Filogenetska skupina	Filogenetska podskupina	<i>E. coli</i> iz živil (N = 245)	Črevesni izolati (N = 55)
A	A ₀	67 (27,4 %)	8 (14,5 %)
	A ₁	40 (16,3 %)	11 (20 %)
B1		99 (40,4 %)	13 (23,6 %)
B2	B2 ₂	2 (0,8 %)	0
	B2 ₃	12 (4,9 %)	6 (10,9 %)
D	D ₁	14 (5,7 %)	8 (14,5 %)
	D ₂	11 (4,5 %)	9 (16,4 %)

Večji delež izolatov iz živil živalskega izvora se je uvrstilo v komenzalne filogenetske (pod)skupine (A₀, A₁ in B1), in sicer skupaj 84,1 %. Pri črevesnih sevih je bila porazdelitev nekoliko bolj heterogena. Prevladujeta filogenetski (pod)skupini B1 (23,6 %) in A₁ (20 %), v približno podobnem deležu so zastopane (pod)skupine A₀, B2₃, D₁ in D₂.

V tabeli 15 smo primerjali razporeditev ESBL pozitivnih izolatov v filogenetske (pod)skupine. Med kliničnimi izolati *E. coli* z ESBL prevladuje filogenetska (pod)skupina B2₃ (69,8 % in 67,9 %), sledi ji (pod)skupina D₂ (18,6 % in 16,1 %). Ostale filogenetske skupine so zastopane v nižjem odstotku. Večina ESBL pozitivnih sevov, izoliranih iz živil

živalskega izvora, spada v filogenetsko (pod)skupino A1 (43,7 %), sledijo ji B1 (25 %), D₁ in D₂ (12,5 %).

Tabela 15: Primerjava ESBL pozitivnih izolatov iz živil in humanih kliničnih vzorcev.
Table 15: Comparison of ESBL – positive isolates from food and human clinical samples.

Filogenetska (pod)skupina	Filogenetska podskupina	Živilski ESBL pozitivni izolati (N = 16)	Respiratorni ESBL pozitivni izolati (N = 43)	Uropatogeni ESBL pozitivni izolati (N = 56)
A	A ₀	1 (6,3 %)	0	3 (5,3 %)
	A ₁	7 (43,7 %)	3 (6,9 %)	3 (5,3 %)
B1		4 (25 %)	0	1 (1,8 %)
B2	B2 ₂	0	1 (2,3 %)	0
	B2 ₃	0	30 (69,8 %)	38 (67,9 %)
D	D ₁	2 (12,5 %)	1 (2,3 %)	2 (3,6 %)
	D ₂	2 (12,5 %)	8 (18,6 %)	9 (16,1 %)

4.7 GENOTIPIZACIJA IZOLATOV *E. coli* IZ ŽIVIL ŽIVALSKEGA IZVORA

Pri vseh izolatih *E. coli* iz živil živalskega izvora smo preverili prisotnost genskih zapisov za 30 dejavnikov virulence. Poleg prevalence smo ugotavljali, v katero filogenetsko skupino so uvrščeni izolati z določenim virulentnim dejavnikom.

Med geni za adhezine je imelo največ izolatov *E. coli* gen *fimH*, in sicer 188 (76,7 %). Sledil je gen *hra* 43 (17,6 %). Gen *iha* in *papGII* smo potrdili samo pri 12 (4,9 %) oz. 9 (3,7 %) izolatih. Gena za intimin *eae* pa nismo potrdili.

V skupini avtotransporterjev in toksinov smo največkrat potrdili prisotnost gena *fluA*, in sicer pri 51 (20,8 %) sevih, 27 (11,0 %) sevov pa je imelo gen *astA*. Pri manjšem številu sevov smo potrdili gene *cnf1*, *hbp*, *sat in vat*. Trinajst (5,3 %) sevov je imelo gen *cnf1*, 10 (4,1 %) gen *hbp*, po 7 (2,9 %) gena *sat in vat* in 5 (2,0 %) sevov je imelo gen *cnf2*. Genov *sta*, *eltA*, *estII* in *ehxA* pa nismo potrdili.

Pri skupini genov, ki pomagajo bakteriji v boju proti obrambnemu mehanizmu gostitelja, smo v največkrat potrdili gen *traT*, in sicer pri 119 (48,6 %) sevih. Manj prevalentni so bili geni *iss*

s 40 (16,3 %) sevi, *ompT_A* s 38 (15,5 %) in *kpsMTII* s 21 (8,6 %) sevi. Gen *tcp* smo potrdili samo pri 3 (1,2 %) sevih.

Tabela 16: Prevalenca genov za dejavnike virulence.

Table 16: Prevalence of genes for virulence factors.

Geni za dejavnike virulence	Število (%) izolatov <i>E. coli</i> N = 245
Adhezini	
<i>crl</i>	15 (100 %)*
<i>fimH</i>	188 (76,7 %)
<i>iha</i>	12 (4,9 %)
<i>hra</i>	43 (17,6 %)
<i>papGII</i>	9 (3,7 %)
<i>eae</i>	0
Avtotransporterji in toksini	
<i>sat</i>	7 (2,9 %)
<i>hbp</i>	10 (4,1 %)
<i>astA</i>	27 (11,0 %)
<i>vat</i>	7 (2,9 %)
<i>fluA</i>	51 (20,8 %)
<i>vtx1</i>	2 (0,8 %)
<i>vtx2</i>	1 (0,4 %)
<i>cnf1</i>	13 (5,3 %)
<i>cnf2</i>	5 (2,0 %)
<i>sta</i>	0
<i>eltA</i>	0
<i>estII</i>	0
<i>ehxA</i>	0
Dejavniki, povezani z imunskim sistemom	
<i>kpsMTII</i>	21 (8,6 %)
<i>iss</i>	40 (16,3 %)
<i>traT</i>	119 (48,6 %)
<i>ompT_A</i>	38 (15,5 %)
<i>tcp</i>	3 (1,2 %)
Privzem železa	
<i>iucD</i>	31 (12,7 %)
<i>iroN</i>	22 (9,0 %)
<i>irp2</i>	61 (24,9 %)
<i>fyuA</i>	46 (18,8 %)
<i>iutA</i>	42 (17,1 %)
Mikrocin V	
<i>cvi</i>	20 (8,2 %)
Genotoksin	
<i>usp</i>	13 (5,3 %)

*Narejeno samo pri izolatih brez drugih dejavnikov virulence.

Najbolj enakomerno so bili razporejeni geni, ki pomagajo bakterijam privzeti železo. Največ izolatov, to je 61 (24,9 %), je imelo gen *irp2*. Geni *fyuA* smo pomnožili pri 46 (18,8 %), gen *iutA* pri 42 (17,1 %), *iucD* pri 31 (12,7 %) in *iroN* pri 22 (9,0 %) izolatih.

Gen za Mikrocin V *cvi* smo našli pri 20 (8,2 %) izolatih, *usp* pa pri 13 (5,3 %). Za lažji pregled rezultatov so podatki zapisani v tabeli 16.

V tabeli 17 smo prikazali porazdelitev genov za dejavnike virulence glede na filogenetsko (pod)skupino izolatov *E. coli*. Zanimalo nas je ali imajo izolati iz filogenetskih skupin, ki so povezane s patogenimi sevi (B2 in D) več genov za dejavnike virulence, kot izolati iz komenzalnih filogenetskih skupin A in B1.

Tabela 17: Porazdelitev genov za dejavnike virulence glede na filogenetsko (pod)skupino.
Table 17: Distribution of virulence factors according to phylogenetic (sub)groups.

Geni za dejavnike virulence	Število izolatov <i>E. coli</i>	A ₀ 67 (100) n (%)	A ₁ 40 (100) n (%)	B1 99 (100) n (%)	B2 ₂ 2 (100) n (%)	B2 ₃ 12 (100) n (%)	D ₁ 14 (100) n (%)	D ₂ 11 (100) n (%)
Adhezini								
<i>fimH</i>	188 (76,7 %)	40 (59,7)	35 (87,5)	80 (80,8)	2 (100)	11 (91,6)	10 (71,4)	10 (90,1)
<i>iha</i>	12 (4,9 %)	0	5 (12,5)	4 (4,0)	0	1 (8,3)	2 (14,3)	0
<i>hra</i>	43 (17,6 %)	6 (8,9)	8 (20,0)	16 (16,2)	2 (100)	4 (33,3)	1 (7,1)	5 (45,4)
<i>papGII</i>	9 (3,7 %)	5 (7,5)	3 (7,5)	0	0	0	1 (7,1)	0
<i>eae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
Avtotransporterji in toksini								
<i>sat</i>	7 (2,9 %)	3 (4,5)	0	1 (1,0)	0	1 (8,3)	2 (14,3)	0
<i>hbp</i>	10 (4,1 %)	0	6 (15,0)	2 (2,0)	0	0	1 (7,1)	1 (9,1)
<i>astA</i>	27 (11,0 %)	2 (2,9)	7 (17,5)	10 (10,1)	1 (50,0)	1 (8,3)	5 (35,7)	1 (9,1)
<i>vat</i>	7 (2,9 %)	0	1 (2,5)	0	0	6 (50,0)	0	0
<i>fluA</i>	51 (20,8 %)	5 (7,5)	12 (30,0)	24 (24,2)	2 (100)	4 (33,3)	3 (21,4)	1 (9,1)
<i>vtx1</i>	2 (0,8 %)	0	0	1 (1,0)	0	1 (8,3)	0	0
<i>vtx2</i>	1 (0,4 %)	0	0	0	0	1 (8,3)	0	0
<i>cnf1</i>	13 (5,3 %)	3 (4,5)	3 (7,5)	3 (3,0)	0	2 (16,7)	0	1 (9,1)
<i>cnf2</i>	5 (2,0 %)	0	1 (2,5)	4 (4,1)	0	0	0	0
<i>sta</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>eltA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>estII</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>ehxA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
Dejavniki, povezani z imunskega sistemom								
<i>kpsMTII</i>	21 (8,6 %)	2 (2,9)	3 (7,5)	3 (3,0)	0	9 (75,0)	3 (21,4)	1 (9,1)
<i>iss</i>	40 (16,3 %)	1 (1,5)	13 (32,5)	16 (16,2)	0	5 (41,7)	3 (21,4)	2 (18,2)
<i>traT</i>	119 (48,6 %)	13 (19,4)	22 (55,0)	62 (62,6)	1 (50,0)	6 (50,0)	7 (50,0)	8 (72,7)
<i>ompT_A</i>	38 (15,5 %)	3 (4,5)	14 (35,0)	13 (13,1)	0	3 (25,0)	2 (14,3)	3 (27,2)
<i>tcp</i>	3 (1,2 %)	0	1 (2,5)	0	1 (50,0)	1 (8,3)	0	0
Privzem železa								
<i>iucD</i>	31 (12,7 %)	1 (1,5)	8 (20,0)	13 (13,1)	0	4 (33,3)	3 (21,4)	3 (27,2)
<i>iroN</i>	22 (9,0 %)	1 (1,5)	6 (15,0)	7 (7,1)	0	3 (25,0)	2 (14,3)	2 (18,2)
<i>irp2</i>	61 (24,9 %)	14 (20,9)	10 (25,0)	19 (19,2)	1 (50,0)	11 (91,6)	2 (14,3)	2 (18,2)
<i>fyuA</i>	46 (18,8 %)	11 (16,4)	10 (25,0)	11 (11,1)	1 (50,0)	8 (66,7)	2 (14,3)	2 (18,2)
<i>iutA</i>	42 (17,1 %)	1 (1,5)	13 (32,5)	16 (16,2)	0	4 (33,3)	5 (35,7)	5 (45,4)
Mikrocin V								
<i>cvi</i>	20 (8,2 %)	6 (8,9)	5 (12,5)	6 (6,1)	0	2 (16,7)	0	1 (9,1)
Genotoksin								
<i>usp</i>	13 (5,3 %)	0	1 (2,5)	0	1 (50,0)	10 (83,3)	1 (7,1)	0
Brez DV ^a	21 (8,6 %)	15 (22,4)	1 (2,5)	3 (3,0)	0	0	2 (14,3)	0

Podatki za prevalence gena *crl* ni v tabeli, ker ga nismo pomnožili pri vseh izolatih.

^adejavnikov virulence.

Vse filogenetske (pod)skupine so imele gen za adhezin *fimH*; v najnižjem odstotku (59,7 %) je bil zastopan v filogenetski (pod)skupini A₀. Gen *iha* je bil na splošno prisoten v nizkem

odstotku; pomnožili smo ga v filogenetskih (pod)skupinah A₁ (12,5 %), B₁ (4,0 %), D₁ (14,3 %) in B₂₃ (8,3 %). Gen *hra* je bil prisoten pri obeh izolatih iz filogenetske (pod)skupine B₂₂, v visokem odstotku smo ga našli v D₂ (45,4 %), B₂₃ (33,3 %) in A₁ (20,0 %). Gen *papGII* smo našli v nizkem odstotku 7,5 % samo pri filogenetskih (pod)skupinah A₀, A₁ in pri D₁ v (7,1 %). Gena za intimin *eae* nismo našli pri nobenem izolatu *E. coli* iz živil živalskega izvora.

V skupini avtotransporterjev in toksinov smo pri vseh filogenetskih (pod)skupinah našli gena *astA* in *fluA*. Gena *sat* in *vat* smo našli v nizkem odstotku. Prvi je razporejen v filogenetske (pod)skupine A₀, B₁, B₂₃ in D₁, drugi pa je imel večino izolatov v filogenetski (pod)skupini B₂₃. Gen *hbp* smo pomnožili v komenzalnih skupinah A₁ v 15,0 % in B₁ v 2,0 %, le dva izolata sta bila iz skupin D₁ in D₂. Gena *vtxI* in *vtx2* sta bila prisotna pri 0,8 % in 0,4 % izolatih, iz filogenetske (pod)skupine B₁ in B₂₃. Gen za citonekrotični faktor 1 (*cnf1*) smo pomnožili v vseh filogenetskih (pod)skupinah, razen v B₂₂ in D₁, *cnf2* pa samo v filogenetskih (pod)skupinah A₁ in B₁. Ostalih genov iz te skupine nam ni uspelo pomnožiti.

Med geni iz skupine dejavnikov, povezanih z izogibanjem imunskemu sistemu gostitelja, smo pomnožili vse gene, razen gena *tcp*, v skoraj vseh filogenetskih (pod)skupinah. V filogenetski (pod)skupini B₂₂ sta bila samo dva izolata, pri katerih smo potrdili prisotnost gena *traT* in *tcp*.

Podobno sliko smo dobili tudi v skupini genov, povezanih z privzemom železa. Vse gene smo pomnožili v vseh filogenetskih (pod)skupinah, razen v podskupini B₂₂. Tu smo uspeli pomnožiti samo gena *irp2* in *fyuA*.

Mikrocin V *cvi* smo pomnožili v vseh filogenetskih (pod)skupinah, razen B₂₂ in D₁, v večjem odstotku v filogenetski (pod)skupini B₂₃ (16,7 %).

Genotoksin *usp* smo v visokem odstotku pomnožili v filogenetski (pod)skupini B₂₃ (83,3 %), po en izolat smo pomnožili še v filogenetskih (pod)skupinah A₁, B₂₂ in D₁.

Pri živilih živalskega izvora je bilo 21 (8,6 %) izolatov brez dejavnikov virulence, večina iz filogenetske (pod)skupine A₀. Pri teh izolatih smo pomnožili gen za adhezin *crl*. Vseh 15 izolatov je bilo pozitivnih na gen *crl*. Tri (14,3 %) izolate brez genov za dejavnikov virulence smo izolirali iz filogenetske (pod)skupine B₁, 2 (3,0 %) izolata iz D₁ in 1 (2,5 %) iz A₁.

4.8 PRIMERJAVA GENOTIPOV ESBL POZITIVNIH *E. coli* IZ ŽIVIL ŽIVALSKEGA IZVORA, IZOLATOV IZ SPODNIJIH DIHALNIH POTI IN UROPATOGENIH IZOLATOV

Med seboj smo primerjali izolate 16 ESBL pozitivnih *E. coli* iz živil živalskega izvora s 43 ESBL pozitivnimi izolati iz spodnjih dihal in 56 ESBL pozitivnimi izolati iz urogenitalnega trakta. Primerjali smo 14 genov za različne dejavnike virulence.

Tabela 18: Primerjava dejavnikov virulence med ESBL pozitivnimi izolati *E. coli*.

Table 18: Comparing virulence factors between ESBL – positive *E. coli* isolates.

Geni za dejavnike virulence	ESBL <i>E. coli</i> iz živil živalskega izvora	ESBL <i>E. coli</i> iz spodnjih dihal	ESBL <i>E. coli</i> iz urogenitalnega trakta
<i>fimH</i>	16 (100 %)	39 (90,7 %)	43 (76,8 %)
<i>iha</i>	2 (12,5 %)	31 (72,1 %)	34 (60,7 %)
<i>hra</i>	4 (25,0 %)	12 (27,9 %)	1 (1,8 %)
<i>sat</i>	0	30 (69,8 %)	43 (76,8 %)
<i>vat</i>	0	2 (4,7 %)	3 (5,4 %)
<i>fluA</i>	4 (25,0 %)	36 (83,7 %)	43 (76,8 %)
<i>kpsMTII</i>	2 (12,5 %)	35 (81,4 %)	43 (76,8 %)
<i>iss</i>	9 (56,3 %)	3 (6,9 %)	3 (5,4 %)
<i>traT</i>	13 (81,3 %)	38 (88,4 %)	43 (76,8 %)
<i>ompT_A</i>	9 (56,3 %)	28 (65,1 %)	2 (3,6 %)
<i>irp2</i>	5 (31,3 %)	38 (88,4 %)	50 (89,3 %)
<i>fyuA</i>	3 (18,8 %)	38 (88,4 %)	49 (87,5 %)
<i>iutA</i>	10 (62,5 %)	35 (81,4 %)	49 (87,5 %)
<i>usp</i>	1 (6,3 %)	35 (81,4 %)	42 (75,0 %)

V skupini adhezinov je bil gen *fimH* pomnožen v vseh treh skupinah, v nekoliko nižjem odstotku (76,8 %) pri uropatogenih izolatih. Gen *iha* je bil pri vseh iz spodnjih dihalnih poti in uropatogenih vseh pomnožen v podobnem odstotku, medtem ko je bil pri živilskih ESBL vseh ta odstotek nizek, in sicer 12,5 %. Podoben odstotek so imeli živilski in izolati spodnjih dihalnih poti v primeru gena *hra*, ta je bil pri uropatogenih izolatih bistveno nižji, in sicer 1,8 %.

V skupini avtotransporterjev in toksinov so bili v primeru gena *sat* in *fluA* genotipi izolatov spodnjih dihalnih poti in uropatogenih izolatov podobni, medtem ko so imeli živilski ESBL

sevi nižjo prevalenco genov za *sat* in *fluA*. Gen *vat* je bil pomnožen v nizkem odstotku pri kliničnih izolatih, pri živilskih izolatih pa nam ga ni uspelo pomnožiti.

V skupini genov, povezanih z izogibanjem imunskemu sistemu, smo opazili veliko raznolikost. Gen *traT* je bil pomnožen v podobno visokem odstotku pri vseh treh skupinah. Gen *ompT_A* je bil v višjem odstotku pomnožen pri živilskih in izolatih spodnjih dihalnih poti, pri uropatogenih pa samo v 3,6 %. Gen *iss* je bil pri živilskih ESBL izolatih pomnožen v 56,3 %, pri izolatih spodnjih dihalnih poti in uropatogenih izolatih pa samo v 6,9 % in 5,4 %. Gen *kpsMTII* je bil v višjem odstotku pomnožen pri izolatih spodnjih dihalnih poti in uropatogenih izolatih, pri živilskih ESBL izolatih pa samo v 12,5 %.

V skupini genov, odgovornih za privzem železa, so bili vsi trije geni (*irp2*, *fyuA* in *iutA*) pomnoženi v visokem odstotku pri izolatih spodnjih dihalnih poti in uropatogenih izolatih. Pri živilskih ESBL izolatih pa so bili pomnoženi v nižjem odstotku. Edino gen *iutA* je bil pri živilskih ESBL izolatih pomnožen v višjem odstotku (62,5 %).

Genotoksin *usp* je bil pomnožen pri izolatih spodnjih dihalnih poti v 81,4 % in pri uropatogenih izolatih v 75,0 %, pri živilskih izolatih ESBL pa samo v 6,3 %.

4.8.1 Statistična obdelava rezultatov ESBL pozitivnih izolatov *E. coli* iz živil živalskega izvora v primerjavi z humanimi ESBL pozitivnimi izolati

Dobljene rezultate pri ESBL pozitivnih *E. coli* izolatih smo za boljšo preglednost še statistično obdelali s Fisherjevim eksaktnim testom. ESBL pozitivne seve *E. coli* izolirane iz spodnjih dihalnih poti (n = 43) in urogenitalnega trakta (n = 56) smo za ta namen združili v isto skupino (n = 99) in jih primerjal z ESBL pozitivnimi izolati iz živil živalskega izvora (n = 16).

Primerjana podatka sta statistično značilno povezana takrat, kadar je vrednost P ≤ 0,05.

Tabela 19: Statistična primerjava ESBL pozitivnih izolatov *E. coli* med živili živalskega izvora in humanimi kliničnimi izolati.

Table 19: Statistical comparison between ESBL positive *E. coli* isolates from food of animal origin and human clinical isolates.

Geni za dejavnike virulence	ESBL <i>E. coli</i> iz živil živalskega izvora		ESBL <i>E. coli</i> izolirana pri ljudeh	P vrednost
	št. pomnoženih genov	št. pomnoženih genov	pri ljudeh	
<i>fimH</i>	16	82		0,123
<i>iha</i>	2	65		$0,762 \times 10^{-4}$
<i>hra</i>	4	13		0,253
<i>sat</i>	0	73		$1,112 \times 10^{-8}$
<i>vat</i>	0	5		1
<i>fluA</i>	4	79		$0,299 \times 10^{-4}$
<i>kpsMTII</i>	2	78		$5,070 \times 10^{-5}$
<i>iss</i>	9	6		$0,559 \times 10^{-5}$*
<i>traT</i>	13	81		1
<i>ompT_A</i>	9	30		0,051
<i>irp2</i>	5	88		$0,258 \times 10^{-5}$
<i>fyuA</i>	3	87		$4,199 \times 10^{-8}$
<i>iutA</i>	10	84		0,073
<i>usp</i>	1	77		$4,962 \times 10^{-8}$

Poudarjene P vrednosti so bile statistično značilne za humane ESBL pozitivne izolate.

* statistično zančilen za ESBL pozitivne živilske izolate.

V naši raziskavi so bili geni za dejavnike virulence *iha*, *sat*, *fluA*, *kpsMTII*, *irp2*, *fyuA* in *usp* tudi statistično značilni za ESBL pozitivne seve izolirane pri ljudeh iz spodnjega respiratornega in urogenitalnega trakta. Gen *iss* pa je bil statistično značilen za ESBL pozitivne seve izolirane iz živil živalskega izvora.

4.9 PRIMERJAVA GENOTIPOV IZOLATOV *E. coli* IZ ŽIVIL ŽIVALSKEGA IZVORA IN HUMANIH ČREVESNIH IZOLATOV

Primerjali smo 229 izolatov *E. coli* iz živil živalskega izvora s 55 kliničnimi izolati, izoliranih pri ljudeh z driskami. Primerjali smo prisotnost 14 genov za različne dejavnike virulence.

Pri primerjavi dejavnikov virulence smo opazili, da so v skupini adhezinov najbolj primerljivi rezultati pri genu *hra*. Pri vseh ostalih genih iz te skupine je bil odstotek višji pri črevesnih

sevih, kar je bilo pričakovano. Saj črevesni izolati nujno potrebujejo adhezine s katerimi se pritrдиjo na sluznico črevesja, če ne se hitro izločijo s črevesno vsebino.

V skupini toksinov in avtotransporterjev je bil gen *sat* pri črevesnih sevih pomnožen v 27,3 %, v živilskih izolatih pa samo v 2,9 %. Gen *vat* je bil pri obeh skupinah v dokaj nizkem odstotku; pri živilih smo gen pomnožili v 2,9 %, pri črevesnih izolatih pa v 9,1 %. Gen *fluA* smo pomnožili v 20,8 % pri izolatih živil živalskega izvora, pri črevesnih pa v 30,9 %.

Tabela 20: Primerjava dejavnikov virulence med izolati *E. coli* iz živil in kliničnimi črevesnimi sevi izoliranimi pri ljudeh.

Table 20: Comparing virulence factors between *E. coli* isolates from food and human clinical intestinal isolates.

Dejavniki virulence	Živilski izolati	Črevesni izolati
<i>fimH</i>	188 (76,7 %)	53 (96,4 %)
<i>iha</i>	12 (4,9 %)	8 (14,5 %)
<i>hra</i>	43 (17,6 %)	8 (14,5 %)
<i>sat</i>	7 (2,9 %)	15 (27,3 %)
<i>vat</i>	7 (2,9 %)	5 (9,1 %)
<i>fluA</i>	51 (20,8 %)	17 (30,9 %)
<i>kpsMTII</i>	21 (8,6 %)	20 (36,4 %)
<i>iss</i>	40 (16,5 %)	15 (27,3 %)
<i>traT</i>	119 (48,6 %)	30 (54,5 %)
<i>ompT_A</i>	38 (15,5 %)	12 (21,8 %)
<i>irp2</i>	61 (24,9 %)	30 (54,5 %)
<i>fyuA</i>	46 (18,8 %)	27 (49,1 %)
<i>iutA</i>	42 (17,1 %)	21 (38,2 %)
<i>usp</i>	13 (5,3 %)	5 (9,1 %)

V skupini genov za dejavnike, povezane z izogibanjem imunskemu sistemu, smo potrdili gena *traT* in *ompT_A* podoben odstotku. Gen *traT* smo pomnožili v 48,6 % pri živilskih izolatih in v 54,5 % pri črevesnih izolatih. Gen *ompT_A* pa smo pri živilskih izolatih pomnožili v 15,5 % in pri črevesnih izolatih v 21,8 %. Gen *iss* smo pri živilskih izolatih pomnožili v nekoliko nižjem odstotku (16,5 %) kot pri črevesnih izolatih (27,3 %). Gen *kpsMTII* pa je bil pri črevesnih izolatih zastopan v precej višjem odstotku (36,4 %) kot pa pri živilskih izolatih (8,6 %).

V skupini genov za privzem železa so bili vsi trije geni (*irp2*, *fyuA* in *iutA*) pomnoženi v višjem odstotku pri črevesnih sevih, in sicer v 54,5 %, 49,1 % in v 38,2 %. Pri živilskih izolatih pa smo *irp2* pomnožili v 24,9 %, *fyuA* v 18,8 % in *iutA* v 17,1 %.

Genotoksin *usp* je bil pri obeh skupinah pomnožen v nizkem odstotku, pri živilskih izolatih v 5,3 % in črevesnih izolatih v 9,1 %.

4.9.1 Statistična obdelava rezultatov izolatov *E. coli* iz živil živalskega izvora v primerjavi z humanimi črevesnimi izolati

Za boljšo preglednost rezultatov smo izolate *E. coli* iz živil živalskega izvora in humane črevesne izolate še statistično obdelali s Fisherjevim eksaktnim testom. Med seboj smo primerjali ESBL negativne izolate *E. coli* iz živil živalskega izvora ($n = 229$) s humanimi črevesnimi izolati ($n = 55$), ki so bili izolirani pri ljudeh z diarejo.

Primerjana podatka sta statistično značilno povezana takrat, kadar je vrednost $P \leq 0,05$.

Tabela 21: Statistična primerjava *E. coli* izolatov iz živil živalskega izvora z izolati *E. coli* izoliranimi pri ljudeh z diarejo.

Table 21: Statistical comparison between *E. coli* isolates from food of animal origin and *E. coli* isolates from humans with diarrhea.

Geni za dejavnike virulence	<i>E. coli</i> iz živil živalskega izvora št. pomnoženih genov	<i>E. coli</i> izolirana pri ljudeh z diarejo št. pomnoženih genov	P vrednost
<i>fimH</i>	188	53	0,005
<i>iha</i>	12	8	0,034
<i>hra</i>	43	8	0,559
<i>sat</i>	7	15	$2,123 \times 10^{-7}$
<i>vat</i>	7	5	0,060
<i>fluA</i>	51	17	0,217
<i>kpsMTII</i>	21	20	$0,299 \times 10^{-5}$
<i>iss</i>	40	15	0,127
<i>traT</i>	119	30	0,765
<i>ompT</i>	38	12	0,429
<i>irp2</i>	61	30	$0,165 \times 10^{-3}$
<i>fyuA</i>	46	27	$0,271 \times 10^{-4}$
<i>iutA</i>	42	21	0,003
<i>usp</i>	13	5	0,358

Poudarjene P vrednosti so bile statistično značilne za humane črevesne izolate.

V naši raziskavi so bili geni *fimH*, *iha*, *sat*, *kpsMTII*, *irp2*, *fyuA* in *iutA* tudi statistično značilni za seve *E. coli*, ki so bili izolirani pri ljudeh z diarejo.

4.10 DOLOČANJE SEKVENČNE SKUPINE ST131

4.10.1 Določanje sekvenčne skupine ST131 pri ESBL pozitivnih izolatih *E. coli* iz živil živalskega izvora

Izolate *E. coli* z ESBL in BSBL ($n = 22$) iz živil živalskega izvora smo pregledali za gen *O25* in »gospodinjska« gena *mdh36* in *gyrB47*, ki sta značilna za sekvenčno skupino ST131. Rezultati so prikazani v tabeli 22.

Tabela 22: Kombinacije alelov dveh »gospodinjskih« genov in gena *O25* za 22 testiranih živilskih izolatov.
Table 22: Combination of two housekeeping genes and gen *O25* for 22 tested isolates.

Zaporedna št. izolata ESBL pozitivne <i>E. coli</i>	»gospodinjski« geni		
	<i>mdh36</i>	<i>gyrB47</i>	<i>O25</i>
Ž 4	-		-
Ž 8	-		-
Ž 13	-		-
Ž 17	+		-
Ž 24	-		-
Ž 25	-		-
Ž 38	-		-
Ž 39	-		-
Ž 102	-		-
Ž 131	-		-
Ž 178	-		-
Ž 183	-		-
Ž 202	-		-
Ž 208	-		-
Ž 209	-		-
Ž 210	-		-
Ž 211	-		-
Ž 212	-		-
Ž 213	-		-
Ž 214	-		-
Ž 215	-		-
Š 22	-		-

Pri 22 izolatih *E. coli* z ESBL ali BSBL encimi iz živil živalskega izvora nam je uspelo samo pri izolatu Ž 17 pomnožiti alel »gospodinjskega« gena *mdh36*. Protokol za PCR, povzet po literaturi (Johnson in sod., 2009), v primeru »gospodinjskega« gena *gyrB47* ni deloval. Pri nobenem ESBL pozitivnem izolatu *E. coli* nam ni uspelo pomnožiti gena *O25*. Rezultati so pokazali, da noben živilski izolat ni pripadal sekvenčni skupini ST131.

4.10.2 Določanje sekvenčne skupine ST131 pri ESBL pozitivnih izolatih *E. coli* pri kliničnih uropatogenih izolatih izoliranimi pri ljudeh

ESBL pozitivni izolati *E. coli* iz urogenitalnega trakta so bili v diplomski nalogi (Velikonja, 2013) pregledani na gen *O25*. Mi smo jih po protokolu PCR, povzetemu po literaturi (Johnsона in sod., 2009), pregledali še na »gospodinjska« gena *mdh36* in *gyrB47*. Enako kot pri živilskih izolatih, gen *gyrB47* po protokolu nismo uspeli pomnožit.

Tabela 23: Analiza uropatogenih izolatov za sekvenčno skupino ST131.

Table 23: Analysis of uropathogenic isolates for sequence group ST131.

Zaporedna številka izolata ESBL pozitivne <i>E. coli</i>	<i>mdh36</i>	<i>gyrB47</i>	<i>O25</i>	ST131
EŠP 1	-		-	-
EŠP 2	-		-	-
EŠP 3	+		-	-
EŠP 5	+		+	ST131
EŠP 6	+		-	-
EŠP 8	+		+	ST131
EŠP 9	+		+	ST131
EŠP 10	+		+	ST131
EŠP 11	-		-	-
EŠP 12	-		-	-
EŠP 13	+		+	ST131
EŠP 14	+		+	ST131
EŠP 15	-		-	-
EŠP 16	+		+	ST131
EŠP 17	+		+	ST131
EŠP 18	+		+	ST131
EŠP 19	+		+	ST131
EŠP 20	+		+	ST131

Nadaljevanje Tabela 23: Analiza uropatogenih izolatov na sekvenčno skupino ST131.
Sequel Table 23: Analysis of urogenital isolates for sequence group ST131.

Zaporedna številka izolata ESBL pozitivne <i>E. coli</i>	<i>mdh36</i>	<i>gyrB47</i>	<i>O25</i>	ST131
EŠP 21	+		+	ST131
EŠP 22	+		+	ST131
EŠP 23	+		+	ST131
EŠP 24	+		-	-
EŠP 25	-		-	-
EŠP 26	-		-	-
EŠP 27	+		+	ST131
EŠP 28	+		-	-
EŠP 29	-		+	-
EŠP 30	-		+	-
EŠP 31	+		+	ST131
EŠP 32	+		-	-
EŠP 33	-		-	-
EŠP 35	-		-	-
EŠP 36	-		+	-
EŠP 37	+		+	ST131
EŠP 38	+		+	ST131
EŠP 39	+		+	ST131
EŠP 40	+		+	ST131
EŠP 41	+		+	ST131
EŠP 42	+		+	ST131
EŠP 43	+		+	ST131
EŠP 44	+		+	ST131
EŠP 45	+		+	ST131
EŠP 46	+		+	ST131
EŠP 47	+		+	ST131
EŠP 48	+		+	ST131
EŠP 49	+		+	ST131
EŠP 50	-		-	-
EŠP 51	+		+	ST131
EŠP 52	+		+	ST131
EŠP 53	+		+	ST131
EŠP 54	+		+	ST131
EŠP 55	+		-	-
EŠP 56	-		-	-
EŠP 57	+		+	ST131
EŠP 59	+		-	-
EŠP 60	+		+	ST131

Med 56 urogenitalnimi izolati jih je 35 (62,5 %) pripadalo sekvenčni skupini ST131.

4.10.3 Določanje sekvenčne skupine ST131 pri ESBL pozitivnih izolatih *E. coli* iz spodnjih dihalnih poti

ESBL pozitivni izolati *E. coli* iz spodnjih dihal so bili v diplomski nalogi (Molan, 2013) pregledani na sekvenčno skupino ST131. Analizirali so vseh sedem »gospodinjskih« genov (analiza MLST). Spodnja tabela je povzeta iz diplomske naloge, prikazani so samo izolati, analizirani na sekvenčno skupino ST131 in uporabljeni za primerjavo z živilskimi izolati.

Tabela 24: Kombinacije alelov sedmih »gospodinjskih« genov in sekvenčna skupina (ST) za 6 izolatov, uporabljenih za primerjavo z živilskimi izolati (Molan, 2013).

Table 24: Combination of alels of seven housekeeping genes and sequence types (ST) for 6 isolates, used for comparison with food isolates. (Molan, 2013).

Zaporedna št. izolata ESBL pozitivne <i>E. coli</i>	»gospodinjski« geni							Sekvenčna skupina (ST)
	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	
167	53	40	47	13	36	28	29	ST 131
180	53	40	47	13	36	28	29	ST 131
189	36	24	9	13	17	11	25	ST 73 Cplx ^a - NK ^b
191	53	40	47	13	36	28	29	ST 131
195	53	40	47	13	36	28	29	ST 131
205	53	40	47	13	36	28	29	ST 131

Med 43 ESBL pozitivnimi *E. coli* izolati iz spodnjih dihal jih je 29 (67,4 %) pripadlo sekvenčni skupini ST131 (Molan, 2013).

5 RAZPRAVA

Uporaba antibiotikov v humani in veterinarski medicini omogoča učinkovito obrambo v boju pred številnimi bakterijskimi boleznimi, vendar je dolgotrajna in pogosto tudi neupravičena raba privedla do pridobljene odpornosti bakterij proti različnim skupinam antibiotikov (Livermore, 2009). Zdravljenje okužb, ki jih povzročajo odporne bakterije, je postal resen svetovni zdravstveni problem. Največji problem predstavljajo encimi ESBL, ki posredujejo odpornost proti cefalosporinom 3. in redkeje 4. generacije. Geni za encime ESBL se nahajajo na plazmidih, ob njih pa največkrat najdemo še gene za odpornost proti kinolonom. Zadnje desetletje je bilo veliko objav, v katerih avtorji obravnavajo klinične bakterijske seve *E. coli*, ki izločajo encime ESBL in/ali PMQR. Vir bakterijskih sevov, ki imajo v svojem genomu nabor različnih virulentnih dejavnikov in hkrati gene, povezane z determinantami odpornosti proti antibiotikom, naj bi bile živali namenjene za prehrano. Med zakolom in predelavo naj bi se ti sevi prenesli v živila, kar bi posledično predstavljal nevarnost za ljudi (Arslan in sod., 2008; Ben Slama in sod., 2010).

V našem delu smo pregledali 526 vzorcev živil živalskega izvora. Pri malo manj kot polovici vzorcev, in sicer 245 (46,6 %), smo izolirali bakterijo *E. coli*, ki je v živilih sicer pokazatelj fekalne kontaminacije. Za večino teh vzorcev je pred zaužitjem potrebna termična obdelava, s katero uničimo bakterijo *E. coli*, vendar pa smo *E. coli* našli tudi med 3 (8,6 %) pasteriziranimi izdelki in v izdelkih, ki so namenjeni za neposredno uporabo (angl. Ready to eat, RTE). Bakterijo *E. coli* smo tako potrdili v 14 (16,9 %) vzorcih sušenih mesnin, v 3 (30,0 %) zasekah, 3 (50,0 %) seve v skuti iz kravjega mleka, 1 (100 %) sev v maslu, 2 (100 %) seva v skuti in 1 (100 %) sev siru iz kozjega mleka. V primeru omenjenih mlečnih izdelkov je preiskano število vzorcev premajhno za statistično analizo. Vendar pa dejstvo, da se *E. coli* nahaja tudi v pasteriziranih in RTE izdelkih, pomeni tveganje za zdravje ljudi.

Med 245 sevi bakterije *E. coli* je bilo 16 (6,5 %) sevov ESBL pozitivnih. Med njimi je bilo 12 (75 %) sevov iz vzorcev mletega mesa in mesnih pripravkov, 2 (12,5 %) seva iz vzorcev sušenih mesnin, 1 (6,3 %) iz svinjskega mesa in 1 (6,3 %) iz vzorca školjk. Pri proizvodnji mesnih izdelkov je meso podvrženo številnim postopkom, kot so mletje, dodajanje začimb in mešanje, kar predstavlja večji faktor tveganja, da v izdelek vstopijo bakterije, tudi patogene. Za primerjavo navajamo podatek, da smo v nepredelanem svinjskem mesu kot vhodni surovini potrdili le 1 (7,5 %) ESBL pozitivni sev bakterije *E. coli*.

ESBL pozitivni sev smo potrdili tudi v školjkah klapavicah. Slovensko morje, ki je del severnega Jadrana, je zalivskega tipa in zato ekološko izredno občutljivo in ranljivo. Severna tretjina (del Tržaškega zaliva) je plitva in onesnažena, saj se vanj izlivajo večje reke, ki s seboj prinašajo komunalne in industrijske odplake, intenziven pa je tudi ladijski promet (Henigman in sod., 2015). Školjke so filtratorji in se prehranjujejo s precejanjem drobnih vodnih organizmov. Zaradi onesnaženosti slovenskega morja je bakterija *E. coli* pogosto prisotna v školjkah, zato je pred zaužitjem nujno potrebna termična obdelava (Lees, 2000; Le Guyader in sod., 2003).

Z disk difuzijsko metodo smo ugotavljali občutljivost 158 izolatov *E. coli* za 22 antibiotikov. Kar dve tretjini (67,8 %) pregledanih izolatov je bilo občutljivih za vse testirane antibiotike. Občutljivi so bili vsi izolati *E. coli* iz mleka in mlečnih izdelkov, 82 (76,6 %) izolatov iz mesa in mesnih izdelkov in širje izolati iz jajc ter en izolat iz bakalaja. Po podatkih Evropske agencije za uporabo antibiotikov v veterinarski medicini ESVAC (angl. European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption) za leto 2011, je bila Slovenija na 21. mestu med 25 državami, gledano na količino porabljenih protimikrobnih zdravil v živinoreji (ESVAC, 2013). To pa je najbrž razlog, da sta bili dve tretjini sevov občutljivih za vse testirane antibiotike.

Med 51 (32,3 %) izolati *E. coli*, ki so bili odporni proti vsaj enemu antibiotiku, jih je večina iz skupine mesa in mesnih pripravkov, samo dva izolata sta bila iz skupine jajc in jajčnih izdelkov. Oba (3,9 %) izolata iz jajčnega melanža sta bila odporna samo proti florfenikolu, kar je presenetljivo. Florfenikol je namreč protimikroben zdravilo, ki se uporablja izključno v veterinarski medicini, in sicer za zdravljenje obolenj dihalnih poti za prašičje pitance in brojlerje. Uporaba florfenikola je pri nesnicah prepovedana. Sedem izolatov, odpornih proti florfenikolu smo potrdili v naši študiji. Vsi so bili iz skupine MDR odpornih bakterij. Med antibiotike, ki se uporablja izključno v veterinarski medicini, spadata tudi enrofloksacin in neomicin. Prvi spada v skupino kinolonov in se uporablja za zdravljenje okužb dihal, prebavil, septikemij, artritisov in mastitisov pri govedu, drobnici, prašičih in perutnini. Poleg tega ga uporablja še pri psih za zdravljenje okužb urogenitalnega trakta. Našli smo 16 (31,4 %) izolatov, odpornih proti kinolonom: 8 (15,7 %) izolatov je bilo iz vzorcev mesnih pripravkov, 3 (5,9 %) iz perutninskega mesa, po 2 (3,9 %) iz mletega mesa in sušenih mesnin ter en (1,9 %) izolat iz prašičjega mesa. Odpornost proti neomicinu smo ugotovili pri 4 (7,8

%) izolatih *E. coli*. Po podatkih ESVAC (2013) so bili kinoloni na drugem mestu v letu 2011 po uporabljenih skupinah antibiotikov, prvo mesto so zasedli tetraciklini. Aminoglikozidi, kamor spada neomicin, pa so skupina manj prodajanih antibiotikov. V Sloveniji se je v letu 2011 zmanjšala prodaja protimikrobnih zdravil za 6 %, vendar to ne velja za skupino fluorokinolonov. Njihova prodaja je v letu 2011 narasla, kot razlog pa je bila navedena okužba ene matične jate z *E. coli*. Kot ustrezan antibiotik pa se je obnesel edino enrofloksacin (ESVAC, 2013). Kljub vsemu je odpornost proti izključno veterinarskim antibiotikom bistveno nižja, saj smo pri ostalih antibiotikih našli višji odstotek odpornih sevov. Kar 31 (60,8 %) izolatov je bilo odpornih proti ampicilinu, sledili so tetraciklin s 30 (58,8 %), sulfonamid s 25 (49,0 %), trimetoprim s 24 (47,0 %), streptomycin s 23 (45,1 %), cefalotin z 21 (41,2 %) in trimetoprim s sulfametoksazolom z 19 (37,3 %) odpornimi izolati.

Mayer in sod. (2007) so primerjali odpornost bakterij *E. coli*, ki so bile izolirane iz živil, živali in ljudi. Izolati *E. coli* iz živali in živil živalskega izvora so imeli najvišjo odpornost proti tetraciklinu (57 %), sledili so ampicilin (38 %) in trimetoprim v kombinaciji s sulfametoksazolom (37 %). Odpornost proti kloramfenikolu je bila 18,4 %. V primerjavi z našo študijo so ugotovili višjo odpornost proti antibiotikom, čeprav je seznam antibiotikov, proti katerim so bile bakterije *E. coli* odporne, precej podoben.

Pri školjkah smo za analizo odpornosti izolatov *E. coli* uporabili mikrodilucijsko metodo za ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Z njo nam je uspelo analizirati 72 izolatov *E. coli*, 13 izolatov pa ni preživello shranjevanja na vbodnikih. Pri teh 13 izolatih je bila prvotno narejena disk difuzijska metoda, pri katerih jih je bilo 10 občutljivih za vseh 22 preiskanih antibiotikov, pri ostalih treh izolatih *E. coli* pa sta bila po dva izolata odporna proti tetraciklinu in ampicilinu, en izolat pa je bil odporen proti kinolonom.

Z mikrodilucijsko metodo so bili preiskani izolati *E. coli* iz školjk najpogosteje odporni proti tetraciklinu, in sicer 25 (34,7 %) sevov. Sledilo je 21 (29,2 %) sevov odpornih proti ampicilinu, 20 (27,8 %) proti sulfonamidu, 12 (18,1 %) proti trimetoprimu, po 3 (4,2 %) proti ceftazidimu in cefotaksimu, po 2 (2,7 %) proti gentamicinu in kloramfenikolu ter 1 (1,4 %) proti kolistinu. Školjke kot filtratorji morja lahko vsebujejo številne mikroorganizme, ki pridejo preko kanalizacije v morje, zato relativno visoka odpornost ni presenetljiva. Školjke kot ekosistem so neke vrste okoljski pokazatelji odpornosti bakterij v okolju.

Z dobljenimi rezultati smo potrdili našo prvo hipotezo, da lahko iz živil živalskega izvora izoliramo seve *E. coli*, ki so odporni proti betalaktamskim antibiotikom in kinolonom. Skupaj je bilo iz živil živalskega izvora izoliranih 55 (22,4 %) sevov *E. coli*, odpornih proti betalaktamskim antibiotikom, in 16 (6,5 %) sevov odpornih proti kinolonom.

Z mikrodilucijsko metodo smo preverili tudi odpornost pri 55 kliničnih izolatih *E. coli* iz črevesja ljudi z driskami. Na NLZOH so preverili izolate na prisotnost genov, ki so značilni za enteropatogene izolate *E. coli*. Razen enega, ki je bil pozitiven za gen *aap*, so bili presenetljivo vsi izolati negativni za gene za dejavnike virulence. Pri črevesnih sevih je bil najvišji odstotek odpornosti proti tetraciklinu 20 (36,4 %). Sledili so izolati z odpornostjo proti ampicilinu 17 (30,9 %), kinolonom 14 (25,5 %), sulfonamidu 13 (23,6%), trimetoprimu 8 (14,5 %), kloramfenikolu 4 (7,3 %) ter ceftazidimu, cefotaksimu in azitromicinu 2 (3,8 %).

Primerjava odpornosti izolatov iz školjk in kliničnih črevesnih izolatov ljudi kaže, da je odstotek odpornosti pri obeh skupinah zelo podoben za večino testiranih antibiotikov. Iz rezultatov lahko sklepamo, da kljub čistilnim napravam (fekalije se iztekajo v morje) izolati iz školjk posedujejo enako fenotipsko odpornost proti antibiotikom kot črevesni sevi ljudi. To potrjujejo tudi rezultat disk difuzijske metode s katero smo preverili odpornost sevov *E. coli* iz mesa in mesnih izdelkov, mleka in mlečnih izdelkov ter jajc. Proti ampicilinu je bilo odpornih 20,3 % sevov, kar je približno 10,0 % manj kot pri školjkah in črevesnih izolatih ljudi. Razlika je tudi v odpornosti proti kinolonom. Sevi iz mesa in mesnih izdelkov so bili odporni proti kinolonom v 10,1 %, sevi iz školjk v 1,2 % in črevesni izolati v 25,5 %. Sevi iz mesa in mesnih izdelkov so bili v nižjem odstotku odporni tudi proti tetraciklinom in sulfonamidom v primerjavi s sevi iz školjk in črevesnimi sevi ljudi.

Če pogledamo rezultate z vidika odpornosti živilskih in kliničnih sevov *E. coli* proti različnim skupinam antibiotikov, vidimo, da so bili oboji odporni proti istim skupinam, kar ovrže našo tretjo hipotezo, da so sevi *E. coli*, izolirani iz živil živalskega izvora odporni proti drugim protimikrobnim zdravilom, kot sevi, izolirani pri ljudeh.

Mayer in sod. (2007) so preverili odpornost bakterije *E. coli*, izolirane iz urina in hemokultur ljudi. Najvišji odstotek izolatov je bil odporen proti ampicilinu (39 %), sledil so tertraciklin (34 %), piperacilin (28 %), trimetoprim s sulfametoksazolom (27 %), ampicilin s sulbaktamom (13 %) in kinoloni 2. generacije (9 %). S primerjavo njihovih kliničnih izolatov

z našimi smo opazili podoben odstotek odpornosti proti tetraciklinu (34 % oz. 36,4 %), vendar nižjega za ampicilin (39 % oz. 30,9 %), in precej višji odstotek odpornih izolatov proti kinolonom (9 % oz. 25,5 %).

S klasično metodo PCR smo ugotavljali gene za odpornost proti cefalosporinom 3. generacije. Pri izolatih iz živil živalskega izvora smo pomnožili 16 genov za encime ESBL, od tega 12 *bla*_{CTX-M-1}, 2 *bla*_{CTX-M-9} in 2 *bla*_{SHV-12}. Ko smo izolate iz živil živalskega izvora primerjali z ESBL pozitivnimi izolati iz spodnjih dihalnih poti in urogenitalnega trakta pri ljudeh, smo našli dokaj podobno razporeditev encimov za skupine ESBL. Pri vseh treh skupinah vzorcev je bil v najvišjem odstotku zastopan zapis za skupino CTX-M-1 (83,7, 76,8 in 75,0 %), sledila je skupina CTX-M-9 (13,9, 12,5 in 10,7 %). V nižjem odstotku (12,5 %) je bil zastopan zapis za encime skupine SHV pri živilskih in uropatogenih vzorcih. Pri izolatih iz spodnjih dihalnih poti pa je bila skupina SHV zastopan samo v 2,3 %. Rezultati razporeditve encimov v skupine ESBL pri živilskih in kliničnih vzorcih tudi kažejo, da med njimi krožijo zelo podobni sevi *E. coli*. Pri tem pa se postavlja vprašanje, ali se odporni sevi prenašajo iz živil živalskega izvora na ljudi in ali ljudje med rokovanjem z živili v prehrambeni industriji prenašajo odporne seve na hrano. Rezultati so ovrgli našo četrto hipotezo, da se geni za izločanje betalaktamaz pri sevih *E. coli*, izoliranih iz živil, razlikujejo od genov pri sevih *E. coli*, ki jih izoliramo pri ljudeh.

Podobne raziskave so opravili v številnih evropskih državah. Na Nizozemskem so ugotovili visok odstotek (79,8–94 %) ESBL pozitivnih izolatov v piščančjem mesu (Leverstein van Hall in sod., 2011; Kluytmans in sod., 2011). Nasprotno pa v Švici pri pregledu 104 vzorcev mletega mesa in 100 vzorcev surovega mleka niso našli nobenega ESBL pozitivnega izolata *E. coli* (Geser in sod., 2012). V podobni raziskavi v Sloveniji je kar 76,3 % *E. coli* ESBL pozitivnih izolatov iz piščančjega mesa imelo zapis za encime iz skupine CTX-M-1, 1,3 % jih je imelo zapis za skupino CTX-M-2 in 22,2 % za encime iz skupine SHV (Ambrožič Avguštin in sod., 2012). V zadnjem času pa se pri perutnini pojavlja vse večje število odpornih bakterij *E. coli*, tudi ESBL. V naši raziskavi smo analizirali pre malo vzorcev iz perutninskega mesa za kakršenkoli zaključek. Med izolati iz mleka in mlečnih izdelkov so bili vsi, tako kot v Švici, občutljivi na testirane antibiotike. Vendar je bilo enako kot zgoraj število vzorcev premajhno, da bi sklepali, kakšen je odstotek ESBL pozitivnih izolatov.

Enako kot pri genih za encime ESBL smo s klasično metodo PCR preverjali prisotnost genov PMQR, in sicer *qnrA*, *qnrB* in *qnrS*. V tem primeru so se rezultati nekoliko razlikovali; pri 10 (1,6 %) živilskih izolatih smo pomnožili gen za *qnrS*, pri izolatih spodnjih dihalnih poti, uropatogenih in črevesnih izolatih ljudi pa tega gena nismo uspeli pomnožiti. Gen *qnrB* smo pomnožili pri 1 (0,6 %) živilskem izolatu, pri 2 (4,7 %) izolatih iz spodnjih dihalnih poti, pri 1 (1,8 %) urogenitalnem izolatu in pri 2 (3,6 %) črevesnih izolatih. Gena *qnrA* nismo uspeli pomnožiti. V naši raziskavi so sevi *E. coli* iz živil živalskega izvora imeli enako kot klinični sevi različne gene za betalaktamaze in gene za odpornost proti kinolonom, kar potrjuje našo drugo hipotezo.

V Sloveniji so Trkov in sod. (2014) pregledali 84 izolatov bakterije *E. coli* iz živil na prisotnost genov PMQR *qnr*. Vendar jim ni uspelo pomnožiti nobenega alela *qnr*. Naši rezultati se ujemajo s podatki iz literature, po katerih je odstotek genov za odpornost proti kinolonom pri izolatih iz živil nizek. Rezultati so zelo zanimivi, ker so kinoloni tako v humani kot v veterinarski medicini pogosto predpisana oz. uporabljena protimikrobnna zdravila. Glede na to, da smo našli nizek odstotek genov *qnr* pri vseh pregledanih izolatih, je vzrok za višjo fenotipsko odpornost proti kinolonom pričakovano kromosomskega izvora.

Z metodo po Clermontu smo izolate *E. coli* razvrstili v filogenetske (pod)skupine (Clermont in sod., 2000). Po pričakovanju se je večina izolatov spodnjih dihalnih poti in uropatogenih izolatov uvrstila v filogenetski skupini B2 (72,1 in 67,9 %) in D (20,9 in 19,6 %). V ti dve skupini so navadno uvrščeni patogeni izolati (Clermont in sod., 2008; Deschamps in sod., 2009; Derakhshandeh in sod., 2013). Črevesni sevi so bili bolj enakomerno razporejeni v komenzalne in patogene filogenetske skupine, medtem ko je bila večina živilskih izolatov *E. coli* uvrščena v komenzalni skupini A (43,7 %) in B1 (40,4 %), v skupino B2 in D pa bistveno manj (5,7 % oz. 10,2 %). O podobnih rezultatih poročajo tudi pri analizi živil v Južni Koreji, kjer se je 46,3 % sevov razvrstilo v filogenetsko skupino A, 43,2 % v skupino B1, 9,2 % v skupino D in samo 1,3 % v skupino B2 (Koo in sod., 2012). Tudi v Sloveniji so Trkov in sod. (2014) dobili podobne rezultate, in sicer se je med 84 izolati *E. coli* iz živil večina uvrstila v filogenetski skupini A (50 %) in B1 (35,7 %). V skupino D se je uvrstilo 11,9 %, v B2 pa 2,4 %. Opazimo lahko, da je razporeditev v filogenetske skupine izolatov iz naših vzorcev živil in zgoraj omenjenih raziskav precej podobna.

V naši nalogi smo s klasično metodo PCR preverjali prisotnost genov za dejavnike virulence iz skupine adhezinov, avtotransporterjev in toksinov, dejavnikov povezanih z imunskim sistemom, dejavnikov za privzem železa, mikrocina V in genotoksinov.

Adhezine uvrščamo med pomembnejše dejavnike bakterijske patogenosti, ker omogočijo začetek pritrditve na celice gostitelja in s tem otežujejo odstranitev z mesta okužbe oziroma iz telesa (Mulvey, 2002). Zato ni naključje, da nam je uspelo pomnožiti največ dejavnikov virulence prav iz te skupine. V najvišjem odstotku smo pomnožili gen za adhezin *fimH*, in sicer 76,7 % pri izolatih iz živil in 96,4 % pri črevesnih izolatih. Zanimivo je, da sta odstotka zelo podobna pri živilskih in uropatogenih ESBL pozitivnih izolatih *E. coli* (76,7 in 76,8 %), medtem ko so črevesni izolati bolj podobni ESBL pozitivnim izolatom *E. coli* spodnjih dihalnih poti (96,4 in 100 %). Pri nefimbrijskem adhezinu *iha* nam je uspelo pomnožiti gen samo v 4,9 %, medtem ko smo ga pri črevesnih v 14,5 % in pri uropatogenih v 60,7 %. Pri izolatih spodnjih dihalnih poti ga je Molan (2013) pomnožila v kar 72,1 %. Pri gen za adhezin *hra* smo pomnožili nižji odstotek pri uropatogenih izolatih (1,8 %), višji odstotek pa pri črevesnih izolatih (14,5 %) in živilskih izolatih (17,6 %). Medtem pa je Molan (2013) gen *hra* pomnožilia v 27,9 %. Pri živilskih izolatih smo preverjali še prisotnost genov *papGII* in *eae*. Gen *papGII* smo pomnožili v 3,7 %, gena *eae* pa nismo potrdili. Johnson in sod. (2009) so gen za ahezin *iha* pomnožili v 57 %, gen *papGII* v 29 % in gen *hra* v 24 %. Adhezini so zaradi svoje funkcije pomembena lastnost bakterijske celice, zato ni presenetljivo, da je gen *fimH* močno razširjen v populaciji bakterij *E. coli*. Gen *iha* smo po pričakovanju pomnožili pri živilskih izolatih v nižjem odstotku kot pri kliničnih vzorcih. Gen za adhezini predstavlja prvi dejavnik virulence saj ta omogoča bakteriji, da se pritrdi na sluznico gostitelja. V nasprotmen primeru se bakterija izloči iz telesa gostitelja s telesnimi tekočinami oz. črevesno vsebino (Reid in Sobel, 1987; Svanberg, 1986; Wineberg, 1984).

Nekatere patogene bakterije med kolonizacijo gostiteljevega tkiva ali po njej sproščajo različne toksine in invazine, ki poškodujejo gostiteljeve celice ali ekstracelularni matriks med njimi. Na ta način lahko prodrejo v globlje celične plasti, kjer so bolj zaščitene pred delovanjem imunskega sistema in protimikrobnimi snovmi (Kaper in sod., 2004). Najvišji odstotek prisotnosti s tem povezanega gena *fluA* je opisala Molan (2013) pri izolatih spodnjih dihalnih poti (83,7 %), v naši raziskavi smo ga pomnožili v najvišjem odstotku pri uropatogenih izolatih (76,8 %), pri črevesnih in živilskih pa samo v 30,9 oziroma 20,8 %.

Tudi pri genu *sat* so bili rezultati podobni. Najvišji odstotek gena *sat* smo pomnožili pri uropatogenih 76,8 % izolatih, sledili so izolati spodnjih dihalnih poti s 69,8 % (Molan, 2013) in črevesni izolati s 27,3 %. Pri izolatih iz živil smo uspeli pomnožiti gen *sat* v samo 2,9 %. Pri genu *vat* je bil odstotek pri vseh nizek, in sicer 9,1 % pri črevesnih, 5,4 % pri uropatogenih, 4,7 % pri izolatih spodnjih dihalnih poti (Molan, 2013) in 2,9 % pri živilskih izolatih. Bakterijske izolate *E. coli* iz živil živalskega izvora smo dodatno pregledali za gene *hbp*, *astA*, *vtxI* in 2, *cnfI* in 2, *sta*, *eltA*, *estII* in *ehxA*. Uspelo nam je pomnožiti gen *astA* v 11,0 %, gen *hbp* v 4,1 %, gena *cnfI* in *cnf2* v 5,3 oziroma 2,0 % ter gena *vtxI* in *vtx2* v 0,8 oziroma 0,4 %. Ostalih genov nismo uspeli pomnožiti. Johnson in sodelavci (2009) so potrdili gen *sat* v nekoliko nižjem odstotku (56 %) pri izolatih iz spodnjih dihalnih poti in uropatogenih izolatih, a v višjem odstotku pri črevesnih in živilskih izolatih. Gen *vat* je bil pomnožen v primerjavi z našimi izolati v višjem odstotku (31 %). Iskali so tudi gen *astA*, ki so ga potrdili v 7 %, in gen *cnfI*, ki so ga pomnožili v 15 %. V tej skupini so bili rezultati v skladu z domnevo, da so v živilih živalskega izvora komenzalni sevi *E. coli* z majhnim odstotkom genov za dejavnike patogenosti.

Sposobnost bakterije, da se izogne gostiteljevi obrambi in postane invazivna, je v veliki meri odvisna od sestave celične površine. Vloga kapsul, peptidoglikana, proteinov, pilov in antigena O za virulenco je že dolgo časa poznana (Johnson, 1991). V tej skupini dejavnikov virulence so bili rezultati precej različni. Najbolj so si bile skupine podobne pri odstotku pojavljanja gena *traT*. V raziskavi slovenskih izolatov je Molan (2013) gen *traT* potrdila pri 88,4 % respiratornih izolatov, sledili so s 76,8 % izolati iz urogenitalnega trakta, s 54,5 % izolati iz črevesja in z 48,6 % izolati iz živil. Johnson in sod. (2009) so gen *traT* potrdili pri 60 % izolatov iz urina. Pri genu *kpsMTII* so bili rezultati podobni med izolati spodnjih dihalnih poti (Molan, 2013) in urogenitalnimi izolati (81,4 % in 76,8 %). Medtem ko smo gen pri črevesnih izolatih pomnožili v 36,4 %, smo ga pri živilskih uspeli pomnožiti samo v 8,6 %. Rezultati kanadskih izolatov (Johnson in sod., 2009) iz urina in naših izolatov iz urogenitalnega trakta so bili podobni. Johnson in sodelavci (2009) so gen *kpsMTII* pomnožili v 68 %, mi pa smo ga pomožili pri uropatogenih izolatih v 76,8 %. Gen *ompT* so v Kanadi pomnožili v 71 % (Johnson in sod., 2009), podoben odstotek (65,1 %) je dobila tudi Molan (2013) pri izolatih spodnjih dihalnih poti. Pri črevesnih izolatih smo ga pomnožili v 21,8 %, pri živilskih v 15,5 %, pri uropatogenih izolatih pa samo v 3,6 %. Gen *iss* smo pomnožili pri črevesnih izolatih v 27,3 %, pri živilskih izolatih v 16,3 %, pri izolatih iz spodnjih dihalnih

poti v 7,0 % in uropatogenih izolatih v 5,4 %. Pri živilskih izolatih smo iskali še virulentni dejavnik *tcp*, ki pa smo ga pomnožili v samo 1,2 %. Tako kot pri skupini adhezinov, tudi v tej skupini genov za dejavnike virulence vidimo iz rezultatov, da lahko med živilskim in črevesnimi izolati ugotovimo določene povezave, kar poudarja pomen človeškega faktorja v proizvodnji živil in načela dobre higienске prakse.

Železo je nujen element za skoraj vse žive organizme. Nizka topnost železa pri nevtralnem pH pod aerobnimi pogoji je prisilila patogene bakterije, da so razvile visoko učinkovite transportne sisteme, ki priskrbijo zadostno količino železa za njihovo rast (Braun in sod., 1998). Pri izolatih iz spodnjih dihalnih poti (Molan, 2013) in urogenitalnega trakta smo gene za virulentne dejavnike *irp-2*, *fyuA* in *iutA* pomnožili v več kot 80 %. V približno enakem odstotku so Johnson in sodelavci (2009) pomnožili gena *fyuA* in *iutA* (v 84 in 74 %). Ti dejavniki virulence so bili manj pogosti pri izolatih iz črevesja, in sicer *irp-2* v 54,5 %, *fyuA* v 49,1 % in *iutA* v 38,1 %. Ko primerjamo klinične izolate z izolati iz živil, imajo slednji najnižji odstotek teh dejavnikov virulence. Gen *irp-2* smo pri izolatih iz živil živalskega izvora pomnožili v 24,9 %, *fyuA* v 18,8 % in *iutA* v 17,1 %. Izolate iz živil smo preiskali še za dejavnika virulence *iucD* in *iroN*; prvega smo pomnožili v 12,9 % in drugega v 9,0 %. Johnson in sodelavci (2009) so pri izolatih iz urinarnega trakta uspeli pomnožiti *iroN* v 20 %. Pri genih za dejavnike virulence povezanih s privzemom železa, so imeli sevi iz živil živalskega izvora najnižji odstotek prisotnosti. Možna razloga je, da so ti geni bolj prisotni pri izolatih, ki povzročajo zunajčrevesne okužbe.

Gen *usp* kodira bakteriocin z endonukleazno aktivnostjo. Deluje kot protimikrobnna molekula in uničuje sorodne bakterije, ki zasedajo isto ekološko nišo, podobno kot kolicin (Riley, 1993; Sharma in sod., 2002). Tako kot pri ostalih dejavnikih virulence je bil najvišji odstotek prisotnosti gena *usp* pri izolatih spodnjih dihalnih poti (Molan, 2013) in uropatogenih izolatih, in sicer 81,4 in 75,0 %. Johnson in sodelavci (2009) so gen pomnožili v 57 %. Prevalence gena *usp* pri izolatih iz živil je primerljiva s prevalence pri črevesnih izolatih, pri prvih smo *usp* pomnožili v 5,3 %, pri drugih pa v 9,1 %. Pri statistični obdelavi podatkov s Fisherjevim eksaktnim testom smo ugotovili, da so geni za dejavnike virulence *aha*, *sat*, *fluA*, *kpsMTII*, *irp-2*, *fyuA* in *usp* statistično značilni za humane klični ESBL pozitivne izolate *E. coli*. Medtem, ko je gen *iss* statistično značilen za ESBL pozitivne izolate *E. coli* iz živil živalskega izvora. Rezultati so pričakovani saj so bili haumani sevi *E. coli* izolirani pri ljudeh, ki so

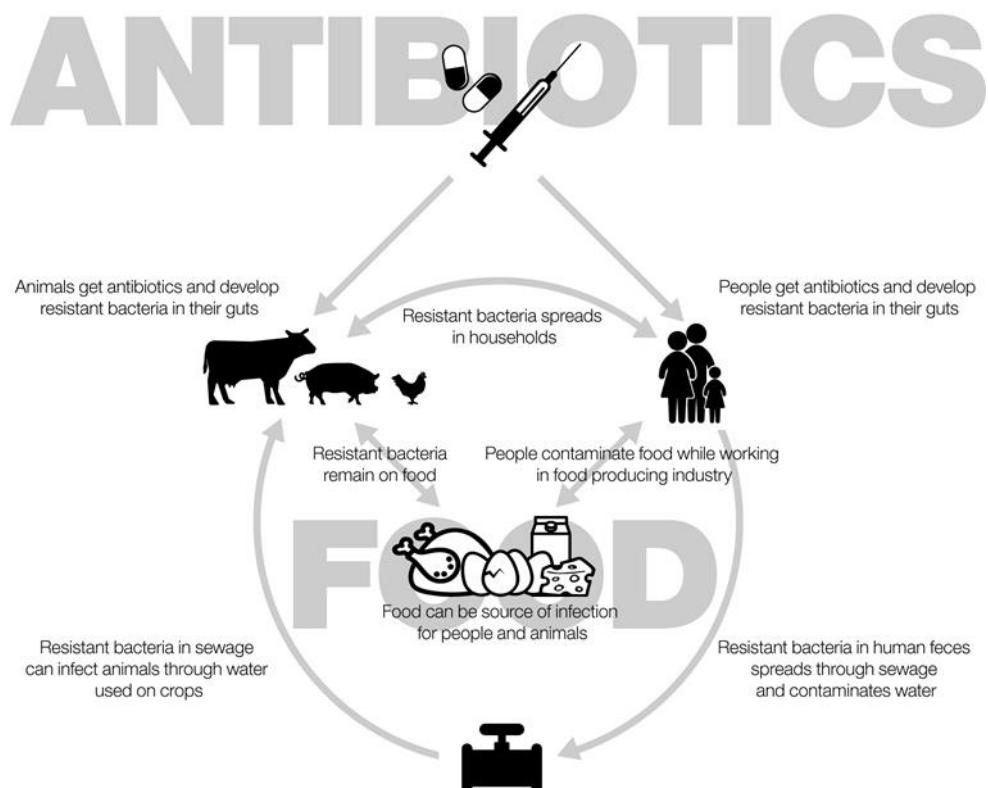
kazali klinične znake bolezni. Za gen *iss* pa že dolgo velja, da je razpoznavna lastnost aviarnih ExPEC sevov, ne pa tudi humanih (Johnson in sod., 2008). Pri statistični analizi ESBL negativnih izolatov *E. coli* pri živilih živalskega izvora in humanih kliničnih sevih *E. coli* izoliranih pri ljudeh z diarejo, smo ugotovili, da so bili geni za dejavnike virulence *fimH*, *iha*, *sat*, *kpsMTII*, *traT*, *irp-2*, *fyuA* in *iutA* statistično značilni za črevesne izolate. Tudi te rezultati so bili pričakovani.

Nabor potencialnih izolatov *E. coli* ST131 lahko pripravimo z določitvijo prisotnosti genov za antigen *o25b* z metodo PCR. Ta nabor lahko dodatno omejimo z določitvijo prisotnosti nekaterih genov za dejavnike virulence, dokončno pa skupino ST ugotovimo le na podlagi alelne kombinacije vseh sedmih »gospodinjskih« genov (Nicholas-Chanoine in sod., 2008). Molan (2013) je 29 (67,4 %) izolatov spodnjih dihalnih poti uvrstila v sekvenčno skupino ST131, podoben odstotek smo ugotovili tudi mi za uropatogene izolate 35 (62,5 %). Pri nobenem izolatu iz živil živalskega izvora nismo uspeli pomnožiti antiga *o25b*, ki nam pomaga zožiti nabor izolatov za analizo. Predstavniki skupine ST131 imajo več genov za odpornost proti antibiotikom (tudi iz več skupin) in številne gene za dejavnike virulence. *E. coli* iz te skupine je razširjena že skoraj pandemično, zato je potrebno okužbe z ESBL pozitivno *E. coli* nadzirati in ob morebitnem povečevanju izolatov tudi ustrezno ukrepati. V živilih živalskega izvora nismo uspeli izolirati predstavnika sekvenčne skupine ST131, kar lahko pomeni, da se ta skupina še ni razširila med populacijo rejnih živali oz. še ni razširjena pri komenzalnih sevih *E. coli*.

Za našo peto hipotezo smo postavili trditev, da se genotipi sevov *E. coli*, izoliranih iz živil živalskega izvora in ljudi, med seboj razlikujejo. Rezultati so pokazali, da so sevi iz živil živalskega izvora in sevi iz ljudi različni, saj so imeli različne genotipe. Iz sevov živil živalskega izvora nam je uspelo izolirati večino preiskovanih genov za dejavnike virulence, a so bili v večini ti pomnoženi v nižjem odstotku kot pa pri sevih, izoliranih iz ljudi. To je razumljivo, saj so bili izolirani klinični sevi *E. coli* določeni kot povzročitelji okužbe pri ljudeh.

Odpornost proti protimikrobnim zdravilom pri komenzalnih sevih bakterije *E. coli* je pokazatelj, kakšna je odpornost pri bakterijah v okolju, od koder prihajajo živila za prehrano ljudi. V današnjem času so dostopna živila z vsega sveta in iz različnih ekoloških niš. Posledično lahko tako bakterije, ki so normalno prisotne v človeški mikrobioti, in patogene

bakterije, nosijo gene za odpornost in/ali gene za dejavnike virulence bakterijskih združb po vsem svetu. Pogosto poteka polemika med strokovnjaki s področja humane in veterinarske medicine o vprašanju, kdo je bolj odgovoren za širjenje odpornih sevov bakterij, vendar odgovor na to vprašanje ni enostaven.



Slika 15: Pojav in prenos odpornih bakterij med ljudmi, živalmi in hrano (Vir: Kirbiš in Križman, 2015).
Figure 15: The occurrence and transfer of resistant bacteria via humans, animals and foodstuffs (Source: Kirbiš in Križman, 2015).

Pomembno je, da se zavedamo, da odporni sevi krožijo. Prepoznati moramo kritične točke v proizvodnji in predelavi živil in preprečiti vstop takih sevov v prehransko verigo. Posebno pozornost bi bilo treba nameniti ljudem, ki delajo v prehranski verigi. Njihovo stalno izobraževanje in ozaveščanje o prenosu odpornih in/ali patogenih bakterijah je zelo pomembno.

Ker je *E. coli* normalno prisotna v črevesni mikrobioti ljudi in toplokrvnih živali, so industrijsko predelana živila in hrana živalskega izvora potencialni vir genov za odpornost in

virulenco. Naši rezultati so pokazali, da so v živilih živalskega izvora v Sloveniji prisotni sevi *E. coli*, ki so hkrati odporni proti več protimikrobnim zdravilom in/ali imajo pomembne virulentne faktorje. Taki sevi lahko povzročajo težke okužbe in zaradi svoje odpornosti zdravljenje otežujejo, včasih tudi onemogočijo.

6 ZAKLJUČKI

V doktorski disertaciji so na podlagi zastavljenih hipotez naši zaključki naslednji:

- 1. hipoteza:** iz živil živalskega izvora lahko izoliramo seve *E. coli*, ki so odporni proti betalaktamskim antibiotikom in kinolonom.

Skupaj je bilo iz živil živalskega izvora izoliranih 55 (22,4 %) sevov *E. coli*, odpornih proti betalaktamskim antibiotikom, in 16 (6,5 %) sevov, odpornih proti kinolonom. Z dobljenimi rezultati smo potrdili našo prvo hipotezo, da lahko iz živil živalskega izvora izoliramo seve *E. coli*, ki so odporni proti betalaktamskim antibiotikom in kinolonom.

- 2. hipoteza:** odporni sevi *E. coli* iz živil živalskega izvora imajo tako kot klinični sevi enega ali več genov za različne betalaktamaze in gene za odpornost proti kinolonom.

V naši raziskavi so sevi *E. coli* iz živil živalskega izvora imeli enako kot klinični sevi različne gene za betalaktamaze in gene za odpornost proti kinolonom, kar potrjuje našo drugo hipotezo. Pri izolatih *E. coli* iz živil živalskega izvora smo pri 12 izolatih pomnožili gen *bla*_{CTX-M-1}, pri 2 gen *bla*_{CTX-M-9}, pri 2 gen *bla*_{SHV-12}, pri 1 gen *bla*_{CMY-2} in pri 6 gen *bla*_{TEM-1}. Gen za odpornost proti kinolonom *qnrS* smo pomnožili pri 10 izolatih iz živil živalskega izvora, *qnrB* pa pri 1 izolatu.

- 3. hipoteza:** odporni sevi *E. coli*, izolirani iz živil, so odporni proti drugim protimikrobnim zdravilom, kot so sevi, izolirani pri ljudeh.

Če pogledamo rezultate z vidika odpornosti živilskih in kliničnih sevov *E. coli* proti različnim skupinam antibiotikom, vidimo, da sta obe skupini odporni proti istim skupinam antibiotikov, kar ovrže našo tretjo hipotezo.

- 4. hipoteza:** geni za izločanje betalaktamaz pri sevih *E. coli*, izoliranih iz živil, se razlikujejo od genov pri sevih *E. coli*, ki jih izoliramo pri ljudeh.

Živilski in klinični izolati so imeli zelo podoben odstotek zapisov za skupino encimov za betalaktamaze. Med izolati iz živil živalskega izvora smo v 75 % ugotovil zapis za encime skupine CTX-M-1 83,7 oz. 76,8 % pri človeških kliničnih izolatih iz respiratornega oz urogenitalnega trakta. Za skupino CTX-M-9 je bil pri živilskih izolatih ugotovljen v 12,5

%, pri kliničnih respiratornih in uropatogenih izolatih pa v 13,9 oz 10,7 %. Zapis za encim iz skupine SHV je bil pri živilskih in človeških uropatogenih izolatih ugotovljen v 12,5 %, pri respiratornih pa v 2,3 %. Edina razlika je bila pri skupini encimov za betalaktamaze TEM, in sicer smo ga pri živilskih izolatih ugotovili v 2,4 %, pri kliničnih respiratornih in uropatogenih izolatih pa v precej višjem odstotku, 48,8 oz 41,1 %. Dobljeni rezultati so pretežno ovrgli našo četrto hipotezo.

5. hipoteza: genotipi sevov *E. coli*, izoliranih iz živil živalskega izvora in ljudi, se med seboj razlikujejo.

Rezultati so pokazali, da so sevi iz živil živalskega izvora in klinični sevi izolirani pri ljudeh, različni in so razvrščeni v različne genotipe. Pri sevih iz živil živalskega izvora nam je uspelo dokazati večino genov za dejavnike virulence, a so bili v večini ti pomnoženi pri nižjem nižjem odstotku izolatov kot pa pri izolatih ljudi, ki so imeli obolenje povzročeno z bakterijo *E. coli*.

7 POVZETEK

Izolati bakterije *Escherichia coli*, ki izločajo betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja (angl. extended spectrum beta-lactamases, ESBL), so razširjeni v številnih državah po svetu in tudi v Sloveniji. Uvrščamo jih v štiri skupine, in sicer po Amblerju v razrede od A do D oziroma od 1 do 4, kot je predlagala Bushova s sodelavci. Fenotipsko odpornost bakterije *E. coli* se v diagnostične namene določa s mikrodilucijsko metodo. S klasično metodo PCR pa določimo skupino encima ESBL.

Namen doktorskega dela je bil preveriti prisotnost bakterij vrste *E. coli*, ki so odporne proti betalaktamskim antibiotikom in fluorokinolonom, v živilih živalskega izvora. Želeli smo tudi določiti fenotipske in genotipske lastnosti sevov *E. coli*, ki so bili izolirani iz živil živalskega izvora na Inštitutu za varno hrano, krmo in okolje Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Analizirali oziroma ugotavliali smo njihovo odpornost proti različnim protimikrobnim zdravilom, jih razvrstili v t. i. filogenetske skupine (A, B1, B2 in D) in preverili prisotnost različnih dejavnikov virulence. Pogosto se kot vir odpornih sevov *E. coli* omenja hrana živalskega izvora, zato smo seve *E. coli*, izolirane iz živil živalskega izvora, primerjali z ESBL pozitivnimi sevi, izoliranimi iz spodnjih dihal in urogenitalnega trakta ljudi, ter sevi *E. coli*, izoliranimi iz črevesja ljudi, ki so imeli težave z driskami. Vsi sevi so bili izolirani v enakem časovnem obdobju.

V okviru doktorskega dela smo najprej izolirali bakterijo *E. coli* iz živil živalskega izvora. S pomočjo enostavnih biokemijskih testov IMViC (Indol, metil rdeče, Voges-Proskauer in citrat) smo ločili *E. coli* od ostalih predstavnikov družine *Enterobacteriaceae*. Po potrebi smo seve dodatno determinirali s komercialnim biokemijskim kompletom API 20 E, kasneje pa smo izolate bakterije *E. coli* potrdili še z metodo masne spektrometrije za identifikacijo bakterij s tehnologijo MALDI-TOF. V nadaljevanju smo 158 vzorcev iz živil živalskega izvora z disk difuzijsko metodo pregledali na odpornost proti 22 protimikrobnim snovem. Izolate bakterije *E. coli* iz vzorcev školjk in črevesnega trakta ljudi smo z mikrodilucijsko metodo testirali na odpornost proti 14 protimikrobnim snovem. Vsem ESBL pozitivnim izolatom *E. coli* smo s klasično metodo PCR določili skupino za encime ESBL.

Pri 245 izolatih *E. coli* iz živil živalskega izvora in 55 humanih črevesnih izolatih smo s klasično metodo PCR poskušali pomnožiti gene *qnrA*, *qnrB* in *qnrS* za plazmidno

posredovano odpornost proti kinolonom (angl. plasmid mediated quinolone resistance, PMQR). Nato smo vse izolate *E. coli* uvrstili v filogenetske skupine in preverili prisotnost genov za dejavnike virulence.

Dobljene rezultate smo primerjali z rezultati pri sevih bakterije *E. coli*, ki so bili izolirani iz spodnjih dihalnih poti, urogenitalnega trakta in črevesja ljudi v istem časovnem obdobju kot izolati iz živil živalskega izvora.

Med 245 izolati bakterije *E. coli* smo našli 6,5 % ESBL pozitivnih in 4,5 % izolatov z genom za PMQR. Dva (0,8 %) izolata sta imela hkrati gen za ESBL in PMQR. En izolat je bil izoliran iz vzorca suhe salame, drugi pa iz mesnega pripravka.

Izolati iz živil živalskega izvora so se v večini (84,1 %) uvrstili v komenzalni filogenetski skupini A in B1, humani črevesni izolati so se v skupino A in B1 uvrstili v 58,1 %. Pri razvrščanju živilskih izolatov ESBL in humanih izolatov iz spodnjih dihal ter uropatogenih izolatov, je 75,0 % izolatov iz živil spadalo v komenzalni filogenetski skupini A in B1, medtem ko je 93,0 % izolatov iz spodnjih dihalnih poti in 87,6 % uropatogenih bilo uvrščeno v patogeni filogenetski skupini B2 in D.

Pri analizi genov za dejavnike virulence smo ugotovili, da so izolati iz živil živalskega izvora, ki so bili uvrščeni v patogeni filogenetski skupini B2 in D, vsebovali več dejavnikov virulence kot izolati iz komenzalnih skupin A in B1, kar je seveda razumljivo. Največkrat so izolati iz živil poleg gena za *fimH* imeli gena iz skupine za privzem žeze *traT* in *iutA*. Oba omenjena gena sta bila pri vseh ESBL pozitivnih skupinah pomnožena v podobnem odstotku.

Pri uvrščanju ESBL pozitivnih izolatov v sekvenčno skupino ST131 nam iz živil živalskega izvora ni uspelo pomnožiti gena *o25b*, zato sklepamo, da nobeden od izolatov ne pripada tej skupini. Pri uropatogenih izolatih smo uspeli v skupino ST131 uvrstiti 62,5 % izolatov.

V doktorski nalogi nam je uspelo potrditi prvi dve hipotezi. Iz živil živalskega izvora smo izolirali seve *E. coli*, ki so bili odporni proti betalaktamskim anitibiotikom in kinolonom. Odporni sevi iz živil pa so imeli tako kot klinični enega ali več genov za različne betalaktamaze in gene za odpornost proti kinolonom. Tretjo in četrto hipotezo smo ovrgli, ker so bili sevi *E. coli* iz živil in sevi, izolirani pri ljudeh, odporni proti enakemu protimikrobnim zdravilom. Tudi skupine encimov za izločanje betalaktamaz so bili enaki pri izolatih iz živil in

humanih izolatih. Pri peti hipotezi smo primerjali genotipe sevov *E. coli*, izoliranih iz živil živalskega izvora, in genotipe sevov, izoliranih pri ljudeh. Rezultati so pokazali, da so sevi iz živil živalskega izvora in klinični sevi izolirani pri ljudeh različni in so razvrščeni v različne genotipe.

V raziskavi smo potrdili prisotnost odpornih in potencialno patogenih sevov *E. coli* v živilih živalskega izvora. To pomeni, da je uživanje surovih ali nezadostno topotno obdelanih izdelkov lahko zdravju škodljivo.

8 SUMMARY

Escherichia coli isolates equipped with extended spectrum beta-lactamases (ESBL) are present in numerous countries and also in Slovenia. They are divided in 4 groups from A to D according to Ambler, or from 1 to 4 according to Bush et al. Phenotypical resistance of *E. coli* is defined by microdilution method for detecting of minimal inhibitory concentration. With classical PCR we can define type of ESBL enzyme.

The aims of this study were to determine presence of broad-spectrum cephalosporin and fluoroquinolones resistance in *E. coli* isolates recovered from food samples of animal origin in Slovenia. In addition, the resistance patterns and genotype diversity of *E. coli* strains isolated from food samples at Institute for food safety, feed and environment, Veterinary faculty, University of Ljubljana, was determined. We analyzed resistance to different antibiotics, assigned *E. coli* isolates to four main phylogenetic groups (A, B1, B2 and D) and screened for the presence of genes encoding virulence factors. Because food of animal origin is suspected as a source of bacteria *E. coli* with resistance genes, we compared food ESBL-positive isolates with human clinical ESBL-positive strains and human intestinal *E. coli* strains isolated in the same year in Slovenia.

Within the framework of the study we isolated *E. coli* strains from food of animal origin. With biochemical methods IMViC (Indole, Methyl red, Voges-Proskauer and Citrate) we divide *E. coli* from other members of *Enterobacteriaceae* family. Additionally we used commercial biochemical test API 20 E, later on *E. coli* isolates were confirmed by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. With disc diffusion method we tested 158 *E. coli* isolates for susceptibility to 22 antimicrobials. *E. coli* isolates from sea shells and human intestinal tract were tested for susceptibility to 14 antimicrobials with microdilution method for determining minimal inhibitory concentrations. For all phenotypically ESBL-positive isolates we determined type of ESBL enzyme with classical PCR.

Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* were screened with a multiplex PCR method for all 245 *E. coli* isolates from food of animal origin and 55 human intestinal *E. coli* isolates. Additionally *E. coli* isolates were assigned to four main

phylogenetic groups and were screened for the presence of genes encoding virulence factors including humane intestinal *E. coli* isolates.

Our results were compared with results with *E. coli* isolates from human lower respiratory and urogenital tract that were isolated in the same time period as our isolates.

Among 245 *E. coli* isolates we found 6.5% of ESBL-positive isolates and 4.5% isolates with PMQR gene. Two (0.8%) isolates had ESBL and PMQR gene; one isolate came from dried salami, other from meat preparation.

E. coli isolates from food of animal origin mainly 84.1% belonged to commensal phylogenetic groups A and B1 as well as human intestinal isolates 58.1%. Comparing ESBL-positive isolates from food of animal origin with human respiratory and uropathogen isolates, we found that 75.0% of food isolates belonged to commensal phylogenetic groups A and B1, whereas 93.0% respiratory and 87.6% uropathogen isolates belonged to pathogen phylogenetic groups B2 and D.

Concerning distribution of genes for virulence factors, we found that isolates from food of animal origin which belonged to pathogen phylogenetic groups B2 and D had understandably more genes for virulence factors than isolates from commensal groups A and B1. The most common gene for virulence factor in food isolates was *fimH*, followed by *traT* and *iutA*. Both *traT* and *iutA* genes were present in all ESBL-positive isolates in the similar percentage.

Among ESBL producing strains from food of animal origin all strains were negative for antigen *o25b*. Among urogenital isolates 62.5% were assigned to sequence group ST131.

Within the framework of the study confirmed two hypotheses. From the food of animal origin we isolated *E. coli* strains that were resistant to beta-lactam antibiotics and quinolones. Resistant strains from food had as clinical strains, one or more genes for different beta-lactamases and genes for resistance to quinolones. We refuted third and fourth hypothesis, because *E. coli* strains from food and *E. coli* strains from humans were resistant to same groups of antibiotics. Also enzyme groups for beta-lactamases were the same in food and human isolates. In our fifth hypothesis we analyzed and compared genotype of *E. coli* strains isolated from food of animal origin and genotype from human strains. Results showed that

strains from food of animal origin and human clinical strains were different and they belonged to different genotype.

In our research we found resistant and potentially pathogen strains of *E. coli* in food of animal origin therefore raw or undercooked food can be potentially harm fool for human health.

9 ZAHVALE

Mentorju prof. dr. Andreju Kirbišu in somentorici doc. dr. Ireni Zdovc se zahvaljujem za vso strokovno pomoč, vodenje in nasvete pri nastajanju doktorskega dela.

Zahvaljujem se članom komisije, viš. znan. sod. dr. Branetu Krtu, prof. dr. Olgi Zorman Rojs in doc. dr. Jerneji Ambrožič Avguštin za natančen pregled in predloge za izboljšanje doktorskega dela.

Za natančen pregled citirane literature se zahvaljujem vodji Centra za informatiko in knjižnico na Veterinarski fakulteti mag. Brigit Greč-Smole. Za lektoriranje doktorskega dela se zahvaljujem lektorici Vidi Meško in prof. dr. Rogerju Painu za strokovno lektoriranje angleškega dela doktorske disertacije. Za srčno pomoč in strokovne nasvete se zahvaljujem mag. Mateji Stvarnik.

Zahvaljujem se dr. Mariji Trkov in Nacionalnemu laboratoriju za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) za zbirko kliničnih črevesnih sevov bakterije *E. coli*. Zahvaljujem se Katji Molan in Urški Velikonji ter njuni mentorici doc. dr. Jerneji Ambrožič Avguštin za uporabo podatkov iz diplomskega dela.

Za podporo in pomoč se zahvaljujem tudi vsem svojim sodelavcem iz Enot za varno hrano. Za pomoč pri laboratorijskem delu se zahvaljujem sodelavcem in prijateljem Duši, Dragici, Robiju, Petri, Urški, Urši, Aleši, Majdi in Stanki. Urška J.C., hvala za izčrpno pomoč in učenje pri molekularnih metodah. Za vso tehnično podporo pri izdelavi doktorske disertacije se zahvaljujem Luki in možu Jerneju. Za pomoč pri statistični obdelavi podatkov se zahvaljujem sodelovki Tanji Knific.

Posebej se zahvaljujem doc. dr. Jerneji Ambrožič Avguštin, da me je usmerjala in mi omogočila izdelavo doktorske disertacije. Pod njenim vodstvom sem se ogromno naučila, tako v laboratoriju kot v življenju nasploh. Zahvaljujem se tudi delavcem in študentom Biotehniške fakultete na katedri za Molekularno genetiko in biologijo organizmov: Katja, Daša, Aleksandra, Maja, Matevž, Bojan, Patricija, Babsi, Gregor in Zdravko brez vas ne bi vzljubila genetike ☺.

Za podporo in pomoč se zahvaljujem delavcem na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Ireni, Majdi, Olgi, Maji, Nataši, Milojki, Magdi, Urški, Darji, Mateji, Nini in Bojanu.

Na koncu bi se še zahvalila svojemu možu Jerneju, otrokom Sari in Andreju, staršema Tatjani in Dušanu ter bratu Roku, da me razumejo in vedno verjamejo vame. Hvala Tini, Teji in Primožu, Darji in Tadeju, Jani in Ivetu, Elvisu in Janezu V.

10 LITERATURA

- Agresti A. A Survey of Exact Inference for Contingency Tables. *Statist Sci* 1992;7:131–53.
- Al-Abri SS, Beeching NJ, Nye FJ. Traveller's diarrhoea. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 349–60.
- Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, di Ilio C. *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health* 2013; 10(suppl. 12): 6235–54.
- Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 1980; 289: 1036: 321–31.
- Antão EM, Wieler LH, Ewers C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog* 2009; 1: 22 (12 str.).
<http://gutpathogens.biomedcentral.com/articles/10.1186/1757-4749-1-22> (25. 10.2016)
- Arslan S, Özdamir F. Extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains isolated from homemade white cheeses: prevalence and antibiotic susceptibility. *World J Microbiol Biotechnol* 2008; 24: 2361–4.
- Baaden M, Sansom MSP. OmpT: molecular dynamics simulations of an outer membrane enzyme. *Biophys J* 2004; 87: 2942–53.
- Bahrani-Mougeot FK, Gunther IV NW, Donnenberg MS, Mobley HLT. *Escherichia coli*: virulence mechanisms of a versatile pathogen: uropathogenic *Escherichia coli*. San Diego, California: Academic Press, 2002: 239–68.
- Baquero F, Nombela C, Cassel GH, Gutierrez JA. Evolutionary biology of bacterial and fungal pathogens. Washington DC: ASM Press, 2008: 249–270.
- Bauer ME, Welch RA. Characterization of an RTX toxin from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 1996; 64(1): 167–75.
- Ben Slama K, Jouini A, Ben Sallem R, Somalo S, Saenz Y, Estepa V. Prevalence of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolates in food samples in Tunisia, and characterization of integrons and antimicrobial resistance mechanisms implicated. *Int J Food Microbiol* 2010;137: 281–6.

- Bilinski P, Kapka Skrzypczak L, Posobkiewicz M, Bondaryk M, Holownia P, Wojtyla A. Public health hazards in Poland posed by foodstuffs contaminated with *E. coli* O104:H4 bacterium from the recent European outbreak. *Ann Agric Environ Med* 2012; 19: 3–10.
- Bonacorsi SP, Clermont O, Tinsley C, et al. Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. *Infect Immun* 2000; 68(4): 2096–101.
- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(1): 1–14.
- Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4): 933–51.
- Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, et al. Genetic background of *Escherichia coli* and extended spectrum β -lactamase type. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(1): 54–61.
- Braun V, Hantke K, Köster W. Bacterial iron transport: mechanisms, genetics and regulation. *Met Ions Biol Syst*. 1999; 35: 67–145.
- Brinas L, Moreno MA, Zarazaga M, et al. Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 beta-lactamases in *Escherichia coli* fecal sample isolates from healthy chickens. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(6): 2056–8.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(6): 1211–33.
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3): 969–79.
- Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(10): 3801–4.

Chapman TA, Wu XY, Barchia I, et al. Comparison of Virulence Gene Profiles of *Escherichia coli* Strains Isolated from Healthy and Diarrheic Swine. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(suppl. 7): 4782–95.

Cirl C, Wieser A, Yadav M, et al. Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nat Med* 2008; 14: 399–406.

Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(suppl. 10): 4555–8.

Clermont O, Lavollay M, Vimont S, et al. The CTX-M-15 producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 1024–8.

Clermont O, Dhanji H, Upton M, et al. Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64(2): 274–7.

Coelho A, Mora A, Mamani R, et al. Spread of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131 producing CTX-M-15 and SHV-12 with high virulence gene content in Barcelona (Spain). *J Antimicrob Chemother* 2010; 66(3): 517–26.

Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 490–5.

Darfeuille Michaud A. Adherent-invasive *Escherichia coli*: A putative new *E. coli* pathotype associated with Chron's disease. *Int J Med Microbiol* 2002; 292: 185–93.

Delahay RM, Frankel G, Knutton S. Intimate interaction of enteropathogenic *Escherichia coli* at the host cell surface. *Infec Dis* 2001; 14: 559–65.

Derakhshandeh A, Firouzi R, Moatamedifar M, Motamedi A, Bahadori M, Naziri Z. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains isolated from human samples. *Mol Biol Res Commun* 2013; 2(4): 143–9.

Deschamps C, Clermont O, Hipeaux MC, Arlet G, Denamur E, Bragner C. Multiple acquisitions of CTX-M plasmids in the rare D2 genotype of *Escherichia coli* provide evidence for convergent evolution. *Microbiol* 2009; 155: 1656–68.

Dozois CM, Fairbrother JM, Harel J, Bossé M. Pap-and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect Immun* 1992; 60: 2648–56.

Duguid JP, Clegg S, Wilson MI. The fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 1979; 12: 213–27.

El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. *Clin Microbiol Rev* 2015; 28(1): 191–207.

EMA. Sales of veterinary antimicrobial agents in 25 EU/EEA countries in 2011: third ESVAC report. London: European Medicines Agency, 2013: (EMA/236501/2013). 97 str. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2013/10/WC500152311.pdf (12.9.2016).

Ewers C, Schüffner C, Weiss R, Baljer G, Wieler LH. Molecular characteristics of *Escherichia coli* serogroup O78 strains isolated from diarrheal cases in bovines urge further investigations on their zoonotic potential. *Mol Nutr Food Res* 2004; 48: 504–14.

Falkowski W, Edwards M, Schaeffer AJ. Inhibitory effect of substituted aromatic hydrocarbons on adherence of *Escherichia coli* to human epithelial cells. *Infect Immun* 1986; 52: 863–6.

Fröhlich J, Baljer G, Menge C. Maternally and naturally acquired antibodies to shiga toxins in a cohort of calves shedding shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75(11): 3695–704.

Gaschignard J, Levy C, Romain O, et al. Neonatal bacterial meningitis: 444 cases in 7 years. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30(3): 212–7.

Geser N, Stephan R, Hächler H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat

and raw milk. BMC Vet Res 2012; 8: e21 (9str.)
<https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-6148-8-21>

Gubina M, Ihan A, Števanec M. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo.
Ljubljana: Medicinski razgledi, 2002.

Hata M, Suzuki M, Matsumoto M, et al. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(2): 801–3.

Heider LC, Hoet AE, Wittum TE, et al. Genetic and phenotypic characterization of the *bla*_{C_MY} gene from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from food-producing animals, humans, the environment, and retail meat. Foodborne Pathog Dis 2009; 6(10): 1235–40.

Henigman U, Biasizzo M, Vadnjal S, et al. Molecular Characterization of noroviruses detected in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from harvesting areas in Slovenia. New Microbiol 2015; 38: 225–33.

Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicity single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. J Bacteriol 1990; 172(11): 6175–81.

Horton RA, Randall LP, Snary EL, et al. Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production. Appl Environ Microbiol 2011; 77(11): 3715–9.

Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. Clin Infect Dis 2005; 41(2): 120–6.

Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, et al. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(4): 1178–82.

Jacoby G, Cattoir V, Hooper D, et al. 2008. *qnr* gene nomenclature. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 2297–9.

Janßena T, Schwarza C, Prekschata P, Voss M, Philipp HC, Wielera LH. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int J Med Microbiol* 2001; 291(5): 371–8.

Johnson J, Brown J. A novel multiply primed polymerase chain reaction assay for identification of variant *papG* genes encoding the G(alpha 1-4)Gal-binding PapG adhesins of *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1996; 173: 920–6.

Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infections. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4(1): 80–128.

Johnson JR, Russo TA, Tarr PI, et al. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN_{E.coli}*, among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infect Immun* 2000; 68(5): 3040–7.

Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 2000; 181(1): 261–72.

Johnson JR, Menard M, Johnson B, Kuskowski MA, Nichol K, Zhanel GG. Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(7): 2733–9.

Johnson JR, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Castanheira M. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. *Clin Infect Dis* 2010; 51(3): 286–94.

Johnson TJ, Kariyawasam S, Wannemuehler YM, et al. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J Bacteriol* 2007; 189(8): 3228–36.

Johnson TJ, Wannemuehler YM, Nolan LK. Evolution of the *iss* Gene in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(8): 2360–9.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 123–40.

Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol* 2010; 140: 360–70.

Kelly WL. Lex marks the spot: the virulent side of SOS and closer look of LexA regulon. *Mol Microbiol* 2006; 62(5): 1228–38.

Kirbiš A, Križman M. Spread of antibiotic resistant bacteria from food of animal origin to humans and vice versa. *Procedia Food Sci* 2015; 5: 148–51.

Kluytmans J, Overdevest I, Willemse I, et al. Extended-spectrum β-lactamase gens of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(7): 1216–22.

Kobal S, Snoj T. Protibakterijska zdravila v veterinarski medicine. Ljubljana: Iris, mednarodna trgovina: Veterinarska fakulteta, 2015: 14–17.

Koo HJ, Kwak HS, Yoon SH, Woo GJ. Phylogenetic group distribution and prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolates from food samples in South Korea. *World J Microbiol Biotechnol* 2012; 28(4): 1813–16.

Kostakioti M, Stathopoulos C. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* 2004; 72(10): 5548–54.

Krewulak KD, Vogel HJ. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778(9): 1781–804 .

Krivic B, Blažič T, Dermota U. Difuzijski antibiogram. *Farm Vestn* 2004; 55: 441–2.

Kurazono H, Yamamoto S, Nakano M, et al. Characterization of a putative virulence island in the chromosome of uropathogenic *Escherichia coli* possessing a gene encoding a uropathogenic-specific protein. *Microb Pathog* 2000, 28(3): 183–9.

Le Guyader F, Estes MK, Hardy ME, et al. A semi-quantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. *Int J Food Microbiol* 2003; 87: 107–12.

Lees D. Viruses and bivale shellfish. *Int J Food Microbiol* 2000; 59: 81–116.

Lesher GY, Froelich ED, Gruet MD, Bailey JH, Brundage RP. 1,8 Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J Med Pharm Chem* 1962, 91: 1063–5.

Leverstein van Hall MA, Dierikx CM, Cohen SJ, et al. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(6): 873–80.

Linares JF, Gustafsson I, Baquero F, Martinez JL. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(51): 19484–9.

Lindič J. Okužba sečil. *Krka Med Farm* 2003; 24(1): 11–62.

Health Protection Agency. Livermore DM, Woodford N. Guidance to diagnostic laboratories, laboratory detection & reporting of bacteria with extended-spectrum β-lactamases. National Standard Method QSOP 51/1. London: Standards unit, evaluations and standards laboratory, 2004: 1–16.

Livermore DM. β-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4): 557-84.

Livermore DM. Definining an extended-spectrum β-lactamase. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(1): 3–10.

Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother* 2009; 64 (1): 29–36.

Ma L, Chang FY, Fung CP, et al. Variety of TEM-, SHV-, and CTX-M-type beta-lactamases present in recent clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* from Taiwan. *Microb Drug Resist* 2005; 11(1): 31–9.

Madigan TM, Martinko MJ. Brock biology of microorganisms. 11th ed. New York: Person Education, 2006: 817–923.

Manges AR, Johnson JR. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. Clin Infect Dis 2012; 55(5): 712–9.

Maurer JJ, Brown TP, Steffens WL, Thayer SG. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*. Avian Dis 1998; 42(1): 106–18.

Meyer E, Lunke C, Kist M, Schwab F, Frank U. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from food, animals and humans in Germany. Infection 2008; 36(1): 59–61.

Mitscher LA, Devasthale P, Zavod R. Structure-activity relationships. In: Hoper DC, Wolfson JS. Quinolone antimicrobial agents. 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 1993: 3–51.

Molan K. Genotipizacija sevov vrste *Escherichia coli*, izoliranih iz vzorcev človeškega respiratornega trakta. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2013. Diplomsko delo.

Montville TJ, Matthews KR, Kniel KE. Food microbiology: an introduction. 3rd ed. Washington DC: ASM Press, 2012: 170–87.

Mulvey MA. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. Cell Microbiol 2002; 4(5): 257–71.

Nataro JP, Steiner T, Guerrant RL. Enteropathogenic *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis 1998; 4: 251–61.

Negroni A, Costanzo M, Vitali R et al. Characterization of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from pediatric patients with inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2012; 18(5): 913–24.

- Neilands JB, Bindereif A, Montgomerie JZ. Genetic basis of iron assimilation in pathogenic *Escherichia coli*. Curr Top Microbiol Immunol 1985; 118:179–95.
- Nicolas Chanoine MH, Blanco J, Lefton Guibout V, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. J Antimicrob Chemother 2008; 61(2): 273–81.
- Norris S, Mandell GL. The quinolones: history and overview. London: Academic Press, 1988: 1–22.
- Ofek I, Mirelman D, Sharon N. Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. Nature (London) 1977; 265: 623–5.
- Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marches O, Caprioli A. Typing of intimin genes in human and animal enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin varioant. Infect Immun 2000; 68: 64–71.
- Parham NJ, Pollard SJ, Desvaux M, et al. Distribution of the serine protease autotransporters of the *Enterobacteriaceae* among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 2005; 43: 4076–82.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005; 18(4): 657–86.
- Pérez Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol 2002; 40(6): 2153–62.
- Peirano G, Pitout JD. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M betalactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. Int J Antimicrob Agents 2010; 35(4): 316–21.
- Pouillot F, Chomton M, Blois H, et al. Efficacy of bacteriophage therapy in experimental sepsis and meningitis caused by a clone O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* strain producing CTX-M-15. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56(7): 3568–75.

- Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 465–83.
- Reid G, Sobel JD. Bacterial adherence in the pathogenesis of urinary tract infection: a review. *Rev Infect Dis* 1987; 9: 470–87.
- Restieri C, Garriss G, Locas M, Dozois CM. Autotransporters-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(5): 1553–62.
- Riley MA. Molecular mechanism of colicin evolution. *Mol Biol Evol* 1993; 10(6): 1380–95.
- Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56: 117–37.
- Rodriguez Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Fakhr MK, Nolan LK. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiol* 2005; 151(6): 2097–110.
- Ruiz J, Simon K, Horcajada JP, et al. Differences in virulence factors among clinical isolates of *Escherichia coli* causing cystitis and pyelonephritis in women and prostatitis in men. *J Clin Microbiol* 2002; 40(12): 4445–9.
- Savarino SJ, Fasano A, Watson J, et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90(7): 3093–7.
- Schembri MA, Dalsgaard D, Klemm P. Capsule shields the function of short bacterial adhesins. *J Bacteriol* 2004; 186(5): 1249–57.
- Schmidt H, Karch H, Beutin L. The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* o-hemolysin family. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 117: 189–96.

Schubert S, Rakin A, Karch H, Carinel E, Heesemann J. Prevalence of the "High-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect Immun* 1998; 66: 480–5.

Servin AL. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 264–92.

Sharma S, Waterfield N, Bowen D, et al. The luminicins: novel bacteriocins from *Photorhabdus luminescens* with similarity to the uropathogenic-specific protein (Usp) from uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Letters* 2002; 214 (2): 241–9.

Termin In: Singleton P, Sainsbury D. Dictionary of microbiology and molecular biology. 3rd ed. Chichester: Wiley, 2001: 895.

Stephan R, Schumacher S, Corti S, Krause G, Danuser J, Beutin L. Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. *J Dairy Sci* 2008; 91: 2561–5.

Suárez C, Gudiol F. Beta-lactam antibiotics. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2009; 27(2): 116–29.

Svanborg EC. Bacterial adherence in urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Scand J Urol Nephrol* 1986; 20(2): 81–8.

Tivendale KA, Logue CM, Kariyawasam S, et al. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infect Immun* 2010; 78(8): 3412–19.

Tóth I, Héault F, Beutin L, Oswald E. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new cdt variant (type IV). *J Clin Microbiol* 2003; 41(9): 4285–91.

Trkov M, Berce I, Dovečar D, Grilc E, Bujko M, Kraigher A. Odkrivanje nekaterih genov, povezanih z virulenco, pri sevih *E. coli*, ki povzročajo črevesne okužbe. *Zdrav Varst* 2008; 47: 81–8.

Trkov M, Rupel T, Žgur Bertok D, Trontelj S, Avguštin G, Ambrožič-Avguštin J. Molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from different food sources. Food Technol Biotechnol 2014; 52(2): 255–62.

Ulett GC, Valle J, Beloin C, Sherlock O, Ghigo JM, Schembri MA. Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. Infect Immun 2007; 75(7): 3233–44.

Uredba (ES) št. 178/2002 Evropskega Parlamenta in Sveta z dne 28. januarja 2002 o določitvi splošnih načel in zahtevah živilske zakonodaje, ustanovitvi Evropske agencije za varnost hrane in postopkih, ki zadevajo varnost hrane.

Off J Eur Union (Online) 2002; L31/1: e463–86.

<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002R0178:20090807:EN:PDF> (10.6.2016)

Velikonja U. Fenotipsko in genotipsko ugotavljanje odpornosti proti beta-laktamom in fluorokinolonom pri bakterijskih sevih iz rodov *Klebsiella* in *Escherichia*, izoliranih v splošni bolnišnici Nova Gorica. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2013. Diplomska naloga.

Vidal M, Kruger E, Durán C, et al. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. J Clin Microbiol 2005; 43(10):5362–5.

Weinberg ED. Iron and infection. Microbiol Rev 1987; 42(1): 45–66.

Weintraub A. Enteropathogenic *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. J Med Microbiol 2007; 56: 4–8.

Whitfield C, Roberts IS. Structure, assembly and regulation of expression pf capsules in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 1999; 31(5): 1307–19.

Wieler LH, Tigges M, Ebel F, et al. The enterohemolysin phenotype of bovine Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* (SLTEC) is encoded by the EHEC-hemolysin gene. Vet Microbiol 1996; 52: 153–64.

Winberg J. P-fimbriae, bacterial adhesion, and pyelonephritis.
Arch Dis Child 1984; 59: 180–4.

Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. J Antimicrob Chemother 2006; 57(1): 154–5.

Yamamoto T, Echeverria P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. Infect Immun 1996; 64(4): 1441–5.

Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili.
Ur. List RS 2000; 10(52): 6949 (13. 6. 2000).

11 PRILOGE

PRILOGA A: Nukleotidna zaporedja pomnožkov PCR.

>Ž4 bla_{CTX-M-1}

TCACTGCGTCAGTTCACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTTAGGAAGTGTGCCGCTG
TATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACTTGCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGAAGACT
GGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTGCGAAATACTTTATCGTGTATGAGCGCTTGC
GATGTGCAGCACCAGTAAAGTGTAGGGCCGTGGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAGCGAACCGA
ATCTGTTAAATCAGCAGTTGAGATCAAAAAACTGACTTGGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAA
AGCACGTCGATGGGACGATGTCACTGGCTGAGCTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAAC
GTGGCGATGAATAAGCTGATTCTCACGTTGGCGGCCGGTAGCGTCACCGCGTTGCCCGACAG
CTGGGAGACGAAACGTTCCGTCACCGTACCGAGGCCGACGTTAACACCGCCATTCCGGCGAT
CCGCGTGATACCACTCACCTCGGGCAATGGCGAAACTCTCGCTAATCTGACGCTGGTAAAGCA
TTGGGTGACAGCCAACGGCGCAGCTGGTACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGAGCGAG
CATTAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGTTGTGGGGATAAAACCGGCAGCGGTGACTATGGCAC
CACCAACGATATCGCGGTACGCCAAAAGATCGTCGCCGCTGATTCTGGTCACTTACTTCAC
CCAGCCTCAACCTAACCGAGAAAGCCGTCGCGATGTATTAGCGTCGGCGCTAAAATCGTCACCAA
CGGTTG

>Ž8 bla_{CTX-M-1}

TCACTGCGTCAGTTCACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTTAGGAAGTGTGCCGCTG
TATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACTTGCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGAAGACT
GGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTGCGAAATACTTTATCGTGTATGAGCGCTTGC
GATGTGCAGCACCAGTAAAGTGTAGGGCCGTGGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAGCGAACCGA
ATCTGTTAAATCAGCAGTTGAGATCAAAAAACTGACTTGGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAA
AGCACGTCGATGGGACGATGTCACTGGCTGAGCTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAAC
GTGGCGATGAATAAGCTGATTCTCACGTTGGCGGCCGGTAGCGTCACCGCGTTGCCCGACAG
CTGGGAGACGAAACGTTCCGTCACCGTACCGAGGCCGACGTTAACACCGCCATTCCGGCGAT
CCGCGTGATACCACTCACCTCGGGCAATGGCGAAACTCTCGCTAATCTGACGCTGGTAAAGCA
TTGGGTGACAGCCAACGGCGCAGCTGGTACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGAGCGAG
CATTAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGTTGTGGGGATAAAACCGGCAGCGGTGACTATGGCAC
CACCAACGATATCGCGGTACGCCAAAAGATCGTCGCCGCTGATTCTGGTCACTTACTTCAC
CCAGCCTCAACCTAACCGAGAAAGCCGTCGCGATGTATTAGCGTCGGCGCTAAAATCGTCACCAA
CGGTTG

>Ž12 bla_{TEM-1}

GCACTTTAAAGTTCTGGCTATGTGGTGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAGCAACTC
GGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAAATGACTTGGTTGAGTACTCACCGTCACAGAAAAGCATCTT
ACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTATAACACTGCTGCC
AACTTACTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGGAGCTAACCGCTTTGCACAACATGGGGAT
CATGTAACTCGCCTGATCGTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACCGACGAGCGTGA
CACCAACGACGCCAGCAATGGCAACACGTTGCCAAACTATTAACTGGCAACTACTTACTCT
AGCTTCCCGCAACAATTAAAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTC
GGCCCTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAATCTGGAGCCGGTAGCGTGGGTCTCGCGGTAT
CATTGCACTGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCA
GGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGG

>Ž13 bla_{TEM-1}

AAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCTGTGCCCTTATTCCCTTTGCGGCATTTGCC
TTCCTGTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTCAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCAC
GAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTAACAGCGTAAGATCCTGAGAGTTTCGCCCGAAGAAC
GTTTCCAATGATGAGCATTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCCTTATTATCCGTGTTGACGCCGG
GCAAGAGCAACTCGGTGCCGCATACACTATTCTCAGAACATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCAC
AGAAAAGCATCTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCAGTACTG
ATAACACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTGC
ACAACATGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGAACCCGGAGCTGAATGAAGCCATACCA
AACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAAACGTTGCGCAAACATTAACTGG
CGAACTACTTACTCTAGCTCCCGAACAAATTAAATAGACTGGATGGAGGCGATAAAGTTGCAGG
ACCACTCTCGCCTCGGCCCTCCGGCTGGTTATTGCTGATAAAATCTGGAGGCCGGTGAGCGT
GGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGCCAGATGG
ACGACGGG

>Ž17 bla_{TEM-1}

AAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCTGTGCCCTTATTCCCTTTGCGGCATTTGCC
TTCCTGTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTCAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCAC
GAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTAACAGCGTAAGATCCTGAGAGTTTCGCCCGAAGAAC
GTTTCCAATGATGAGCATTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCCTTATTATCCGTGTTGACGCCGG
GCAAGAGCAACTCGGTGCCGCATACACTATTCTCAGAACATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCAC
AGAAAAGCATCTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCAGTACTG
ATAACACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTGC
ACAACATGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGAACCCGGAGCTGAATGAAGCCATACCA
AACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAAACGTTGCGCAAACATTAACTGG
CGAACTACTTACTCTAGCTCCCGAACAAATTAAATAGACTGGATGGAGGCGATAAAGTTGCAGG
ACCACTCTCGCCTCGGCCCTCCGGCTGGTTATTGCTGATAAAATCTGGAGGCCGGTGAGCGT
GGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCGTATCGTAGTTATCTAC
ACGACGGG

>Ž23 bla_{TEM-1}

AAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTAACAGCGTAAG
ATCCTTGAGAGTTTCGCCCGAAAGAACGTTTCCAATGATGAGCATTAAAGTTCTGCTATGT
GGCGCGGTATTATCCGTGTTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCCGCATACACTATTCTCAG
AATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTACGGATGGCATGACAGTAAGAGA
ATTATGCAGTGCTGCCATAACCAGTACTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG
AGGACCGAAGGAGCTAACCGTTTGCAACACATGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTG
GGAACCCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCCTGCAGCAATGG
CAACAAACGTTGCCAAACTATTAACTGGCGAAACTACTTACTCTAGCTTCCCGAACAAATTAAATAG
ACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTCTCGCCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTA
TTGCTGATAAAATCTGGAGGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGCCAGATG
GTAAGCCCTCCGTATCGTAGTTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGGA

>Ž24 bla_{TEM-1}

GTATTCAACATTTCGTGTGCCCTTATTCCCTTTTGCGGCATTTCGCTTGTGCTC
ACCCCAGAAACGCTGGTGAAGATAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACAT
CGAACTGGATCTAACAGCGTAAGATCCTTGAGAGTTTCGCCCGAAGAACGTTCCAATGAT
GAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCCTATTATCCGTGTTGACGCCGGCAAGAGCAACT
CGGTGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCT
TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCTGC
CAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTGACAAACATGGGGGA
TCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGA
CACACACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACATTAACTGGGAACACTTACTCT
AGCTTCCCAGCAACAATTAAATAGACTGGATGGAGGGCGATAAAGTTGCAAGGACCACTTCTGCGCTC
GGCCCTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAAATCTGGAGGCCGGTAGCGTGGGTCTAGCGGTAT
CATTGCAACTGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCGTATCGTAGTTACACGACGGGAGTCA
GGCAACTATGGGA

>Ž25 bla_{TEM-1}

AAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCCCTTATTCCCTTTTGCGGCATTTCGCC
TTCCCTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGATAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCAC
GAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTAACAGCGTAAGATCCTTGAGAGTTTCGCCCGAAGAAC
GTTTCCAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCCTTATTATCCGTGTTGACGCCGG
GCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTGAGTACTCACCAGTCAC
AGAAAAGCATCTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTG
ATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTGCA
ACAACATGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCA
AACGACGAGCGTGAACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACATTAACTGG
CGAACTACTTACTCTAGCTCCGGACAACAATTAAATAGACTGGATGGAGGGCGATAAAGTTGCAAGG
ACCACTCTCGCCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAAATCTGGAGGCCGGTAGCGT
GGGTCTCGCGGTATCATTGCACTGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCGTATCGTAGTTATCTAC
ACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGGA

>Ž27 QnrS2

CAGGGTGATATCGAAGGTTGCCATTGATGTCGAGACCTTCGCGATGCAAGTTCCAACAATGC
CAGCTTGCATGGCAAACCTTGTAAACGCCATTGCTACGGTATTGAGTTACGTGAGTGTGATTAA
AAAGGGGCCAACCTTCCGAGCAAACACTTGCCAATCAAGTGAGTAATCGTATGTACTTTGCTCA
GCCTTATTACTGGATGTAACCTGTCTTATGCCAATATGGAGCGGGTCTGTTAGAAAAATGTGAGC
TGTTGAAAATCGCTGGATAGGGACTCACCTCGCGGCCATCACTGAAAGAGTCAGACTTAAGTC
GAGGTGTTTCTGAAGATGTCTGGGACAGTTAGCCTACAGGGTGCTAATTATGTCACGCCGA
ATCG

>Ž30 QnrS1

AGGGTGATATCGAAGGCTGCCACTTTGATGTCGAGACCTTCGCGATGCAAGTTCCAACAATGC
CAACTTGCATGGCAAACCTTCAGTAATGCCATTGCTACGGTATAGAGTTCCGTGCGTGTGATTAA
AAAGGTGCCAACCTTCCGAAACAAACACTTGCCCATCAAGTGAGTAATCGTATGTACTTTGCTCAG
CATTATTCTGGATGTAATCTTCTTATGCCAATATGGAGAGGGTTGTTAGAAAAATGTGAGTT
GTTTGAAAATCGCTGGATAGGAACGAACCTAGCGGGTGCTACTGAAAGAGTCAGACTTAAGTC
GAGGTGTTTCCGAAGATGTCTGGGGCAATTAGCCTACAGGGTGCTAATTATGCCACGCCGA
ACTCGACGGTTA

>Ž38 bla_{CTX-M-9}

CGGATGATGTTCGCGCGCGCGTGCATTCCGCTGCTGGCAGCGCGCCGCTTATGCGCAG
ACGAGTGCCTGCAGCAAAAGCTGGCGCGCTGGAGAAAAGCAGCGGAGGGCGCTGGCGTCG
CGCTCATCGATAACCGCAGATAATACGAGGTGCTTATCGCGGTGATGAACGCTTCCAATGTGCA
GTACCAAGTAAAGTTATGGCGGCCGGCGGTGCTTAAGCAGAGTGAACGCAAAGCAGCTGCTT
AATCAGCCTGTCGAGATCAAGCCTGCCGATCTGGTTAACTACAATCCGATTGCCGAAAAAACACGTC
AACGGCACAAATGACGCTGGCAGAGCTGAGCGCGCCGCGTTGCACTACAGCGACAATACGCCAT
GAACAAATTGATTGCCAGCTCGTGGCCGGAGGCGTGACGGCTTTCGCCCAGCGATCGCGA
TGAGACGTTCTGCTGGATCGCACTGAACCTACGCTGAATACCGCATTCCCGCGACCCGAGAGA
CACCACCGCCGGCGATGGCACAGACGTTGCGTCAGCTACGCTGGGTATGCGCTGGCGA
AACCCAGCGGGCGCAGTTGGTGACGTGGCTAAAGGCAATACGACCGGGCGAGCCAGCATCGGG
CCGGCTTACCGACGTCGTGGACTGCAGGTGATAAGACCGGGAGCGCGACTACGGCACCAAT
GATATTGCGGTGATCTGGCGCAGGGTCGTGCGCCGCTGGTTCTGGTGACCTATTTACCCAGCCGC
AACAGAACGCAAGAGAGCCCGCGATGTGCTGGTTC

>Ž39 bla_{CTX-M-9}

TGTTCGCGCGGGCGCGTGCATTCCGCTGCTGGCAGCGCGCCGCTTATGCCAGAACGAGT
GCGGTGCAGCAAAAGCTGGCGCGCTGGAGAAAAGCAGCGGAGGGCGCTGGCGTCGCGCTCAT
CGATACCGCAGATAATACGAGGTGCTTATCGCGGTGATGAACGCTTCCAATGTGCACTACAG
TAAAGTTATGGCGCCGCGCGTGTAAAGCAGAGTGAACGCAAAGCAGCTGCTTAATCAGC
CTGTCGAGATCAAGCCTGCCGATCTGGTTAACTACAATCCGATTGCCAAAAACACGTCAACGGCA
CAATGACGCTGGCAGAGCTGAGCGCGCCGCGTTGCACTACAGCGACAATACGCCATGAACAAA
TTGATTGCCAGCTCGTGGCCGGAGGCGTGACGGCTTTGCCCGCGATGGCGATGAGACG
TTCGTCTGGATCGCACTGAACCTACGCTGAATACGCCATTCCCGCGACCCGAGAGACACCACC
ACGCCGGCGATGGCACAGACGTTGCGTCAGCTACGCTGGGTATGCGCTGGCGAAACCCA
GCCGGCGCAGTTGGTGACGTGGCTAAAGGCAATACGACCGGGCAGCCAGCATCGGGCGCT
TACCGACGTCGTGGACTGCAGGTGATAAGACCGGGAGCGCGACTACGGCACCAATGATATT
GCCGTGATCTGGCGCAGGGTCGTGCGCCGCTGGTTCTGGTGACCTATTTACCCAGCCGAACAG
AACGCAAGAGAGCCCGCGATGTGCTGGCT

>Ž68 QnrS1

GAACAGGGTGATATCGAAGGCTGCCACTTGATGTCGAGATCTCGTATGCAAGTTCCAACAA
TGCCAACCTGCGATGGCAAACCTCAGTAATGCCATTGCTACGGTATAGAGTTCCGTGCGTGTGAT
TTAAAAGGTGCCAACTTTCCGAACAAACTTGCCTCAAGTGAGTAATCGTATGTACTTTGCT
CAGCATTATTCGATGTAATCTTCCATGCCAATATGGAGAGGGTTGTTAGAAAAATGTGA
GTTGTTGAAAATCGCTGGATAGGAACCAACTAGCGGGTGATCACTGAAAGAGTCAGACTAA
GTCGAGGTGTTTCCGAAGATGTCTGGGGCAATTAGCCTACAGGGTGCCAATTATGCCACG
CCGAACTCACCGGGTTAGAA

>Ž102 *bla*_{CTX-M-1}

CATGTTAAAAAAATCACTGCGTCAGTTCACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTTAGGA
AGTGTGCCGCTGTATGCAGAAACGGCGGACGTACAGCAAAACTTGCCGAATTAGACGGCAGTC
GGGAGGAAGACTGGGTGGCATTGATTAAACACAGCAGATAATTGCAAATACTTATCGTCTGA
TGAGCGCTTGCGATGTGAGCACCAGTAAGTGATGGCGTGGCGCGGTGCTGAAGAAAAGTG
AAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAATCTGACTTGGTTAACTATAATC
CGATTGCGAAAGCACGTCGATGGACGATGTCAGTGGCTGAGCTAGCGCGCCGCGCTACAG
TACAGCGATAACCGTGGCGATGAATAAGCTGATTCTCACGTTGGCGGCCGCTAGCGTACCGCG
TCGCCCCACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTCTGACCGTACCGAGGCCGACGTTAACACCGCC
ATTCCGGGCATCCGCGTGTACCACTCACCTCGGCAATGGCGAAACTCTGCGTAATCTGACG
CTGGGTAAGCATTGGGTGACAGCCAACGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCAC
CGGTGCAGCGAGCATTAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGTTGTGGGGGATAAAACCGGCAGCGG
TGACTATGGCACCAACGATATCGCGGTGATCTGCCAAAAGATCGCGCCCTGATTCTGGT
CACTTACTTCACCCAGCCTAACCTAACCGAGAAAGCCGTCGGATGTATTAGCGTCGGCGCTAA
AATCGTCACCAACGGTTG

>Ž123 *QnrS1*

GAACAGGGTGATATCGAAGGCTGCCACTTTGATGTCGAGATCTCGTATGCAAGTTCCAACAA
TGCCAACCTTGCATGGCAAACCTTCAGTAATGCCAATTGCTACGGTATAGAGTTCCGTGCGTGTGAT
TTAAAAGGTGCCAACTTTCCCAGAACAAACTTGCCTCAAGTGAGTAATCGTATGTACTTTGCT
CAGCATTATTCTGGATGTAATCTTCCTATGCCAATATGGAGAGGGTTGTTAGAAAAATGTGA
GTTGTTGAAAATCGCTGGATAGGAACGAAACCTAGCGGGTGCATCACTGAAAGAGTCAGACTAA
GTCGAGGTGTTTCCGAAGATGTCTGGGGCAATTAGCC

>Ž131 *bla*_{TEM-1}

AAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAG
ATCCTTGAGAGTTTCGCCCGAAAGAACGTTTCCAATGATGAGCAGTAAAGTTCTGCTATGT
GGTGCAGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGATACACTATTCTCAG
AATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTACGGATGGCATGACAGTAAGAGA
ATTATGCAGTGCCTAACCATGAGTGATAACACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG
AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTGCACAACATGGGGATCATGTAACTCGCCTGATCGTTG
GGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGAGCAATGG
CAACAACTGCGCAAACATTAAACTGGCGAAACTACTACTTAGCTTCCCGCAACAATTAAATAG
ACTGGATGGAGGCAGATAAAGTTGCAGGACCACTCTGCGCTGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTA
TTGCTGATAAACTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGTATCATTGCAAGCAGTGGGGCCAGATG
GTAAGCCCTCCGTATCGTAGTTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATA
GACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAAGCATTGGTAACTG

>Ž131 *QnrS*

TGCAAGTTCATTAACAGGGTGGTAGCCGCCATGTCGCTGGTGCAGGCCGTGCCCGTCAT
CGCCAGCGACAGGCCGCAGGGATGACGGACGCCAGACCGTCGTCCAGGCTCCAGTCGACGTTCT
GATCTCCGCCAACATCATTACCGAGTGCTTCTGGTACCGGTAGCCCGCGCATGAAGAACAA
GGATCTCCCCAAGCTTGCCTGCTCCTCCAGCGCTTCGTAGTTACATTCGCCAACAGGGCAGGCCA
GGCGTTATGCATGATCTCCCGCCTACGCCGTTGTGCAGGAAGGTATCGTCGGCAGGTACTCCCC
GAAATCGGCCATCCAGCCCGCAGCCCAGTCATCAGGTTCTTTGATGACATCTTGACCG
TCGTAGGCTGCCGGTTGGTCAGATCGATTACGCCCGTAGAACACTCGCCGAACCT

>Ž183 *bla_{SHV-12}*

GTGGTTATGCGTTATTCGCCTGTTATTATCTCCCTGTTAGCCaCCCTGCCGCTGGCGGTACACGC
CAGCCCGCAGCCGCTTGAGCAAATTAAACAAAGCGAAAGCCAGCTGCTCGGGCCGCGTAGGCATGA
TAGAAATGGATCTGCCAGCGGCCACGCTGACCGCCTGGCGCCGATGAACGCTTCCATGA
TGAGCACCTTAAAGTAGTGCTCTCGCGCGAGTGCTGGCGGGTGGATGCCGGTGACGAACAGC
TGGAGCGAAAGATCCACTATGCCAGCAGGATCTGGTGGACTACTGCCGGTCAGCGAAAAACAC
CTTGCAGGGCATGACGGTCGGCGAACCTCGGCCGCCATTACCATGAGCGATAACAGCGCC
GCCAATCTGCTGCTGCCACCGCTGGCGGCCGAGGATTGACTGCCTTTGCCAGATGGC
GACAACGTCACCCGCCCTGACCGCTGGAAACGGAACCTGAATGAGGCCTTCCGGCAGCAGCG
CGACACCACCTACCCGGCCAGCATGGCGCACCGCTCGCAAGCTGCTGACCAAGCCAGCGTCTGAG
CGCCCGTTGCAACGGCAGCTGCTGAGTGATGGTGGACGATCGGCTGCCGGACCGTTGATCCG
CTCCGTGCTGCCCTGCTTGCCCGATAAACAAAGCAGAGCGCATTGTGGTGATTATCTGCCGGATA
CGCCGGCAGCATGCCAGCGAAATCAGCAAATGCCGGATGGCGCGCTGA

>Ž202 *bla_{CTX-M-1}*

TCACTGCGTCAGTTCACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTTAGGAAGTGTGCCGCTG
TATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAACTGCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGAAGACT
GGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTGCGAAATACTTATCGTGTGATGAGCGCTTGC
GATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCGTGGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAGCGAACCGA
ATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAATCTGACTTGGTTAACTATAATCCGATTGCCGAAA
AGCACGTCGATGGGACGATGTCAGCTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAAC
GTGGCGATGAATAAGCTGATTCTCACGTTGGCGGCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCGACAG
CTGGGAGACGAAACGTTCCGTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAACACCCGCCATTCCGGCGAT
CCGCGTGAACCACTCACCTCGGCAATGGCGAAACTCTGCGTAATCTGACGCTGGTAAAGCA
TTGGGTGACAGCCAACGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGAGCGAG
CATTCAAGGCTGGACTGCCCTCCCTGGGTTGTGGGGATAAAACCGGCAGCGGTGACTATGGCAC
CACCAACGATATCGCGGTGATCTGCCAAAAGATCGTCGCCGCTGATTCTGGTCACTTACTTCAC
CCAGCCTCAACCTAACCGAGAAAGCCGCGATGTATTAGCGTCGGCGCTAAAATCGTCACCAA
CGGTTTG

>Ž208 *bla*_{CTX-M-1}

TCACTGCGTCAGTTCACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTTAGGAAGTGTGCCGCTG
TATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAACTTGCAGATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGAAGACT
GGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTGCAAATACTTATCGCTGATGAGCGCTTG
GATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCGTGGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTAAAGCGAACCGA
ATCTGTTAAATCAGCAGTTGAGATCAAAACTGACTTGGTTAACTATAATCCGATTGCCGAAA
AGCACGTCGATGGACGATGTCAGTGGCTGAGCTAGCGCGCCGCGCTACAGTACAGCGATAAC
GTGGCGATGAATAAGCTGATTCTCACGTTGGCGGCCGGTAGCGTCACCGCGTTGCCGACAG
CTGGGAGACGAAACGTTCCGTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGCGAT
CCGCGTGAACCACTCACCTCGGGCAATGGCGAAACTCTCGCTAATCTGACGCTGGTAAAGCA
TTGGGTGACAGCCAACGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGAGCGAG
CATTAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGTTGTGGGGATAAAACCGGCAGCGGTGACTATGGCAC
CACCAACGATATCGCGGTGATCTGCCAAAGATCGTGCACCGCTGATTCTGGTCACTTACTTCAC
CCAGCCTCAACCTAACCGCAGAAAGCCGTCGCGATGTATTAGCGTCGGCGCTAAAATCGTACCAA
CGGTTG

>Ž209 *bla*_{CTX-M-1}

CGCACGACCCTGCGGCCAGATCACCGCAATATCATTGGTGGTGCCTAGTCGCCGCTGCCGGTCTT
ATCACCTGAGTCACGACGTCGGTAAGCCGCCGAATGCTGGCTGCCCGGTGTTATTGCCCTT
GAGCCACGTACCAACTCGCCTGGCTGGTTTCGCCCGAGCGCATGACCCAGCGTAAGCTGACGCAA
CGTCTGTGCCATGCCCGCGTGGTGGTGCTCTCGGGTCGCCGGGAATGGCGGTATTAGCGT
AGGTTCAGTGCAGACGAAACGTCTCATGCCGATCGCGGGAAAAGCCGTACGCCCTCC
CGGGCCACCGAGCTGGCAATCAATTGTTATGGCGGTATTGTCGCTGACTGCAACCGGCCGC
GCTCAGCTCTGCCAGCGTATTGTGCCGTGACGTGTTTCGCAATCGGATTGTAGTTAACAGA
TCGGCAGGCTTGATCTGACAGGCTGATTAAGCAGCTGCTTGCCTTAAGCACCAG
CCGGGCCGCCA

>Ž210 *bla*C_{TX-M-1}

TCACTGCGTCAGTTCACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTTAGGAAGTGTGCCGCTG
TATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAACTTGCAGATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGAAGACT
GGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTGCAAATACTTATCGCTGATGAGCGCTTG
GATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCGTGGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTAAAGCGAACCGA
ATCTGTTAAATCAGCAGTTGAGATCAAAACTGACTTGGTTAACTATAATCCGATTGCCGAAA
AGCACGTCGATGGACGATGTCAGTGGCTGAGCTAGCGCGCCGCGCTACAGTACAGCGATAAC
GTGGCGATGAATAAGCTGATTCTCACGTTGGCGGCCGGTAGCGTCACCGCGTTGCCGACAG
CTGGGAGACGAAACGTTCCGTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGCGAT
CCGCGTGAACCACTCACCTCGGGCAATGGCGAAACTCTCGCTAATCTGACGCTGGTAAAGCA
TTGGGTGACAGCCAACGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGAGCGAG
CATTAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGTTGTGGGGATAAAACCGGCAGCGGTGACTATGGCAC
CACCAACGATATCGCGGTGATCTGCCAAAGATCGTGCACCGCTGATTCTGGTCACTTACTTCAC
CCAGCCTCAACCTAACCGCAGAAAGCCGTCGCGATGTATTAGCGTCGGCGCTAAAATCGTACCAA
CGGTTG

>Ž211 *bla*_{CTX-M-1}

AAATCACTGCGTCAGTTCACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTTAGGAAGTGTGCCG
CTGTATGCGAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTGCCAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGAAG
ACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTGCCAATACTTATCGTGTGATGAGCGCTT
TGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGTGAGCTGGCGTGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAGCGAAC
CGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAACCTGACTTGGTTAACTATAATCCGATTGCCG
AAAAGCACGTCGATGGGACGATGTCAGCTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGAT
AACGTGGCGATGAATAAGCTGATTCTCACGTTGGCGGCCGCTAGCGTCACCGCGTTGCCGA
CAGCTGGGAGACGAAACCTCCGTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGC
GATCCCGGTGATACCACTCACCTCGGGCAATGGCGAAACTCTCGTAATCTGACGCTGGTAAA
GCATTGGGTGACAGCCAACGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGC
GAGCATTAGCTGGACTGCCTGCTTCTGGTTGTGGGGATAAAACCGGCAGCGGTGACTATGG
CACCAACGATATCGCGGTGATCTGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTGATTCTGGTCACTTACTT
CACCCAGCCTAACCTAACCGCAGAAAGCCGTCGCGATGTATTAGCGTCGGCGCTAAAATCGTCAC
CAACGGTTG

>Ž212 *bla*_{CTX-M-1}

TCACTGCGTCAGTTCACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTTAGGAAGTGTGCCGCTG
TATGCCAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTGCCAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGAAGACT
GGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTGCCAATACTTATCGTGTGATGAGCGCTTGC
GATGTGCAGCACCAGTAAAGTGTGAGCTGGCGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAGCGAACCGA
ATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAACCTGACTTGGTTAACTATAATCCGATTGCCGAAA
AGCACGTCGATGGGACGATGTCAGCTGGCTGAGCTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAAC
GTGGCGATGAATAAGCTGATTCTCACGTTGGCGGCCGCTAGCGTCACCGCGTTGCCGACAG
CTGGGAGACGAAACGTTCCGTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGCGAT
CCGCGTGATACCACTCACCTCGGGCAATGGCGAAACTCTCGTAATCTGACGCTGGTAAAGCA
TTGGGTGACAGCCAACGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCAG
CATTAGCTGGACTGCCTGCTTCTGGTTGTGGGGATAAAACCGGCAGCGGTGACTATGGCAC
CACCAACGATATCGCGGTGATCTGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTGATTCTGGTCACTTACTTCAC
CCAGCCTAACCTAACCGCAGAAAGCCGTCGCGATGTATTAGCGTCGGCGCTAAAATCGTCACCAA
CGGTTG

>Ž213 *bla*_{CTX-M-1}

TCACTGCGCCAGTTCACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTTAGGAAGTGTGCCGCTG
TATGCCAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTGCCAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACT
GGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTGCCAATACTTATCGTGTGATGAGCGCTTGC
GATGTGCAGCACCAGTAAAGTGTGAGCTGGCGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAGCGAACCGA
ATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAACCTGACCTTGTAACTATAATCCGATTGCCGAAA
AGCACGTCATGGGACGATGTCAGCTGGCTGAGCTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAAC
GTGGCGATGAATAAGCTGATTGTCACGTTGGCGGCCGCTAGCGTCACCGCGTTGCCGACAG
CTGGGAGACGAAACGTTCCGTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGCGAT
CCGCGTGATACCACTCACCTCGGGCAATGGCGAAACTCTCGGAATCTGACGCTGGTAAAGCA
TTGGGCGACAGCCAACGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCAG
CATTAGCTGGACTGCCTGCTTCTGGTTGTGGGGATAAAACCGGCAGCGGTGGCTATGGCAC
CACCAACGATATCGCGGTGATCTGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTGATTCTGGTCACTTACTTCAC
CCAGCCTAACCTAACCGCAGAAAGCCGTCGCGATGTATTAGCGTCGGCGCTAAAATCGTCACCGA
CGGTTG

>Ž213 QnrS1

GGTGATATCGAAGGCTGCCACTTGATGTCGAGATCTCGTGTGCAAGTTCCAACAAATGCCAA
CTTGCATGGCAAACCTCAGTAATGCCATTGCTACGGTATAGAGTCCGTGCGTGTGATTAAAA
GGTCCAACCTTCCCAGAACAAACTTGCCCCATCAAGTGAGTAATCGTATGACTTTGCTCAGCAT
TTATTCGATGTAATCTTCCATTGCAATATGGAGAGGGTTGTTAGAAAATGTGAGTTGTT
TGAAAATCGCTGGATAGGAACCTAGCGGGTGCATCACTGAAAGAGTCAGACTTAAGTCGAG
GTGTTTTCCGAAGATGTCTGGGGCAATTAGcCTACAgGGTgCCAATTATGCCACGCCGAACTC
ACGGGTTTAGAAA

>Ž214 bla_{CTX-M-1}

CTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAACTGCCAATTA
GAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATAACACAGCAGATAATTGCAAATACT
TTATCGTGTGAGCGCTTGCGATGTGCAGCACAGTAAAGTGTGAGCCGCGCGTGTGCT
GAAGAAAAGTGAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAATCTGACCTTG
TTAACTATAATCCGATTGCGGAAAGCACGTCATGGGACGATGTCAGTGGCTGAGCTTAGCGCG
CCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGATTGTCACGTTGGCCGGCCGGCTA
GCGTCACCGCGTTCGCCCCACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTCTGACCCTGACCGTACCGAGCCGACGT
TAAACACCGCCATTCCGGCGATCCGCGTGTACCACTTCACCTCGGCAATGGCGAAACTCTGC
GGAATCTGACGCTGGTAAAGCATTGGCGACGCCAACGGCGCAGCTGGTACATGGATGAAA
GGCAATACCACCGGTGCAGCGAGCATTGAGCTGGACTGCCTGCTTGGTTGTGGGGATAAA
ACCGGCAGCGGTGGCTATGGCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCAAAAGATCGTGC
GCTGATTCTGGTCACTTACTCACCCAGCCTAACCTAACGGCAGAAAGCCGTCGCGATGTATTAGC
GTCGGCGGC

>Ž215 bla_{CTX-M-1}

TCCATGGTAAAAAAACTCGCTCAGTCAGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTGTTA
GGAAGTGTGCCGCTGTATCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAACTGCCAATTAGAGCGGCA
GTCGGGAGGAAGACTGGGTGTGGCATTGATAACACAGCAGATAATTGCAAATACTTATCGTGC
TGATGAGCGCTTGCATGTGCAGCACAGTAAAGTGTGAGCCGCGCGTGTGAAAGAAAA
GTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAATCTGACTTGGTTAACTATA
ATCCGATTGCGAAAAGCACGTCGATGGGACGATGTCAGTGGCTGAGCTAGCGCGCCGCGCTAC
AGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGATTCTCACGTTGGCGGCCGGTAGCGTCACCG
CGTTCCGGCGACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTCTGACCGTACCGAGCCGACGTTAACACCG
CCATTCCGGCGATCCGCGTGTACCACTTCACCTCGGCAATGGCGAAACTCTGCGTAATCTGA
CGCTGGTAAAGCATTGGGTGACGCCAACGGCGCAGCTGGTACATGGATGAAAGGCAATACC
ACCGGTGCAGCGAGCATTGAGCTGGACTGCCTGCTTGGTTGTGGGGATAAAACCGGCAGC
GGTACTATGGCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCAAAAGATCGTGC
GTCACTTACTTCACCCAGCCTAACCTAACGGCAGAAAGCCGTCGCGATGTATTAGCGTCGGCG
AAATCGTCCCCACGGTTGTA

>Š22 bla_{SHV-12}

GGTATGCGTTATTCGCCTGTATTATCTCCCTGTTAGCCACCCCTGCCGCTGGCGGTACACGCCA
GCCCGCAGCCGCTTGAGCAAATTAAACAAAGCGAAAGCCAGCTGTCGGGCCGCTAGGCATGATA
GAAATGGATCTGCCAGCGGCCGACGCTGACCGCCTGGCGCCGATGAACGCTTCCCATGATG
AGCACCTTAAAGTAGTGCCTCTGCCAGCGCAGTGTGGCTGGCGGGTGGATGCCGGTACGAACAGCTG
GAGCGAAAGATCCACTATGCCAGCAGGATCTGGTGGACTACTCGCCGGTCAGCGAAAAAACACCT
TGCCGACGGCATGACGGTCGGCGAACTCTGCCGCCGATTACCATGAGCGATAACAGCGCCGC
CAATCTGCTGCTGCCACCCTGCCGGCCCCCGCAGGATTGACTGCCTTTGCGCCAGATCGCGA
CAACGTCACCCGCCCTGACCGCTGGAAACGGAACTGAATGAGGCCTCCCGCGACGCCCG
ACACCACTACCCCGCCAGCATGGCCCGACCCCTGCCAAGCTGCTGACCAGCCAGCGCTGAGCG
CCC GTTCGCAACGGCAGCTGCTGCAGTGGATGGTGGACGATCGGGTCGCCGGACCGTTGATCCGCT
CCGTGCTGCCGGGGCTGGTTATGCCGATAAGACGGAGCTAGCAAGCGGGGTGCGCGCGGG
ATTGTGCCCTGCTGGCCGAATAACAAAGCAGAGCGCATTGTGGTATTATCTGCCGGATACG
CGCGCAGCATGCCGAGCGAAATCAGCAAATGCCGGATCGCGCGCTGATCGACG

PRILOGA B: Nukleotidna zaporedja 5 genov za odpornost proti β -laktamazam in kinolonom iz slovenskih izolatov bakterije *E. coli* smo poslali v gensko banko (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), v kateri so označena s številkami vnosa (angl. *accession number*) KU664678-KU664682.

Ime seva	Datum vzorčenja	Matriks	Gen	Št. vnosa v genski banki
Ž 102	20. 5. 2011	Mesni pripravek	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	KU664678
Ž 38	20. 1. 2011	Sušene mesnine	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	KU664679
Ž 68	11. 3. 2011	Kravja skuta	<i>qnrS1</i>	KU664680
Ž 183	8. 7. 2011	Mesni pripravek	<i>bla</i> _{SHV-12}	KU664681
Ž 17	9. 11. 2010	Svinjsko meso	<i>bla</i> _{TEM-1}	KU664682