

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Damjana BARBIČ

**VIRULENTNI DEJAVNIKI SEVOV BAKTERIJE
Escherichia coli IZOLIRANIH IZ BLATA
PROSTOŽIVEČIH MEDVEDOV IN MEDVEDOV V
UJETNIŠTVU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Damjana BARBIČ

**VIRULENTNI DEJAVNIKI SEVOV BAKTERIJE *Escherichia coli*
IZOLIRANIH IZ BLATA PROSTOŽIVEČIH MEDVEDOV IN
MEDVEDOV V UJETNIŠTVU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**VIRULENT FACTORS OF *Escherichia coli* STRAINS FROM FECES
OF WILD BEARS AND BEARS IN CAPTIVITY**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

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

Za mentorico diplomskega dela je bila imenovana prof. dr. Darja Žgur-Bertok, za somentorico prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec ter za recenzentko prof. dr. Manica Müller-Premru.

Mentorica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Somentorica: prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec

Recenzentka: prof. dr. Manica Müller-Premru

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Članica: prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Manica Müller-Premru
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Damjana Barbič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

| | |
|----|---|
| ŠD | Dn |
| DK | UDK 579.25.065 : 577.2.083 : 599.742.21 (043) = 163.6 |
| KG | <i>Escherichia coli</i> /komenzalni sevi/filogenetske skupine/filogenetske podskupine/virulentni dejavniki/občutljivost za protimikrobne učinkovine/antibiotiki/PCR/rjavi medved/črevesna mikrobiota rjavega medveda |
| AV | BARBIČ, Damjana |
| SA | ŽGUR-BERTOK, Darja (mentorica)/STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (somentorica)/MÜLLER-PREMRU, Manica (recenzentka) |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjava 101 |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije |
| LI | 2012 |
| IN | VIRULENTNI DEJAVNIKI SEVOV BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i> IZOLIRANIH IZ BLATA PROSTOŽIVEČIH MEDVEDOV IN MEDVEDOV V UJETNIŠTVU |
| TD | Diplomsko delo (univerzitetni študij) |
| OP | XI, 63 str., 16 pregl., 1 sl., 4 pril., 61 vir. |
| IJ | sl |
| JJ | sl/en |
| AI | Bakterija <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) je del normalne črevesne mikrobiote večine živali s stalno telesno temperaturo. Običajno je v komenzalnem sožitju, a v določenih primerih lahko povzroči okužbo. V okviru te diplomske naloge smo preučevali uvrstitev sevov v filogenetske skupine, razlike v pojavnosti virulentnih dejavnikov (VD) in v občutljivosti bakterij za antibiotike (streptomycin, ampicilin, tetraciklin in nalidiksična kislina) pri črevesnih sevih <i>E. coli</i> zdravih rjavih medvedov (<i>Ursus arctos</i>). Izolirali smo 86 črevesnih sevov, od tega 41 sevov medvedov iz Živalskega vrta Ljubljana in 45 sevov prostoživečih medvedov. V filogenetsko skupino D smo uvrstili 33 (38 %) sevov, 30 (35 %) v skupino A, 20 (23 %) v skupino B1 in 3 (3 %) v skupino B2. V filogenetski skupini A je bilo več sevov iz živalskega vrta, v filogenetski skupini B1 pa več sevov iz narave. Pri obeh populacijah medvedov, prostoživečimi medvedovi in medvedovi v ujetništvu, smo ugotovili podobno prevalenco VD. Zapis <i>fimH</i> je imelo 62 (72 %) sevov, <i>kpsMT</i> je imelo 37 (43 %), <i>fyuA</i> je imelo 18 (21 %), <i>ibeA</i> je imelo 14 (16 %), <i>usp</i> je imelo 6 (7 %) in <i>iucD</i> je imelo 2 (2 %) sevov. Noben sev ni imel zapisa <i>papGII</i> , <i>papGIII</i> , <i>sfaDE</i> , <i>afa/draBC</i> , <i>cnf1</i> , <i>hlyA</i> , <i>tcpC</i> , <i>ireA</i> , <i>iha</i> in <i>hbp</i> . Samo dva seva medvedov iz narave nista bila občutljiva za streptomycin, ampicilin in tetraciklin, ostali sevi so bili občutljivi za testirane antibiotike. Nalidiksična kislina je zavrla rast vseh sevov. Iz rezultatov je razvidno, da ni večjih razlik med sevi <i>E. coli</i> , izoliranimi iz prebavnega trakta medvedov iz obeh preiskovanih populacij. Rezultati kažejo tudi, da ima črevesna mikrobiota rjavega medveda nizek virulentni potencial. |

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

| | |
|----|--|
| ND | Dn |
| DC | UDC 579.25.065 : 577.2.083 : 599.742.21 (043) = 163.6 |
| CX | <i>Escherichia coli</i> /commensal strains/phylogenetic group/phylogenetic subgroup/virulence factors/susceptibility to antimicrobials/antibiotics/PCR/brown bear/intestinal microbiota of brown bear |
| AU | BARBIČ, Damjana |
| AA | ŽGUR-BERTOK, Darja (supervisor)/STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (co-advisor)/MÜLLER-PREMRU, Manica (reviewer) |
| PP | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjava 101 |
| PB | University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology |
| PY | 2012 |
| TI | VIRULENT FACTORS OF <i>Escherichia coli</i> STRAINS FROM FECES OF WILD BEARS AND BEARS IN CAPTIVITY |
| DT | Graduation Thesis (University studies) |
| NO | XI, 63 p., 16 tab., 1 fig., 4 ann., 61 ref. |
| LA | sl |
| AL | sl/en |
| AB | <p>The bacterium <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) is part of the normal intestinal microbiota of animals with constant body temperature. Even though <i>E. coli</i> is known as a commensal bacterium in some cases it can cause infection. The aim of the study was to characterize <i>E. coli</i> commensal isolates of the brown bear intestinal microbiota. In total 86 commensal <i>E. coli</i> isolates from healthy brown bears (<i>Ursus arctos</i>) from Zoological garden Ljubljana (41 isolates) and wild brown bears (45 isolates) were characterized for their phylogenetic origin, genes encoding virulence factors (VF) and resistance to antibiotics (streptomycin, ampicillin, tetracycline and nalidixic acid). Our results showed that 33 (38 %) of all isolates belonged to phylogenetic group D, 30 (35 %) to the group A, 20 (23 %) to the group B1 and 3 (3 %) to the group B2. In phylogenetic group A there are more isolates from captive bears, in phylogenetic group B1 there are more isolates from wild bears. Both populations of bears, the wild bears and the bears in captivity, had similar prevalence of VF genes. VF gene <i>fimH</i> was detected in 62 (72 %) isolates, <i>kpsMT</i> in 37 (43 %), <i>fyuA</i> in 18 (21 %), <i>ibeA</i> in 14 (16 %), <i>usp</i> in 6 (7 %) and <i>iucD</i> in 2 (2 %) of the tested isolates. All isolates were negative for <i>papGII</i>, <i>papGIII</i>, <i>sfaDE</i>, <i>afa/draBC</i>, <i>cnfI</i>, <i>hlyA</i>, <i>tcpC</i>, <i>ireA</i>, <i>iha</i> and <i>hbp</i>. Only two isolates from wild brown bear were resistant to streptomycin, ampicillin and tetracycline, the other isolates were not resistant to the tested antibiotics. Nalidixic acid inhibited growth of all isolates. The results of our study showed that there is no major difference among <i>E. coli</i> isolates from both populations of bears. Further, our results showed that the brown bear intestinal microbiota has a low virulence potential.</p> |

KAZALO VSEBINE

| | |
|---|-------------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI) | III |
| KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD) | IV |
| KAZALO VSEBINE | V |
| KAZALO PREGLEDNIC | VIII |
| KAZALO SLIK | VIII |
| KAZALO PRILOG | IX |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI | X |
| | |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 NAMEN DELA | 2 |
| 2 PREGLED OBJAV | 3 |
| 2.1 <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 3 |
| 2.1.1 Komenzalni sevi <i>E. coli</i> | 4 |
| 2.1.2 Črevesni patogeni sevi (IPEC) | 5 |
| 2.1.3 Zunajčrevesni patogeni sevi (ExPEC) | 6 |
| 2.2 VIRULENTNI DEJAVNIKI | 8 |
| 2.2.1 Adhezini | 9 |
| 2.2.2 Sistemi za privzem železa | 11 |
| 2.2.3 Bakterijska kapsula | 11 |
| 2.2.4 Toksini | 12 |
| 2.3 ANTIBIOTIKI | 13 |
| 2.3.1 Zaviralci sinteze celične stene | 13 |
| 2.3.2 Zaviralci sinteze beljakovin | 14 |
| 2.3.3 Zaviralci sinteze DNA | 14 |
| 2.3.4 Zaviralci delovanja celične membrane | 14 |
| 2.3.5 Odpornost proti antibiotikom | 15 |
| 2.4 FILOGENETSKE SKUPINE | 15 |
| 2.5 RJAVI MEDVED (<i>Ursus arctos</i>) | 17 |
| 2.5.1 Prebavni trakt medveda | 17 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 3 | MATERIALI IN METODE | 18 |
| 3.1 | MATERIALI | 18 |
| 3.1.1 | Bakterijski sevi | 18 |
| 3.1.1.1 | Medvedji sevi - zbirka DB | 18 |
| 3.1.1.2 | Človeški sevi - zbirka BJ | 19 |
| 3.1.1.3 | Standardni pozitivni - kontrolni bakterijski sevi | 20 |
| 3.1.2 | Gojišča | 21 |
| 3.1.2.1 | Luria Bertanijevo gojišče (LB) | 21 |
| 3.1.2.2 | Agar MacConkey | 22 |
| 3.1.2.3 | Agar »Eosin methylene blue« (EMB) | 22 |
| 3.1.2.4 | UriSelect™ 4 | 22 |
| 3.1.3 | Kemikalije | 23 |
| 3.1.4 | Encimi | 24 |
| 3.1.5 | Začetni oligonukleotidi | 24 |
| 3.1.6 | Oprema | 26 |
| 3.2 | METODE | 27 |
| 3.2.1 | Izolacija in gojenje sevov | 27 |
| 3.2.2 | Shranjevanje bakterijske kulture | 27 |
| 3.2.3 | Priprava lizatov | 27 |
| 3.2.4 | Verižna reakcija s polimerazo (PCR) | 28 |
| 3.2.4.1 | ERIC-PCR | 28 |
| 3.2.4.2 | Določanje filogenetske (pod)skupine | 29 |
| 3.2.4.3 | Določanje virulentnih dejavnikov | 30 |
| 3.2.5 | Elektroforeza DNA v agaroznem gelu | 33 |
| 3.2.6 | Občutljivost za antibiotike | 33 |
| 3.2.7 | Statistične metode | 34 |
| 4 | REZULTATI | 35 |
| 4.1 | ERIC-PCR | 35 |
| 4.2 | FILOGENETSKE (POD)SKUPINE | 35 |
| 4.3 | VIRULENTNI DEJAVNIKI | 37 |
| 4.3.1 | Prevalenca virulentnih dejavnikov | 37 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 4.3.2 | Primerjava sevov iz narave in živalskega vrta po filogenetskih (pod)skupinah za posamezne gene | 38 |
| 4.3.3 | Število zapisov za virulentni dejavnik za posamezno filogenetsko (pod)skupino pri sevih iz narave in živalskega vrta | 40 |
| 4.4 | PRIMERJAVA MED SEVI DB IN SEVI BJ | 42 |
| 4.4.1 | Filogenetske (pod)skupine | 42 |
| 4.4.2 | Prevalenca virulentnih dejavnikov pri sevih DB in BJ | 43 |
| 4.4.3 | Primerjava sevov DB in sevov BJ po filogenetskih (pod)skupinah za posamezne gene | 44 |
| 4.4.4 | Število zapisov za virulentni dejavnik pri sevih DB in sevih BJ | 46 |
| 4.4.5 | Število zapisov za virulentni dejavnik za posamezno filogenetsko (pod)skupino pri sevih DB in sevih BJ | 47 |
| 4.5 | OBČUTLJIVOST ZA ANTIBIOTIKE | 48 |
| 5 | RAZPRAVA | 49 |
| 6 | SKLEPI | 55 |
| 7 | VIRI | 57 |

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|--|----|
| Preglednica 1: Razdelitev v filogenetske skupine in podskupine glede na prisotnost oz odsotnost označevalcev <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> in TSPE4.C2 (Escobar-Parámo in sod., 2004). | 16 |
| Preglednica 2: Število sevov, izoliranih iz posameznega vzorca, datum in kraj nabora vzorca, oseba, ki je vzorec nabrala. | 19 |
| Preglednica 3: Pozitivne kontrole sevov <i>E. coli</i> za verižno reakcijo s polimerazo. | 20 |
| Preglednica 4: Koncentracije antibiotikov v gojišču LB. | 21 |
| Preglednica 5: Program PCR za pomnoževanje odsekov DNA za določevanje filogenetskih (pod)skupin. | 29 |
| Preglednica 6: Programi PCR za pomnoževanje zapisov za VD. | 31 |
| Preglednica 7: Koncentracije agaroze v gelu glede na velikost pomnoženih fragmentov DNA. | 33 |
| Preglednica 8: Primerjava števila sevov iz narave in živalskega vrta po filogenetskih (pod)skupinah. | 36 |
| Preglednica 9: Število sevov iz narave in živalskega vrta, ki ima zapis za posamezen VD. | 37 |
| Preglednica 10: Primerjava sevov iz narave in živalskega vrta po filogenetskih (pod)skupinah za posamezne gene. | 39 |
| Preglednica 11: Število zapisov za VD za posamezno filogenetsko (pod)skupino pri sevih iz narave in živalskega vrta. | 41 |
| Preglednica 12: Primerjava števila sevov BJ in sevov DB po filogenetskih (pod)skupinah. | 42 |
| Preglednica 13: Prevalenca virulentnih dejavnikov pri sevih DB in BJ. | 43 |
| Preglednica 14: Primerjava sevov DB in BJ po filogenetskih (pod)skupinah za posamezne gene. | 45 |
| Preglednica 15: Število zapisov za VD pri sevih DB in sevih BJ. | 46 |
| Preglednica 16: Število zapisov za VD za posamezno filogenetsko (pod)skupino pri sevih DB in sevih BJ. | 48 |

KAZALO SLIK

| | |
|---|----|
| Slika 1: Mesto odvzema posameznega vzorca medvedjega iztrebka (ARSO/LUZ, 2007). | 18 |
|---|----|

KAZALO PRILOG

Priloga A: Preglednica rezultatov analize sevov *E. coli* zbirke DB; uvrstitev v filogenetske (pod)skupine in prisotnost VD pri vsakem posameznem sevu.

Priloga B: Preglednica rezultatov analize sevov *E. coli* zbirke BJ; uvrstitev v filogenetske (pod)skupine in prisotnost VD pri vsakem posameznem sevu.

Priloga C: Primeri slik gelov gelskih elektroforez pomnožkov PCR.

Priloga C1: Primer elektroforeze pomnožkov ERIC-PCR izolatov *E. coli* zbirke DB.

Priloga C2: Primer elektroforeze pomnožkov PCR-reakcije za ugotavljanje filogenetskih (pod)skupin sevov DB.

Priloga C3: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *usp* sevov *E. coli* zbirke DB.

Priloga C4: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *iucD* sevov *E. coli* zbirke DB.

Priloga C5: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *ibeA* sevov *E. coli* zbirke DB.

Priloga C6: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *fimH* sevov *E. coli* zbirke DB.

Priloga C7: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *fyuA* sevov *E. coli* zbirke DB.

Priloga C8: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *kpsMT* sevov *E. coli* zbirke DB.

Priloga C9: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *papGII* sevov *E. coli* zbirke DB.

Priloga C10: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *papGIII* sevov *E. coli* zbirke DB.

Priloga C11: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *sfaDE* sevov *E. coli* zbirke DB.

Priloga C12: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *afa/draBC* sevov *E. coli* zbirke DB.

Priloga C13: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *cnfI* sevov *E. coli* zbirke DB.

Priloga C14: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *hlyA* sevov *E. coli* zbirke DB.

Priloga C15: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *tcpC* sevov *E. coli* zbirke DB.

Priloga C16: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *ireA* sevov *E. coli* zbirke DB.

Priloga C17: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *iha* sevov *E. coli* zbirke DB.

Priloga C18: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *hbp* sevov *E. coli* zbirke DB.

Priloga D: Občutljivost za antibiotike sevov *E. coli* zbirke DB.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|----------------|---|
| Amp | ampicilin |
| BJ | zbirka človeških komenzalnih sevov <i>E. coli</i> Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani |
| CFAs | kolonizacijski faktorji (ang. "colonization factor antigens") |
| CNF | citotoksični nekrotizirajoči dejavnik (ang. "cytotoxic necrotizing factor") |
| DB | zbirka medvedjih komenzalnih sevov <i>E. coli</i> , ki smo jih preučevali v tem diplomskem delu |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina (ang. "deoxyribonucleic acid") |
| <i>E. coli</i> | bakterija <i>Escherichia coli</i> |
| EAEC | enteroagregativi sevi <i>E. coli</i> (ang. "enteroaggregative <i>E. coli</i> ") |
| EHEC | enterohemoragični sevi <i>E. coli</i> (ang. "enterohaemorrhagic <i>E. coli</i> ") |
| EIEC | enteroinvazivni sevi <i>E. coli</i> (ang. "enteroinvasive <i>E. coli</i> ") |
| EPEC | enteropatogeni sevi <i>E. coli</i> (ang. "enteropathogenic <i>E. coli</i> ") |
| ERIC-PCR | PCR z začetnimi oligonukleotidi, ki nalegajo na zaporedja ERIC (ang. "enterobacterial repetitive intergenic consensus") |
| ETEC | enterotoksigeni sevi <i>E. coli</i> (ang. "enterotoxigenic <i>E. coli</i> ") |
| ExPEC | zunajčrevesni patogeni sevi <i>E. coli</i> (ang. "extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i> "). |
| HUS | hemolitični uremični sindrom |
| IPEC | črevesni patogeni sevi <i>E. coli</i> (ang. "intestinal pathogenic <i>E. coli</i> ") |
| LB | tekoče gojišče Luria-Bertani |
| LEE | lokus za izbris enterocitov (ang. "locus of enterocyte effacement") |
| MNEC | meningitis povzročujoče <i>E. coli</i> (ang. "meningitis-causing <i>E. coli</i> ") |
| Nal | nalidiksična kislina |
| NTEC | nekrotoksigene <i>E. coli</i> (ang. "necrotoxic <i>E. coli</i> ") |
| PAIs | otoki patogenosti (ang. "pathogenicity islands") |
| PBP | penicilin vezavne beljakovine (ang. "PBP-penicillin binding proteins") |
| PCR | verižna reakcija s polimerazo (ang. "polymerase chain reaction") |

| | |
|-------|---|
| RNA | ribonukleinska kislina (ang. "ribonucleic acid") |
| SEPEC | sevi <i>Escherichia coli</i> , ki povzročajo sepsa (ang. "sepsis associated <i>E. coli</i> ") |
| Sm | streptomycin |
| Tc | tetraciklin |
| TIR | domena Toll–interlevkanskega receptorja (ang. "Toll-interleukin receptor") |
| TL | toplotno labilni enterotoksin |
| TLR | Tollu–podoben receptor (ang. "Toll-like receptor") |
| TS | toplotno stabilni enterotoksin |
| UPEC | uropatogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. "uropathogenic <i>E. coli</i> ") |
| UTI | okužba urinarne poti (ang. "urinary tract infections") |
| VD | virulentni dejavniki |

1 UVOD

Normalna mikrobiota v prebavilih predstavlja obrambo pred drugimi patogenimi mikroorganizmi, sodeluje pri absorpciji hranil, sintezi vitamina K. Predstavniki normalne mikrobiote so z gostiteljem v komenzalnem sožitju, vendar pa lahko v določenih primerih povzročijo okužbo (Seme, 2002). Sestava črevesne mikrobiote je odvisna od črevesne fiziologije, gostiteljeve filogenije in prehrane. Bakterijska raznolikost se povečuje od mesojedih, vsejedih do rastlinojedih živali. Črevesna mikrobiota ljudi, ki živijo sodoben življenjski slog, je značilna za vsejede primare (Ley in sod., 2008).

Prebavni trakt človeka je dobro raziskan. V želodcu je pH izrazito nizek, kar predstavlja naravno zaščito pred bakterijami. Tako nizek pH uniči večji del bakterij. Na steni želodca pa je pH nekoliko višji, zato lahko tu najdemo bakterije kot so *Hydrobacter pylorii*, *Lactobacilli*,... V tankem črevesju pH narašča. V dvanajstnik se izliva žolč iz žolčnika, ki sodeluje pri presnovi lipidov. Št. bakterij je 10^5 – 10^7 /g sestavin. V tankem črevesju pride do prevzema hranil. Površina je močno nagubana z resicami in mikrovili. Z naraščanjem pH-ja narašča tudi število mikroorganizmov. V debelem črevesju je število bakterij bistveno večje. Na začetku debelega črevesja najdemo predvsem fakultativne anaerobe (*E. coli*, ...). Njihova koncentracija je 10^7 /g sestavin in imajo vlogo porabljanja kisika in s tem zagotavljanje anaerobnih pogojev, v katerih lahko živijo obligatni anaerobi (10^{11} /g sestavin). V debelem črevesju se odstrani voda in ostanki hrane. Približno 1/3 fecesa predstavljajo bakterije. Predstavniki obligatnih anaerobov so bakterije iz skupine *Bacteriodes* in *Clostridium*. Osebe, ki se prehranjujejo z mesom imajo več *Bacteroidov* in manj *Lactobacillov*. Če pa jedo več ogljikovih hidratov, pa je ravno obratno.

Bakterija *Escherichia coli* je del normalne črevesne mikrobiote večine živali s stalno telesno temperaturo. Patogenost *E. coli* je tesno povezana s prisotnostjo določene kombinacije virulentnih genov, ki so zadolženi za pritrditev bakterije oz. za proizvodnjo toksinov (Baldy-Chudzik in sod., 2008). Virulentni sevi povzročajo okužbe prebavil in zunajčrevesne okužbe pri človeku in živalih (Andlovic, 2002).

Rjavega medveda (*Ursus arctos*) uvrščamo v red zveri in je vsejeda žival. V naravi se giblje v območju velikem tudi do 1600 km² in le redko pride v stik s človekom. Medved v ujetništvu ima malo prostora za gibanje, vendar je v stalnem stiku s človekom, od katerega dobiva svežo raznoliko hrano. Vloga črevesne mikrobiote pri rjavih medvedih še ni raziskana. Analizirana pa je bila mikrobiota in mikrobná aktivnost pri vzorcih iztrebkov grizljev v ujetništvu in iz narave (Schwab in sod., 2009).

1.1 NAMEN DELA

V raziskavo smo vključili 86 sevov *E. coli* izoliranih iz prebavnega trakta rjavih medvedov, od tega je 41 sevov medvedov iz Živalskega vrta Ljubljana in 45 sevov medvedov iz narave. Seve smo uvrstili v filogenetske (pod)skupine. Preučevali smo razlike v pojavnosti virulentnih dejavnikov (*papGII*, *papGIII*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *cnf1*, *hlyA*, *usp*, *iucD*, *tcpC*, *ibeA*, *fimH*, *fyuA*, *ireA*, *iha*, *hbp* in *kpsMT*). Preverili smo občutljivost bakterij za antibiotike (streptomicin, ampicilin, tetraciklin in nalidiksična kislina). Prav tako smo primerjali pojavnost virulentnih dejavnikov med sevi, ki smo jih izolirali iz črevesja medvedov, in med zbirko izolatov *E. coli*, ki je bila predhodno pridobljena iz črevesja zdravih ljudi.

Cilji naloge:

- Ugotoviti prevalenco virulentnih dejavnikov pri črevesnih sevih *E. coli* medvedov v ujetništvu in medvedov iz naravnega okolja.
- Ugotoviti razlike v občutljivosti za antibiotike sevov *E. coli* medvedov v ujetništvu in medvedov iz naravnega okolja.
- Primerjati prevalenco virulentnih dejavnikov sevov *E. coli* iz črevesja medvedov in sevov *E. coli* iz črevesja zdravih ljudi.

2 PREGLED OBJAV

2.1 *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli je po Gramu negativen fakultativno anaeroben bacil in kemoorganotrof. Prvi ga je opisal nemški zdravnik Theodor Escherich leta 1885. Bakterija *E. coli* je eden izmed najboljše preučenih mikroorganizmov. Uvrščamo jo v rod *Escherichia*, tega pa v družino *Enterobacteriaceae*. Celice so v povprečju dolge 2,0 – 6,0 mikrometra in v premer merijo 1,1 – 1,5 mikrometra. Večina sevov je gibljivih in ne sporulirajo (Andlovic, 2002; Žgur-Bertok in Starčič Erjavec, 2009).

Escherichia coli je dobro prilagojena na svoje okolje. Najbolje raste pri temperaturi 37 °C. Raste na različnih substratih, tudi v okolju, kjer je glukoza edina organska snov. Uspeva v okolju s kisikom ali brez njega. V anaerobnih pogojih poteka fermentacija ali pa anaerobno dihanje, kjer je končni sprejemnik elektronov NO₃, NO₂ ali fumarat (Todar, 2008). Zaradi hitre rasti in nezahtevnih pogojev kulture se jo uporablja kot vektor za kloniranje genov in testni organizem pri preizkušanju učinkovitosti antimikrobnih učinkovin ter kot indikator fekalne kontaminacije vode (Andlovic, 2002).

Escherichia coli normalno naseljuje črevesje večine živali s stalno telesno temperaturo, vključno z ljudmi. V črevesju varuje ekološko nišo pred patogenimi bakterijami ter sintetizira vitamin K in vitamine skupine B. Na različne načine vpliva na organizem gostitelja, kar je posledica strukture bakterijskega genoma. Genom *E. coli* vsebuje univerzalne osnovne gene in dodatne neobvezne gene (sem spadajo tudi virulentni geni), ki so specifični za različne seve. Slednji se prenašajo z mobilnimi genetskimi dejavniki, kot so otoki patogenosti, transpozoni, bakteriofagi in plazmidi (Baldy-Chudzik in sod., 2008). Genom *E. coli* laboratorijskega seva K-12 so leta 1997 objavili v reviji Science. Krožni kromosom K-12 je zgrajen iz 4.639.221 bp, ki zapisujejo 4.288 beljakovin. Genom vsebuje tudi insercijske sekvence, ostanke fagov in druge zapise, ki se prenašajo horizontalno. Področje genoma z zapisi za beljakovine zavzema 87,8 %, stabilne molekule RNA predstavlja 0,8 % genoma, nekodirajočih ponovitev 0,7 % genoma in približno 11 % genoma je namenjenih za uravnavanje in druge funkcije (Blattner in sod., 1997).

Patogenost *E. coli* je tesno povezana s prisotnostjo določene kombinacije virulentnih genov, ki so zadolženi za pritrnitev bakterije, oz. s proizvodnjo toksinov. Nekatere diarogene *E. coli* so vrstno specifične; pojavljajo se pogosteje pri določenih živalskih vrstah (Baldy-Chudzik in sod., 2008).

Patogene seve *E. coli* delimo na črevesne patogene seve (IPEC) in zunajčrevesne patogene seve (ExPEC). V obeh skupinah razlikujemo različne virotipe oz. patotipe, ki imajo določeno kombinacijo virulentnih dejavnikov (VD). V skupino IPEC uvrščamo virotipe: enterotoksigene *E. coli* (ETEC), enteropatogene *E. coli* (EPEC), enteroinvazivne *E. coli* (EIEC), enterohemoragične *E. coli* (EHEC), enteroagregativne *E. coli* (EAEC) in nekrotoksigene *E. coli* (NTEC). V skupino ExPEC pa uvrščamo virotipe: uropatogene *E. coli* (UPEC), meningitis povzročujoče *E. coli* (MNEC) in sepsu povzročujoče *E. coli* (SEPEC). Genomi patogenih sevov *E. coli* so večji od komenzalnih (Žgur-Bertok in Starčič Erjavec, 2009).

2.1.1 Komenzalni sevi *E. coli*

Komenzalne bakterije kolonizirajo gastrointestinalni trakt novorojenčka v prvih urah življenja. Sestava črevesne mikrobiote se tekom življenja spreminja. Pri rojstvu je črevesje sterilno, v nekaj urah pa pride najprej do kolonizacije fakultativnih aerobov, ki porabljajo kisik in naredijo okolje bolj reducirano, kar omogoča rast striktnim anaerobom. Sestava črevesne mikrobiote novorojenčkov se razlikuje glede na način rojstva. Novorojenčki, ki so rojeni po naravni poti, pridobijo fekalne in vaginalne bakterije matere. Dojenčki, rojeni s carskim rezom, so izpostavljeni bakterijam iz bolnišnične okolice in zdravstvenih delavcev. Drugi faktorji, ki imajo vpliv na sestavo črevesne mikrobiote dojenčkov so okolje pri rojstvu, prezgodnje rojstvo, higijenski ukrepi, uporaba antibiotikov in vrsta hrane, ki jo dojenček uživa. Dojenčki, ki se hranijo z materinim mlekom, imajo v fecesu več bifidobakterij ter manj bakterij *Clostridium difficile* in *E. coli* kot dojenčki, ki so hranjeni s pripravljeno hrano (Penders in sod., 2006). Velikost populacija *E. coli* v črevesju človeka znaša 10^5 do 10^8 celic na gram fecesa, kar je le delež celotne bakterijske populacije v črevesju (10^{11} celic/g) (Ingledew in Poole, 1984).

Črevesna mikrobiota ima pomembno vlogo pri zaščiti gostitelja. Predstavlja bariero za kolonizacijo in razmnoževanje patogenov, pomembna pa je tudi pri stimulaciji in razvoju imunskega sistema. Črevesni komenzali izvajajo pomembne metabolne funkcije, sodeluje pri absorpciji hranil, sintezi vitaminov,... (Penders in sod., 2006). Pomen komenzalnih sevov *E. coli* za gostitelja pa je v tem, da sintetizirajo nekatere vitamine in varujejo ekološko nišo pred patogenimi bakterijami (Žgur-Bertok in Starčič Erjavec, 2009).

Komenzalne bakterije v prebavnem traktu pri normalnih fizioloških pogojih ne povzročajo bolezni. Tako bakterija kot gostitelj imata desetletja korist od njunega sobivanja. Vse dokler bakterija ne pridobi genske elemente, ki kodirajo VD, ostane benigni komenzal (Weintraub, 2007).

2.1.2 Črevesni patogeni sevi (IPEC)

Enterotoksigena *E. coli* (ETEC) izloča toplotno labilni enterotoksin (TL), ki je podoben kolera toksinu, ter toplotno stabilni enterotoksin (TS). Posledica delovanja toksinov je obilna vodena driska. ETEC se s fimbrijami pritrdi na specifične receptorje na površini enterocitov. Opisanih je bilo več kot 20 tipov fimbrijskih antigenov, ki jih imenujemo *E. coli* površinski antigeni ali antigeni kolonizacijskih faktorjev (CFAs). Sevi ETEC povzročajo drisko pri dojenčkih in malih otrocih v državah v razvoju in potovalno drisko pri potnikih v te države. Do okužbe pride zaradi zaužitja kontaminirane hrane ali vode (slabe higienske razmere) (WHO, 2009; Gupta in sod., 2008).

Enteropatogena *E. coli* (EPEC) je človeški črevesni patogen, ki povzroči hudo vodeno drisko v državah v razvoju predvsem pri otrocih do 3. leta starosti. Za bolezen je značilna izguba absorptivnih mikrovilov enterocitov, indukcija z aktinom bogatih podstavkov pod pritrjenimi bakterijami, inhibicija transporta hranil in vode, mitohondrijska disfunkcija, šibek vnetni odziv, uničenje tesnih stikov med enterociti in hitra vodena diareja. Najbolj znane efektorske beljakovine EPEC so kodirane skupaj na LEE otoku patogenosti genoma (Dean in Kenny, 2009).

Enteroinvazivne *E. coli* (EIEC) povzročajo krvavo dizenterijsko drisko z vročino. Po sposobnosti invazije so zelo podobne šigelam; pripnejo se na mikrovile enterocitov in jih uničijo (Andlovic, 2002).

Enterohemoragična *E. coli* (EHEC) izloča Šigovemu toksinu podobne toksine, ki pa je značilen za bakterijo *Shigella dysenteriae* serotipa 1. Najbolj znan serotip je *E. coli* O157:H7. Vir EHEC so prebavila govedi ter verjetno tudi druge živali. Prenaša se s kontaminirano hrano, predvsem mletim govejim mesom in vodo. *E. coli* O157 povzroča blago vodeno drisko in hemoragični kolitis, pri majhnih otrocih in starejših ljudeh pa je možen pojav kasnejšega zapleta – hemolitični uremični sindrom (HUS) (Andlovic, 2002).

Enteroagregativne *E. coli* (EAEC) povzročajo perzistentno drisko (več kot 14 dni) pri otrocih v državah v razvoju. Patogeneza okužbe še ni dobro raziskana, znano pa je, da se EAEC pritrdijo na črevesno sluznico. Tam inducirajo celice črevesne sluznice k izločanju sluzi. Izločajo številne enterotoksine in citotoksine, ki poškodujejo enterocite in povzročijo sekretorno drisko (Nataro in sod., 1998).

Nekrotoksigene *E. coli* (NTEC) so sevi, ki proizvajajo citotoksični nekrotizirajoči dejavnik (CNF). CNF1 in C-hemolizin kodirajoči geni (*cnf1* in *hly*) se nahajajo skupaj na otoku patogenosti (Paciorek, 2002).

2.1.3 Zunajčrevesni patogeni sevi (ExPEC)

Zunajčrevesne patogene *E. coli* imajo virulentne lastnosti, ki jim omogočajo invazijo, kolonizacijo in indukcijo bolezni zunaj prebavnega trakta, s tem ko zaobidejo obrambne mehanizme gostitelja. Virulenca individualnega seva pri okužbi je določena s prisotnostjo in izražanjem virulentnih genov in okoljskimi pogoji gostitelja. Bakterija *E. coli* je sposobna povzročiti različne okužbe kot so okužbe urinarnega trakta (UTI), infekcije mehkih tkiv, bakteriemije, okužbe respiratornega trakta (Banu in sod., 2011), ...

Uropatogene *E. coli* (UPEC) povzročajo večino okužb sečil. Značilno je, da se te okužbe pogosto ponavljajo in jih večinoma povzroči isti sev. Poglavitni razlog za to naj bi bil vstop bakterij v epitelne celice sečnega mehurja, ki se po prvi okužbi v njih naselijo in tam

preidejo v mirujočo fazo znotraj endocitotskih veziklov. Tu so bakterije zaščitene pred delovanjem večine antibiotikov in delovanjem imunskega sistema gostitelja. Življenjski krog UPEC večinoma poteka znotraj končno diferenciranih epitelnih celic sečnega mehurja (Veranič, 2008).

Meningitis je lahko smrtno nevaren zaplet okužbe ljudi z bakterijo *E. coli* (MNEC). Pojavi se lahko pri vseh starostnih skupinah, vendar najbolj ogroža novorojenčke. Za MNEC, ki povzročajo meningitis pri novorojenčkih, so značilni kapsularni polisaharidni antigeni tipa K1, ki so sorodni antigenom meningokokov skupine B (Andlovic, 2002).

Možen zaplet okužbe z *E. coli* predvsem pri hospitaliziranih bolnikih je tudi sepsa (sevi SEPEC), pri čemer je vir okužbe največkrat urinarni trakt (Andlovic, 2002).

2.2 VIRULENTNI DEJAVNIKI

Sposobnost bakterij, da povzročijo bolezen pri gostitelju, imenujemo patogenost. Ta je odvisna od lastnosti bakterij, splošno imenovanih virulentni dejavniki, in od sprejemljivosti gostitelja. Virulentne dejavnike lahko v grobem razdelimo na tiste, ki bakterijam omogočajo naseljevanje in vdor v gostitelja, ter na virulentne dejavnike (toksine), ki okvarijo gostiteljeve celice.

Mikroorganizmi so evolucijsko razvili številne prilagoditve, s katerimi lahko kolonizirajo gostitelja kljub njegovim protimikrobnim mehanizmom. Gibljivost ima pomembno vlogo pri naseljevanju bakterij. Bičke, ki omogočajo premikanje, sestavlja beljakovina flagelin. (Koren in sod., 2002).

Bakterije pogosto ustvarijo biofilm, ko kolonizirajo trde površine in nekatere tkivne površine. Biofilm je večplastna obloga iz velike količine bakterij, ki so izločile zaščitni polisaharidni matriks, imenovan tudi glikokaliks. V biofilmu so bakterije zaščitene pred delovanjem antibiotikov in pred fagociti. Na ta način so se bakterije sposobne pritrčiti tudi na vsadke iz umetnih materialov (umetne srčne zaklopke, katetri), kar povzroča bolnišnične okužbe in sepse v intenzivnih enotah bolnišnic (Koren in sod., 2002).

Bakterija si zagotovi življenjsko nišo tako, da proizvaja bakteriocine, ki zavirajo rast ostalih in tudi sorodnih bakterij. Bakteriocini *E. coli* so beljakovine z od 1.500 do 90.000 Da mase, imenujemo jih kolicini. Zapis zanje se običajno nahaja na plazmidih. Poleg genskega zapisa za kolicin pa je tudi genski zapis za zaščito pred lastnim kolicinom (npr. zapis za kolicin vezavno beljakovino, ki deluje v citoplazmi bakterije) in zapis za sproščanje kolicina iz celice (npr. zapis za protein lize). Praviloma ubije ena molekula kolicina eno bakterijsko celico. Kolicini delujejo na različne načine; lahko tvorijo ionski kanalček v membrani tarčne celice, kar poruši membranski potencial ali pa delujejo kot encimi (Žgur-Bertok in Starčič Erjavec, 2009).

2.2.1 Adhezini

Eden ključnih virulentnih dejavnikov patogenih bakterij je specifična vezava na gostiteljevo tkivo. Vezavo omogočajo posebne površinske strukture bakterij, ki jih imenujemo adhezini. Ti prepoznajo komplementarne receptorje na gostiteljevi celici in z njimi se bakterija najprej reverzibilno veže na receptorje celic gostitelja, sledi tesnejša povezava (Koren in sod., 2002).

Natančne predstave, kako bakterije prepoznajo različne receptorje, še ni. Znanih je veliko število specifičnih bakterijskih adhezinov. Posamezni adhezini so nagnjeni k hitri mikroevoluciji, ki se kaže v spreminjanju specifičnosti za receptor. Bakterijski adhezini so pogosto zbrani v kompleksne polimerne organelne strukture, obstajajo pa tudi neorganelni adhezini, ki so v obliki monomerov ali preprostih oligomerov (Klemm in Schembri, 2000).

Čeprav je adhezija bakterijske celice na epiteljske celice gostitelja koristna za kolonizacijo, pa lahko sproži vezava le-te na imunske celice fagocitozo in smrt bakterije. Veliko patogenih bakterij se zaščiti pred gostiteljevo obrambo tako, da na svoji površini ustvari zaščitno plast, ki običajno vsebuje polisaharide. Nekatere bakterije imajo na površini adhezine v obliki polimernih struktur, ki se iztezajo stran od površine celice in omogočijo povezavo z gostiteljevo celico na varni razdalji (Kline in sod., 2009).

Fimbrije so adhezijski organeli, ki jih izražajo številne po Gramu negativne bakterije. Uropatogeni sevi *E. coli* (UPEC) lahko izražajo različne vrste fimbrij kot so P, S, Dr in fimbrije tipa 1 (Connell in sod, 1996).

Prisotnost fimbrij tipa 1 poveča virulenco *E. coli* za urinarni trakt preko specifične adherence in povečane indukcije vnetja sluznice. Fimbrije tipa 1 kodira genska skupina fim (fim operon), ki se nahaja na kromosomu in je pogosto prisotna med sevi *E. coli*. Fimbrije sestavlja glavna strukturna podenota (FimA) in več manjših komponent vključno z adhezinom (FimH). FimH adhezin prepozna terminalno locirane D-manozne ostanke na površini celic in izločene glikoproteine. Bakterije s fimbrijami tipa 1 se vežejo tako na receptorje, ki jih imajo raznolike celice kot so npr. eritrociti, epiteljske celice, granulociti, makrofagi in mastociti (Connell in sod, 1996).

P-fimbrije kodira operon *pap*. Odgovorne so za interakcijo z digalaktozidno enoto (Kline and sod., 2009). Fimbrije so zgrajene iz številnih glavnih (ang. "major") pilinskih podenot (PapA) in treh manjših (ang. "minor") na distalnem koncu P-fimbrije nahajajočih beljakovin (PapE, PapF, PapG). PapG je digalaktozidazno specifičen adhezin, vendar pa je potreben tudi PapF za specifičnost receptorja (Denich in sod., 1991). S P-fimbrijami se UPEC vežejo na epitel urinarnega trakta in povzročijo UTI. Poznamo tri alelne oblike gena *papG*, ki kodirajo Gal(α 1-4)Gal adhezinske molekule P-fimbrij. Označili so jih kot galaktozid-vezavni adhezini »razreda« I-III. Ti razredi imajo visoko ohranjeno karboksiterminalno regijo, ki je del molekule povezan z drugimi podenotami P-fimbrij (Johnson in Brown, 1996).

Dr-fimbrije so prisotne na površini bakterij UPEC. Prepoznajo lecitin ter se vežejo med drugim tudi na Dr^a-antigen na površini eritrocitov človeka in povzročijo hemaglutinacijo. Receptor za Dr-fimbrije izražajo številna zdrava tkiva človeka, vendar pa je za okužbo pomembna njihova gostota in dostopnost (Nowicki in sod., 1988).

Le nekateri sevi *E. coli* imajo S-fimbrije, ki se vežejo na receptorje, kjer prepoznajo sialično kislino. Taki sevi povzročajo predvsem urinarne infekcije in meningitis novorojenčkov (Hacker in sod., 1992).

Znan je tudi nehemaglutininski adhezin Iha (ang. "IrgA homologue adhesin"). Zapis zanj se nahaja na otoku patogenosti (PAI) kromosoma. Na tem PAI je prisoten tudi operon *hly*, ki kodira hemolizin, in en izmed operonov *pap* (Johnson in sod. 2000).

2.2.2 Sistemi za privzem železa

Železo je nujno potrebno za razmnoževanje in rast bakterij. V gostitelju je malo prostega železa, saj je večinsko vezan na beljakovine. Bakterije so zato razvile učinkovite načine, s katerimi privzemajo in kopičijo železo za svoje potrebe. Sideroforji so posebne molekule, ki z veliko afiniteto vežejo proste železove ione. Bakterije sideroforje izločajo v okolje, kjer ti vežejo železove ione, nato jih privzamejo nazaj in v bakteriji se železovi ioni nato sprostijo in sodelujejo v presnovnih procesih. Nekatere bakterije so sposobne privzeti tudi železo vezano na beljakovine (npr. transferin, hemoglobin) (Koren in sod., 2002). Poleg tega lahko bakterije, ki sicer same sintetizirajo sideroforje, privzemajo sideroforje, ki so jih sprostile druge bakterije ali celo glive. Sideroforje klasificiramo v tri skupine: (i) kateholatni tip (enterobaktin, salmohelin = enterohelin), (ii) hidrosamatni tip (aerobaktin) in (iii) mešani tip – je kombinacija obeh (jersiniabaktin).

Poleg sideroforjev in njihovih receptorjev igrajo vlogo pri privzemanju železa tudi avtotransporterji. Primer takega avtotransporterja je hemoglobin-proteaza Hbp, ki je energijsko neodvisna. Med sevi ExPEC so našli številne sisteme za privzema železa povezane s patogenezo; med njimi so aerobaktin, salmohelin, jersiniabaktin, Iha, IreA in Hbp (Starčič Erjavec in sod., 2009). IreA in IroN sta sideroforna receptorja, ki sta podobna adhezinu Iha (Russo in sod., 2001). Receptor FyuA (ang. “ferric yersiniabactin uptake”) za jersiniabaktin ima tudi vlogo receptorja za bakteriocin pesticin bakterije *Yersinia pestis* (Crosa in Walsh, 2002).

2.2.3 Bakterijska kapsula

Polisaharide izločajo številne bakterije. Kadar le-ti tesno in kompaktno obdajajo bakterijo, to imenujemo kapsula, če pa polisaharidna vlakna oblikujejo mrežo, imenujemo strukturo glikokaliks, ki je pomemben pri nastanku biofilma. Bakterije lahko tvorijo tudi zaščitno sluz, ki ni tesno vezana nanje in predstavlja za rast ugodno okolje. Kapsula povečuje invazivnost bakterije, ker jih ščiti pred imunskim odzivom gostitelja (Ihan, 2002).

Bakterija *E. coli* ima več kot 80 tipov kapsularnih polisaharidov (Johnson, 1991). Glede na biokemične in genetske kriterije kapsule uvrščamo v tri skupine. Kapsule skupine I so večji termostabilni polisaharidi, ki imajo majhno gostoto nabojev. V primerjavi z njimi imajo

kapsularni polisaharidi skupine II manjšo molekularno maso, imajo veliko gostoto nabojev in so termolabilni. Zapis za njih se nahaja na kromosomu blizu *serA*. Geni za skupino II so uravnavani s toploto, izražajo se le pri temperaturi višji od 20 °C, uravnavani so tudi z visoko stopnjo aktivnosti sintetaze CMP-KDO (ang. "CMP-3-keto-3-deoxy-manno-octulosonate"). Kapsularni polisaharidi skupine III so podobni polisaharidom II, zapis za njih je prav tako lociran blizu *serA*, vendar pa uravnavanje genov polisaharidov skupine III ni odvisna od temperature in visoke aktivnosti sintetaze CMP-KDO. Kapsule skupine II imajo ohranjene regije, ki vsebujejo gene *kpsFEDUCS* in *kpsMT*, katerih produkti sodelujejo v dozorevanju in izvozu polisaharida (Clarke in sod., 1999).

2.2.4 Toksini

Bakterijski toksini so pomembni virulentni dejavniki, ki ovirajo delovanje gostiteljskih celic in jih okvarjajo. Alfa-hemolizin (Hly) je močan eksotoksin, ki ga izloča približno polovica ExPEC. Hemolizin je toksičen za eritrocite, ker tvori transmembranske pore v lipidnem dvosloju in je odvisen od kalcija (May in sod., 2000). Določeni sevi *E. coli* proizvajajo citotoksični nekrotizirajoči dejavnik CNF1, ki je del večje družine dermonekrotičnih toksinov. CNF1 sproži reorganizacijo citoskeleta epitelnih celic, kjer pride do kopičenja F-aktina. Tako prizadete večjederne celice velikanke propadejo (Fabbri in sod., 2010).

2.3 ANTIBIOTIKI

Antibiotiki so snovi, ki ovirajo razmnoževanje in rast mikroorganizmov, zato jih uporabljamo pri zdravljenju infekcijskih bolezni. Naravni antibiotiki so proizvod gliv in bakterij, vendar se večinoma danes uporabljajo kemoterapevtiki, ki pa so antimikrobna zdravila izdelana s sintezo ali kemijsko modifikacijo naravnega antibiotika. Glede na učinek na bakterije so antibiotiki baktericidni, ti onemogočijo razmnoževanje bakterij, ali bakteriostatični, ki pa razmnoževanje samo zavrejo (Kotnik, 2002).

Po mehanizmu delovanja razlikujemo 4 vrste antibiotikov. Prvi preprečujejo sintezo celične stene (npr. penicilini), drugi delujejo na sintezo znotrajceličnih beljakovin (npr. aminoglikozidi), tretji vplivajo na sintezo DNA (npr. kinoloni) in četrti ovirajo delovanje celične membrane (npr. polimiksini).

2.3.1 Zaviralci sinteze celične stene

V skupino zaviralcev sinteze celične stene sodijo betalaktami (penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami, zaviralci laktamaz beta), glikopeptidi (vankomicin, teikoplanin) in bacitracin. Betalaktami so široka skupina antibiotikov, za katere je značilno, da imajo betalaktamski obroč. Po delovanju so baktericidni, saj zavirajo sintezo peptidoglikana, ki je osnovna sestavina bakterijske celične stene. Betalaktami vstopajo skozi bakterijsko steno, ter se vežejo na beljakovine PBP, ki so na citoplazemski membrani in jih inaktivirajo. Beljakovine PBP so sicer pomembne za zamreženje sestavin bakterijske stene. Pri njihovi inaktivaciji pride v celici do kopičenja osnovnih sestavin bakterijske stene, kar sproži avtolizo bakterije. Najbolj razširjena skupina antibiotikov so penicilini, med katerimi ločimo standardne peniciline, antistafilokokne peniciline in širokospektralne peniciline (aminopenicilini – ampicilin, karboksipenicilini in ureidopenicilini). Cefalosporini in karbapenemi so polysintetični betalaktamski antibiotiki (Kotnik, 2002).

2.3.2 Zaviralci sinteze beljakovin

Mednje spadajo aminoglikozidi, tetraciklini, kloramfenikol, makrolidi, linkozamidi in fucidinska kislina. Aminoglikozidi delujejo tako, da preprečujejo vezavo t-RNA na ribosomsko podenoto 30 S, s čimer preprečijo sintezo proteinov. Najbolj znan aminoglikozid je streptomycin. Tetraciklini imajo značilno zgradbo iz štirih šestčlenskih obročev. Delujejo bakteriostatično, tako da se vežejo na 30 S podenoto ribosomov in preprečijo vezavo aminoacil-t-RNA na akceptorsko mesto. Kloramfenikol se veže na ribosomsko podenoto 50 S, s tem zavre delovanje peptidil transferaze in s tem sintezo peptidnih vezi. Makrolidi imajo značilen makrociklični laktonski obroč. Makrolid eritromicin se veže z ribosomskima podenotama 30 S in 50S ter preprečuje translacijo v beljakovine (Kotnik, 2002).

2.3.3 Zaviralci sinteze DNA

Mednje spadajo sulfonamidi, trimetoprim in kinoloni. Sulfonamidi delujejo bakteriostatično; ovirajo sintezo tetrahidrofolne kisline in pirimidinov, ki so osnovni gradniki nukleinskih kislin. Prokariotske celice same sintetizirajo tetrahidrofolno kislino, evkariotske pa so vezane na zunanje vire folne kisline, zato nanje ti antibiotiki skoraj ne vplivajo. Trimetoprim je po zgradbi podoben pirimidinom. Deluje tako, da preprečuje sintezo tetrahidrofolne kisline. Kinolone pridobivamo sintetično, pri njih je osnovna spojina nalidiksična kislina. Delujejo baktericidno, in sicer tako, da zavirajo delovanje DNA-giraze. Slednja vpliva na oblikovanje bakterijskega kromosoma (Kotnik, 2002).

2.3.4 Zaviralci delovanja celične membrane

Polimiksini so strukturno ciklični polipeptidi in so baktericidni. Delujejo podobno kot kationski detergenti in razgrajujejo fosfolipidni dvosloj (Kotnik, 2002).

2.3.5 Odpornost proti antibiotikom

Zaradi množične in velikokrat nekritične uporabe antibiotikov, prihaja do selekcije proti antibiotikom odpornih bakterijskih sevov. Bakterije so razvile številne mehanizme, da se izognejo delovanju antibiotikov. Najbolj znana je pridobitev encimov beta-laktamaz (npr. klavulanska kislina, sulbaktam, beta-laktamaze iz skupine TEM in SHV, ESBL), ki razgradijo betalaktamski obroč betalaktamskih antibiotikov. Raznolike beta-laktamaze kodirajo plazmidni in kromosomski geni. Nekatere bakterije spremenijo tarčno mesto antibiotika, kot je sprememba beljakovin PBP. Bakterija lahko pridobi genski zapis za nove in drugačne beljakovine PBP ali pa spremeni že obstoječe beljakovine PBP in jim zmanjša afiniteto do vezave penicilina. Bakterije lahko zmanjšajo prepustnost celične membrane za antibiotik, kot je primer mutacijske spremembe porinov v celični steni, skozi katere tako ne morejo prehajati betalaktamski antibiotiki do PBP. Odpornost proti sulfonamidu in trimetoprimu nastane zaradi preprečene sinteze timina v celici; pride torej do spremembe presnovne poti, na katero antibiotik deluje. Nekatere bakterije aktivno izčrpajo antibiotik (npr. tetraciklin) iz celice. Zapise za prenašalne beljakovine bakterije pridobijo z genskim prenosom (Seme, 2002).

2.4 FILOGENETSKE SKUPINE

Analize so pokazale, da lahko seve *E. coli* razdelimo v štiri filogenetske skupine: A, B1, B2 in D. Komenzalne seve običajno uvrstimo v skupini A in B1, medtem ko so zunajčrevesni patogeni sevi večinoma v skupinah B2 in D. S številnimi študijami o razvrstitvi sevov v filogenetske skupine smo dobili boljšo predstavbo o patogenih sevih in njihovo povezanostjo s pogostostjo zapisov za VD (Clermont in sod., 2000; Baldy-Chudzik in sod., 2008).

Obstaja več različnih metod za določevanje filogenetskih skupin. Enostavna in hitra razvrstitev sevov v filogenetske skupine temelji na metodi verižne reakcije s polimerazo (PCR), pri kateri se uporablja kombinacijo treh DNA označevalcev (*chuA*, *yjaA* in DNA fragment TSPE4.C2). Gen *chuA* je aktiven pri transportu hema pri enterohemoragičnem sevu O157:H7. Gen *yjaA* so odkrili pri preučevanju genoma K-12. Njegova vloga še ni

pojasnjena. Kot filogenetski označevalec se uporablja še fragment TSPE4.C2, ki so ga našli v DNA-knjžnici *E. coli* (Clermont in sod., 2000).

Z analizo PCR-produktov označevalcev uvrstimo sev v določeno filogenetsko skupino. Če je *chuA* prisoten (velikost PCR-produkta 279 bp), gledamo tudi prisotnost *yjaA* (velikost PCR-produkta 211 bp). Če je tudi ta prisoten, sev uvrstimo v skupino B2, če ga ni, sev uvrstimo v skupino D. Če je sev nima gena *chuA*, gledamo prisotnost fragmenta TSPE4.C2 (velikost PCR-produkta 152 bp). Sevi, ki sodijo v skupino B1, imajo TSPE4.C2 pozitiven, negativen pa je pri sevih v skupini A (Zhang in sod., 2002).

Filogenetske skupine A, B2 in D lahko glede na prisotnost prej omenjenih označevalcev še dodatno razdelimo v podskupine A₀, A₁, B2₂, B2₃, D₁ in D₂. Kot je razvidno iz **preglednice 1** podskupina A₀ nima prisotnega nobenega izmed faktorjev *chuA*, *yjaA* in TSPE4.C2, medtem, ko ima podskupina A₁ prisoten samo *yjaA*. Podskupina B2₂ ima prisotna *chuA*, *yjaA*, nima pa TSPE4.C2. Podskupina B2₃ ima prisotne vse tri označevalce. Podskupina D₁ ima prisoten samo *chuA*, podskupina D₂ pa ima *chuA* in TSPE4.C2, nima pa gena *yjaA* (Escobar-Parámo in sod., 2004).

Preglednica 1: Razdelitev v filogenetske skupine in podskupine glede na prisotnost oz odsotnost označevalcev *chuA*, *yjaA* in TSPE4.C2 (Escobar-Parámo in sod., 2004).

| FILOGENETSKA SKUPINA | FILOGENETSKA PODSKUPINA | <i>chuA</i> (velikost PCR-produkta 279 bp) | <i>yjaA</i> (velikost PCR-produkta 211 bp) | TSPE4.C2 (velikost PCR-produkta 152 bp) |
|----------------------|-------------------------|---|---|--|
| A | A ₀ | – | – | – |
| | A ₁ | – | + | – |
| B1 | | – | – | + |
| B2 | B2 ₂ | + | + | – |
| | B2 ₃ | + | + | + |
| D | D ₁ | + | – | – |
| | D ₂ | + | – | + |

Opomba: Znak + pomeni prisotnost označevalca, znak – pa odsotnost označevalca.

2.5 RJAVI MEDVED (*Ursus arctos*)

Slovenija leži na severozahodnem robu strnjenegega območja dinarske populacije rjavega medveda. Živi v gozdovih na jugu države, od Gorjancev do Brkinov in severnega dela Trnovskega gozda. Posamezne medvede srečamo tudi v smeri proti Julijskim in Kamniško Savinjskim Alpam. Medvedi so samotarske živali in živijo na določenem območju, ki ga imenujemo domači okoliš. Le-ta je velik od 100 km² do 1600 km². Ocene številčnosti medvedov v Sloveniji se precej razlikujejo. Populacija danes je stabilna in po trenutnih ocenah znaša 500 do 700 osebkov. Odstrel medveda je že nekaj časa intenziven, ohranjeno številčnost pa lahko pripišemo trenutni visoki rodnosti in dotoku emigrantov s Hrvaške (Akcijški načrt..., 2006).

Samci v dolžino merijo 160 do 260 cm in tehtajo od 200 do 400 kg. Samice so manjše in v dolžino merijo 120 do 200 cm, težke pa so 150 do 350 kg. V naravi medved doseže starost 20 do 25 let, v ujetništvu pa med 30 in 40 let.

2.5.1 Prebavni trakt medveda

Rjavi medved je vsejeda žival, čeprav ga uvrščamo v red zveri. Njegova izbira hrane je odvisna od letnega časa oziroma od možnosti izbire hrane. V celem letu predstavlja hrana rastlinskega izvora 70 do 85 % vse prehrane, medtem ko zaužije le 20 do 25 % hrane živalskega izvora.

Podvrsta rjavega medveda je grizli (*Ursus arctos horribilis*), ki živi v Severni Ameriki. Tudi grizli je vsejeda žival, le da je za razliko od našega medveda večji in večkrat tudi upleni večje živali. V primerjavi s človekom ima medved hitrejšo prebavo, zato v njegovem iztrebku običajno najdemo slabo prebavljene koščke sadja, travo, koruzo, dlake,... Na podlagi najdenih ostankov hrane v iztrebku lahko sklepamo, s čim se je medved prehranjeval. V prebavnem traktu prostoživečih grizlijev so odkrili fakultativne anaerobne enterobakterije in enterokoke. Med anaerobi prevladujejo bakterije iz skupin *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*. Pri medvedih v ujetništvu pa so najpogostejše enterobakterije. Prisotni pa so tudi striktni anaerobi skupin *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* in *Clostridium coccooides*. (Schwab in sod., 2009; Schwab in sod., 2011).

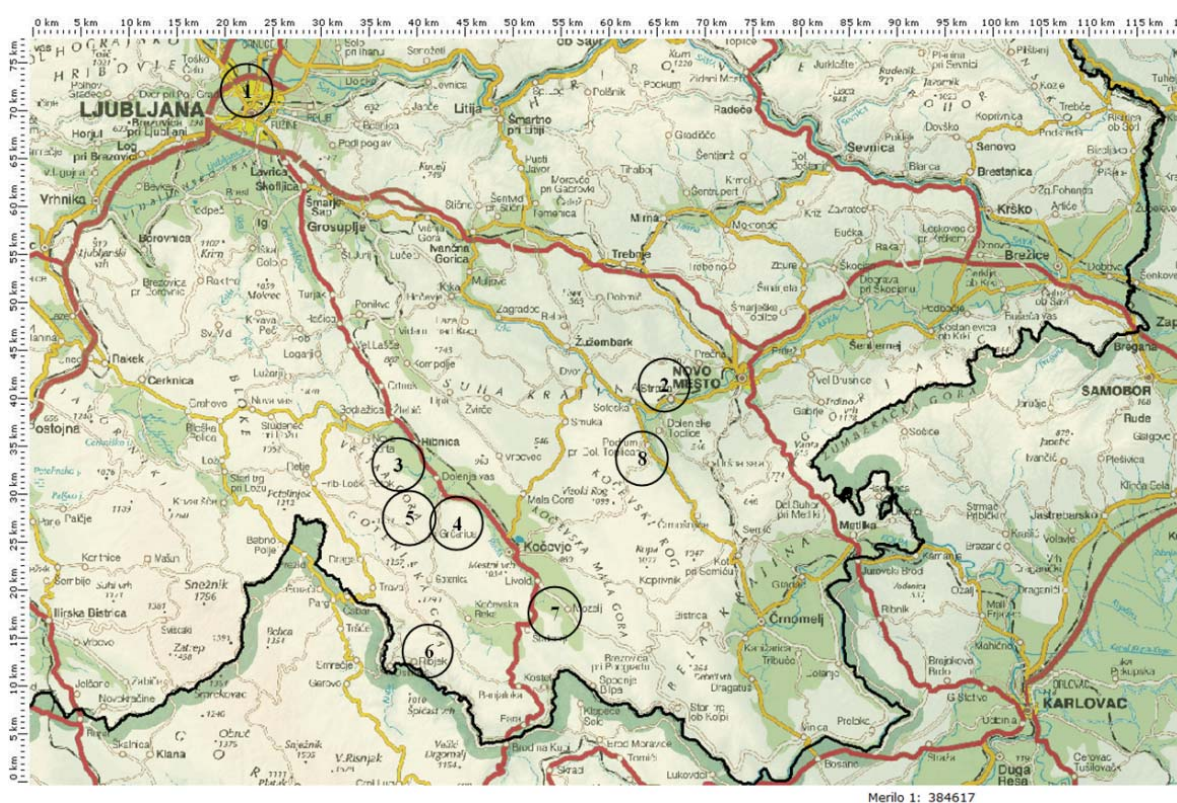
3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski sevi

3.1.1.1 Medvedji sevi - zbirka DB

V preiskavo je bilo vključenih 18 vzorcev medvedjih iztrebkov. Nabor vzorcev je potekal od 13.10.2010 do 5.4.2012. Štiri vzorce smo pridobili od treh zdravih medvedov iz Živalskega vrta Ljubljana, kjer niso prejeli nobenih antimikrobnih zdravil, od teh smo pregledali 80 izolatov. Štirinajst vzorcev smo vzeli iz naravnega okolja iz območja JV Slovenije; glej **slika 1**. Iz teh vzorcev smo pregledali 160 izolatov. Vzorce iz narave so nabrali gospod Franc Kljun iz Skupine za ekologijo živali Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete, lovca Janez Hočevar in Jože Šperar.



Slika 1: Mesto odvzema posameznega vzorca medvedjega iztrebka (ARSO/LUZ, 2007).

Legenda: 1 – Vzorce iz Živalskega vrta Ljubljana: DB2, DB3, DB4, DB5; 2 – vzorec DB6, DB17, DB18; 3 – vzorec DB1, DB7, DB14; 4 – vzorec DB8; 5 – vzorec DB9, DB11, DB15, DB16; 6 – vzorec DB12; 7 – vzorec DB13; 8 – vzorec DB10.

Preglednica 2: Število sevov, izoliranih iz posameznega vzorca, datum in kraj nabora vzorca, oseba, ki je vzorec nabrala.

| Vzorec | Št. sevov, izoliranih iz posameznega vzorca | Datum nabora vzorca | Kraj nabora vzorca | Oseba, ki je vzorec nabrala |
|--------|---|---------------------|--------------------|-----------------------------|
| DB1 | 2 | 13.10.2010 | Ribnica | Franc Kljun |
| DB2 | 6 | 3.11.2010 | ZOO Ljubljana | Damjana Barbič |
| DB3 | 9 | 3.11.2010 | ZOO Ljubljana | Damjana Barbič |
| DB4 | 18 | 3.11.2010 | ZOO Ljubljana | Damjana Barbič |
| DB5 | 9 | 3.11.2010 | ZOO Ljubljana | Damjana Barbič |
| DB6 | 3 | 17.3.2012 | Sv. Peter | Jože Šperar |
| DB7 | 6 | 17.11.2010 | Velika Gora | Franc Kljun |
| DB8 | 1 | 17.11.2010 | Stojna | Franc Kljun |
| DB9 | 5 | 17.11.2010 | Glaž. Dolina | Franc Kljun |
| DB10 | 4 | 17.3.2012 | Podstenice | Jože Šperar |
| DB11 | 4 | 25.3.2012 | Velika Gora | Franc Kljun |
| DB12 | 2 | 17.1.2012 | Ajbnik | Franc Kljun |
| DB13 | 3 | 17.1.2012 | Rogati hrib | Franc Kljun |
| DB14 | 4 | 25.3.2012 | Velika Gora | Franc Kljun |
| DB15 | 5 | 25.3.2012 | Velika Gora | Franc Kljun |
| DB16 | 3 | 25.3.2012 | Velika Gora | Franc Kljun |
| DB17 | 1 | 5.4.2012 | Straški hrib | Janez Hočevar |
| DB18 | 3 | 5.4.2012 | Straški hrib | Janez Hočevar |

3.1.1.2 Človeški sevi - zbirka BJ

Zbirka BJ Skupine za molekularno genetiko Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani vsebuje 90 izolatov *E. coli*, izoliranih iz blata zdravih ljudi moškega in ženskega spola različnih starosti, ki niso prejeli nobenih antimikrobnih zdravil za terapevtske oziroma profilaktične namene. Zbirka je bila zbrana v obdobju od 1.3.2009 do 4.9.2009. Vsi podatki o sevih BJ so iz diplomskega dela Manuele Čitar oz. iz podatkov dostopnih v okviru Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov in so v **prilogi B**.

3.1.1.3 Standardni pozitivni - kontrolni bakterijski sevi

V verižni reakciji s polimerazo smo uporabili pozitivne kontrole, prikazane v **preglednici 3**. Sevi so del zbirke BJ Skupine za molekularno genetiko Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Preglednica 3: Pozitivne kontrole sevov *E. coli* za verižno reakcijo s polimerazo.

| Gen oz. fragment | Pozitivna kontrola |
|-------------------------|---------------------------|
| Filogenija | BJ97 |
| <i>papGIII</i> | BJ32 |
| <i>papGII</i> | BJ12 |
| <i>sfaDE</i> | BJ32 |
| <i>afa/draBC</i> | BJ54 |
| <i>cnfI</i> | BJ32 |
| <i>hlyA</i> | BJ30 |
| <i>usp</i> | BJ12 |
| <i>iucD</i> | BJ2 |
| <i>tcpC</i> | BJ33 |
| <i>ibeA</i> | BJ9 |
| <i>fimH</i> | BJ50 |
| <i>fyuA</i> | BJ1 |
| <i>ireA</i> | BJ11 |
| <i>iha</i> | BJ11 |
| <i>hbp</i> | BJ70 |
| <i>kpsMT</i> | BJ72 |

3.1.2 Gojišča

3.1.2.1 Luria Bertanijevo gojišče (LB)

Kvasni ekstrakt.....0,5 %
 Tripton.....1 %
 NaCl.....1 %

Za pripravo tekočega gojišča LB smo vse sestavine raztopili v 1 L deionizirane vode. V epruvete smo odpipetirali po 5 mL gojišča in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

Za pripravo gojišča za shranjevanje bakterijskih kultur smo sestavinam dodali glicerol. Končna mešanica je vsebovala 30 % glicerol in tekoče gojišče LB. Gojišče smo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

Za pripravo trdnega gojišča smo sestavinam pred raztapljanjem dodali še 15 g/L agarja. Gojišče smo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Ko se je ohladilo na približno 55 °C, smo ga razlili v sterilne plastične petrijevke.

Za ugotavljanje občutljivost bakterij za antibiotike smo pripravljenemu avtoklaviranemu trdnemu gojišču LB, ohlajenemu na približno 55 °C, dodali ustrezno količino antibiotika (glej **preglednico 4**) in razlili v plastične petrijevke.

Preglednica 4: Koncentracije antibiotikov v gojišču LB.

| ANTIBIOTIK | KONCENTRACIJA |
|----------------------|---------------|
| ampicilin | 100 µg/mL |
| tetraciklin | 10 µg/mL |
| nalidiksična kislina | 5 µg/mL |
| streptomycin | 100 µg/mL |

3.1.2.2 Agar MacConkey

V 1L deionizirane vode smo raztopili 50 g osnove za gojišče agar MacConkey. Gojišče smo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Ko se je gojišče ohladilo na približno 55 °C, smo ga razlili v sterilne plastične petrijevke.

3.1.2.3 Agar »Eosin methylene blue« (EMB)

Za pripravo gojišča EMB smo 37,5 g osnove za gojišče EMB raztopili v 1L deionizirane vode. Gojišče smo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Ko se je gojišče ohladilo na približno 55 °C, smo ga razlili v sterilne plastične petrijevke.

3.1.2.4 UriSelect™ 4

Pri delu smo uporabili že pripravljeno selektivno gojišče UriSelect, ki omogoča rast različnim urinarnim patogenom. Med različnimi vrstami bakterij smo ločili na podlagi oblike in obarvanosti zrastle kolonije. Kolonije *E. coli* so roza barve (Bio-Rad, 2007).

3.1.3 Kemikalije

Biolife Italiana, Milano, Italija

- EMB (Eosin methylene blue agar)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemčija

- agarosa

Fermentas, Vilna, Litva

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

Merck, Darmstadt, Nemčija

- NaCl
- MacConkey agar

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

- Glicerol

SIGMA Chemicals, St. Louis, Missouri, ZDA

- LB (Luria-Broth medium)
- etidijev bromid (10 mg/mL)
- agar-agar
- EDTA

- baza TRIS
- TRIS-HCl
- borova kislina

3.1.4 Encimi

Fermentas, Vilna, Litva

- DNA-polimeraza *Taq* (5 U/μl)

3.1.5 Začetni oligonukleotidi

Jena Bioscience GmbH, Jena, Nemčija

- ERIC 1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3')
- ERIC2 (5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3')
- papG_II r (5'-CGGGCCCCCAAGTAACTCG-3')
- papG_II f (5'-GGGATGAGCGGGCCTTTGAT-3')
- SFA-1 (5'-CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC-3')
- SFA-2 (5'-CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA-3')
- afa/draBC-f (5'-GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC-3')
- afa/draBC-r (5'-CCCGTAACGCGCCAGCATCTC-3')
- hlyA.1 (5'-AACAAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT-3')
- hlyA.2 (5'-ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA-3')
- N6 (5'-ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTGTGT-3')
- N7 (5'-CATCATGTAGTCGGGGCGTAACAAT-3')
- tcpC-for (5'-GGCAACAATATGTATAATATCCT-3')
- tcpC-rev (5'-GCCCAGTCTATTTCTGCTAAAGA-3')
- Ibe10f (5'-AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC-3')
- Ibe10r (5'-TGGTGCTCCGGCAAACCATGC-3')
- FimH1 (5'-CAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTG-3')
- FimH2 (5'-TGCGTACCAGCATTAGCAATGTCC-3')
- fyuA 1 (5'-TGATTAACCCCGCGACGGGAA-3')
- fyuA 2 (5'-CGCAGTAGGCACGATGTTGTA-3')
- ireA f (5'- TGGTCTTCAGCTATATGG-3')
- ireA r (5'-ATCTATGATTGTGTTGGT-3')

- iha f (5'-CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA-3')
- iha r (5'-TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA-3')
- Hbp f (5'-GGTGAAGGTACGCTGACGGT-3')
- Hbp r (5'-GCGTGACGCTGGAGTTATCT-3')
- kpsMT II f (5'-GCGCATTGCTGATACTGTTG-3')
- kpsMT II r (5'-CATCCAGACGATAAGCATGAGCA-3')
- ChuA. 1 (5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3')
- ChuA.2 (5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3')
- YjaA.1 (5'-TGAAGTGTCAGGAGACGCTG-3')
- YjaA.2 (5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3')
- TspE4C2.1 (5'-GAGTAATGTCTGGGGCATTCA-3')
- TspE4C2.2 (5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3')

Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, ZDA

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

3.1.6 Oprema

Oprema, ki smo jo uporabili pri delu:

- rotacijski stresalnik:
 - Infors AG CH-4103 (Bottmingen, Švica),
 - Infors HT (Bottmingen, Švica),
- namizna centrifuga Eppendorf 5424 (Eppendorf, Hamburg, Nemčija),
- aparatura za PCR:
 - GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Ontario, Kanada),
 - Biometra UNO II (Biometra, Gottingen, Nemčija),
- avtomatske pipete Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Nemčija),
- električno mešalo:
 - ROTAMIX 550 MMH (Tehtnica, Železniki, Slovenija),
 - IKA RCT standard (IKA, Nemčija),
- elektroforeza 2301 Macrodrive 1 (LKB Bromma, Stockholm, Švedska),
- UV transiluminator 2011 Macrovue (UV 302 nm) (LKB Bromma, Stockholm, Švedska),
- vroča kopel LBB – »Multi temp II« (Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, ZDA),
- tehtnica KERN PFB (Balingen-Frommern, Nemčija),
- ekonom lonec za avtoklaviranje.

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija in gojenje sevov

V laboratoriju smo s cepilno zanko del vzorca iz vsakega iztrebka prenesli na selektivno gojišče MacConkey in inkubirali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo na gojišču naključno izbrali nekaj rožnatih kolonij in jih ponovno nacepili na gojišče MacConkey do posameznih kolonij. Da bi povečali verjetnost, da je posamezen izolat res produkt ene bakterijske vrste, smo po prekonočni inkubaciji ponovno eno kolonijo prenesli na gojišče LB. Iz gojišča LB smo prenesli eno kolonijo na selektivno gojišče EMB. Če so bile posamezne kolonije na tem gojišču temne z zelenim odleskom, smo sklepali, da smo izolirali *E. coli*. Za preverjanje smo posamezne kolonije napikirali naprej na selektivno gojišče UriSelect, na katerem *E. coli* zraste kot roza kolonija. Da bi potrdili, da so izolirani sevi res vrste *E. coli*, smo naredili še test za indol, ki je pri tej vrsti bakterij pozitiven. Vsa gojišča smo inkubirali preko noči pri 37 °C.

3.2.2 Shranjevanje bakterijske kulture

Za shranjevanje bakterijske kulture smo potrebovali svežo kulturo, zato smo izolat nacepili v tekoče gojišče LB in inkubirali preko noči s stresanjem pri 37 °C. Naslednji dan smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 0,75 mL 30 % glicerola v tekočem gojišču LB in 0,75 mL prekonočne kulture. Vsebino smo premešali in prenesli v kriovialko. Vzorec smo shranili pri –80 °C.

3.2.3 Priprava lizatov

Pripravili smo svežo kulturo v tekočem gojišču LB. 1 mL te prekonočne kulture smo odpipetirali v mikrocentrifugirko in centrifugirali 1 minuto pri 16 000 obratih na minuto. Supernatant smo odlili in s pipeto odstranili preostanek gojišča. Dodali smo 200 µL sterilne deionizirane vode in resuspendirali. Mikrocentrifugirko smo dali v vročo kopel (100 °C) za 10 minut, nato pa smo centrifugirali 10 minut pri 16 000 obratih na minuto. V svežo mikrocentrifugirko smo prenesli 150 µL supernatanta. Pripravljene lizate smo shranili na –80 °C.

3.2.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo je metoda, ki omogoča pomnoževanje odsekov DNA s pomočjo encima DNA-polimeraze. Vključuje tri osnovne korake. Najprej poteče denaturacija genskega materiala s segrevanjem na 90-96 °C. Pri tem razpadejo vodikove vezi v dvojni vijačnici in dobimo enoverižno DNA. Sledi prileganje, ko z znižanjem temperature na 37-55 °C omogočimo povezavo med začetnimi oligonukleotidi in matrico. Temu postopku sledi sinteza z DNA-polimerazo, pri pogojih, ki so optimalni za ta encim. Cikel se večkrat ponovi.

3.2.4.1 ERIC-PCR

Za posamezno reakcijsko zmes (50 µL) smo potrebovali:

- 1 µL začetnega oligonukleotida ERIC 1R (2 pmol/µL),
- 1 µL začetnega oligonukleotida ERIC 2 (2 pmol/µL),
- 1 µL zmes dNTP (10 mM),
- 5 µL 10x pufer za *Taq* – polimerazo,
- 5 µL 25 mM MgCl₂,
- 0,25 µL *Taq* – polimeraza (5 U/µL),
- 26,75 µL sterilne deionizirane vode,
- 10 µL bakterijskega lizata.

Pripravili smo skupno zmes (začetna oligonukleotida, dNTP, pufer, polimeraza) za vse reakcije in jo po 40 µL razdelili v mikrocentrifugirke za PCR. Dodali smo še 10 µL lizata celic.

Uporabili smo naslednji program PCR:

- Začetna denaturacija.....94 °C, 4min
 - Denaturacija.....94 °C, 30 sec
 - Naleganje.....40 °C, 15 sec
 - Pomnoževanje.....72 °C, 5 min
 - Zaključek sinteze DNA.....72 °C, 7 min
- } 35x

3.2.4.2 Določanje filogenetske (pod)skupine

Za posamezno reakcijsko zmes (20 µL) smo potrebovali:

- 1 µl začetnega oligonukleotida ChuA.1 (20 pmol/µl),
- 1 µl začetnega oligonukleotida ChuA.2 (20 pmol/µl),
- 1 µl začetnega oligonukleotida YjaA.1 (20 pmol/µl),
- 1 µl začetnega oligonukleotida YjaA.2 (20 pmol/µl),
- 1 µl začetnega oligonukleotida TspE4C2.1 (20 pmol/µl),
- 1 µl začetnega oligonukleotida TspE4C2.2 (20 pmol/µl),
- 0,4 µl dNTP-jev s koncentracijo 10mM,
- 2 µl pufra za *Taq*-polimerazo,
- 2 µl MgCl₂ s koncentracijo 25 mM,
- 0,5 µl *Taq*-polimeraze (5 U/ µl),
- 6,1 µl sterilne destilirane vode,
- 3 µl celičnega lizata.

Uporabili smo program PCR, ki je naveden v **preglednici 5**.

Preglednica 5: Program PCR za pomnoževanje odsekov DNA za določevanje filogenetskih (pod)skupin.

| Označevalec | Začetni oligonukleotid | Dolžina produkta (bp) | Program | | | Referenca |
|-------------|------------------------|-----------------------|---------|-------|-----|---------------------------|
| <i>chuA</i> | ChuA.1 | 279 | 94 °C | 4 min | 1× | Clermont in sod., 2000 |
| | ChuA.2 | | 94 °C | 30s | | |
| <i>yjaA</i> | YjaA.1 | 211 | 59 °C | 30s | 30× | |
| | YjaA.2 | | 72 °C | 30s | | |
| TSPE4.C2 | TspE4C2.1 | 152 | 72 °C | 5 min | 1× | |
| | TspE4C2.2 | | | | | |

3.2.4.3 Določanje virulentnih dejavnikov

Za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov smo pripravili 25 µl reakcijske mešanice.

Mešanica je vsebovala:

- 0,5 µl posameznih začetnih oligonukleotidov koncentracije 20 pmol/µl,
- 0,5 µl 10 mM dNTP-jev,
- 2,5 µl 10 × pufru za *Taq*-polimerazo z (NH₄)₂SO₄,
- 2,5 µl 25 mM MgCl₂,
- 0,125 µl *Taq*-polimeraze koncentracije 5 U/µl,
- 13,375 µl destilirane sterilne vode,
- 5 µl celičnega lizata.

Za posamezne VD smo uporabili programe PCR, kot so navedeni v **preglednici 6**, ki shematično prikazuje gene za posamezne VD, ki smo jih pomnoževali in tako ugotavljali njihovo prisotnost, zaporedja posameznih uporabljenih oligonukleotidov, velikost produktov in pogoji pomnoževanja z verižno reakcijo s polimerazo ter uporabljene pozitivne kontrole.

Preglednica 6: Programi PCR za pomnoževanje zapisov za VD.

| Tarčni gen | Začetni oligonukleotid | Dolžina produkta (bp) | Program | Referenca |
|--|--------------------------------|-----------------------|---|----------------------------|
| <i>papGII</i> (P-fimbrije) | papG_II r papG_II f | 190 | 95 °C 2,5 min 1× 94 °C 30 sec 55 °C 1 min 25× 72 °C 30 sec 72 °C 7 min 1× | Johnson in Brown, 1996 |
| <i>papGIII</i> (P-fimbrije) | papG_III r papG_III f | 258 | 94 °C 2,5 min 1× 94 °C 30 sec 63 °C 30 sec 25× 72 °C 3 min 72 °C 10 min 1× | Johnson in Brown, 1996 |
| <i>sfaDE</i> (S-fimbrije) | SFA-1 SFA-2 | 408 | 94 °C 3 min 1× 94 °C 2 min 65 °C 1 min 25× 72 °C 2 min 72 °C 10 min 1× | Le Bouguenec in sod., 1992 |
| <i>afa/draBC</i> (Dr-fimbrije) | afa/draBC-r afa/draBC-f | 594 | 95 °C 4 min 1× 94 °C 30 sec 63 °C 30 sec 25× 68 °C 3 min 72 °C 10 min 1× | Johnson in Stell, 2000 |
| <i>cnfI</i> (citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1) | CNF1-1 CNF1-2 | 1295 | 94 °C 4 min 1× 94 °C 1,5 min 59 °C 1,5 min 30× 72 °C 2 min 72 °C 5 min 1× | Kuhar in sod., 1998 |
| <i>hlyA</i> (hemolizin A) | hlyA.1 hlyA.2 | 1177 | 95 °C 2,5 min 1× 94 °C 30 sec 64 °C 30 sec 30× 72 °C 1,5 min 72 °C 7 min 1× | Yamamoto in sod., 1995 |
| <i>usp</i> (uropatogeni specifični protein USP) | N6 N7 | 1000 | 94°C 2,5 min 1× 94°C 30 sec 68°C 1 min 30× 72°C 1 min 72°C 7 min 1× | Nakano in sod., 2001 |
| <i>iucD</i> (aerobaktin) | Aer1 Aer2 | 602 | 94 °C 4,5 min 1× 94 °C 30 sec 62 °C 30 sec 35× 72 °C 50 sec 72 °C 10 min 1× | Yamamoto in sod., 1995 |

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 6: Programi PCR za pomnoževanje zapisov za VD.

| Tarčni gen | Začetni oligonukleotid | Dolžina produkta (bp) | Program | Referenca |
|---|------------------------------|-----------------------|--|--|
| <i>tcpC</i> (protein, ki vsebuje domeno TIR) | tcpC-for tcpC-rev | 386 | 94 °C 4,5 min 1× 94 °C 30 sec 60 °C 30 sec 25× 72 °C 1 min 72 °C 10 min 1× | Starčič Erjavec in sod., 2010 |
| <i>ibeA</i> (invazin) | Ibe10_f IbeA_r | 170 | 94 °C 2,5 min 1× 94 °C 30 sec 63 °C 30 sec 25× 72 °C 3 min 72 °C 10 min 1× | Johnson in Stell, 2000 |
| <i>fimH</i> (fimbrije tipa 1) | FimH1 FimH2 | 461 | 94 °C 2,5 min 1× 94 °C 30 sec 64 °C 30 sec 30× 72 °C 30 sec 72 °C 7 min 1× | Starčič Erjavec in sod., 2011 |
| <i>fyuA</i> (jersiniabaktin) | fyuA 1 fyuA 2 | 785 | 94°C 2,5 min 1× 94°C 30 sec 63°C 30 sec 25× 72°C 3 min 72°C 10 min 1× | Johnson in Stell, 2000; Schubert in sod., 1998 |
| <i>ireA</i> (sideroforni receptor IreA) | ireA f ireA r | 421 | 94 °C 2,5 min 1× 94 °C 30 sec 55 °C 1 min 25× 72 °C 30 sec 72 °C 7 min 1× | Russo in sod., 2001 |
| <i>iha</i> (nehemaglutininski adhezini Iha) | iha f iha r | 827 | 94 °C 4 min 1× 94 °C 30 sec 58 °C 30 sec 30× 72 °C 1 min 72 °C 8 min 1× | Johnson in sod., 2000 |
| <i>hbp</i> (hemoglobin proteaza) | Hbp f Hbp r | 925 | 94 °C 4,5 min 1× 94 °C 30 sec 65 °C 1 min 35× 72 °C 1 min 72 °C 10 min 1× | Starčič Erjavec in sod., 2009 |
| <i>kpsMT</i> (kapsula II) | kpsMT_II f kpsMT_II r | 270 | 94 °C 4,5 min 1× 94 °C 30 sec 64 °C 1 min 25× 72 °C 30 sec 72 °C 7 min 1× | Johnson in Stell, 2000 |

3.2.5 Elektroforeza DNA v agaroznem gelu

Priprava gela: Erlenmajerico s 30 mL 0,5× TBE in ustrezno količino agaroze (glej **preglednico 7**) smo dali v mikrovalovno pečico in jo segrevali toliko časa, da se je agarozna raztopila. Nato smo erlenmajerico ohladili na približno 60 °C. Dodali smo še 1,5 µL 10 mg/mL raztopine etidijevega bromida in premešali. Gel smo razlili v pripravljen nosilec z ustreznim glavnikom in počakali, da gel polimerizira. Gel z nosilcem smo prenesli v elektroforetsko banjico, odstranili glavniček in prelili s preostankom 0,5× TBE.

Preglednica 7: Koncentracije agaroze v gelu glede na velikost pomnoženih fragmentov DNA.

| konc. agaroze v gelu (%) | velikost DNA, ki se uspešno loči (kbp) |
|--------------------------|--|
| 0,3 | 60 – 5 |
| 0,6 | 20 – 1 |
| 0,7 | 10 – 0,8 |
| 0,9 | 7 – 0,5 |
| 1,2 | 6 – 0,4 |
| 1,5 | 4 – 0,2 |
| 2,0 | 3 – 0,1 |

Nanašanje vzorcev: V jamice smo nanesti 5 µl pomnožkov PCR, ki smo jim predhodno dodali nanašalni elektroforezni pufer v razmerju 5:1. Na gel smo nanesti tudi 3 µL raztopine fragmentov DNA znanih velikosti (standardna DNA-lestevica 50-bp, standardna DNA-lestevica 100-bp ali standardna DNA-lestevica 1-kbp).

Potek elektroforeze: Elektroforetsko banjico smo priključili na električno napetost (100 V). Večji fragmenti so v gelu potovali počasneje kot manjši fragmenti. Po končani elektroforezi smo gel presvetili z UV-svetlobo valovne dolžine 302 nm in rezultate slikali.

3.2.6 Občutljivost za antibiotike

Vsak sev smo s cepilno zanko nanesti na trdna LB gojišča z dodanim antibiotikom (ampicilin, tetraciklin, nalidiksična kislina in streptomycin) v ustrezni koncentraciji (**preglednica 4**). Po prekonočni inkubaciji pri 37 °C smo pogledali rast bakterij na vseh štirih gojiščih.

3.2.7 Statistične metode

Za statistično analizo smo uporabili Fischerjev natančni test, s katerim smo ugotavljali statistično značilnost povezav dobljenih rezultatov (Langsrud, 2004). Program je ustrezen za obdelavo številčno manjših vzorcev. Rezultati so statistično značilni, ko je njihova P -vrednost manjša od 0,05. Takrat obstaja povezava med primerjanima podatkom.

4 REZULTATI

4.1 ERIC-PCR

Za vse izolate smo izvedli metodo ERIC-PCR, da smo lahko med izolati razlikovali različne seve. S pomočjo metode ERIC-PCR smo med 80 izolati iz vzorcev medvedov v ujetništvu določili 41 različnih sevov *E. coli*, med 160 izolati iz vzorcev iz narave pa smo izolirali 45 sevov. Skupno smo določili 86 različnih ERIC-profilov. Slika agaroznega gela s pomnožki ERIC-PCR je v **prilogi C1**.

4.2 FILOGENETSKE (POD)SKUPINE

Vse seve smo s pomočjo filogenetskega PCR uvrstili v filogenetske (pod)skupine. Iz **preglednice 8** je razvidno, da je bilo 33 (38 %) od vseh sevov uvrščenih v filogenetsko skupino D, v filogenetsko podskupino D₁ smo uvrstili 24 (28 %) sevov, v filogenetsko podskupino D₂ pa 9 (10 %) sevov. V filogenetsko skupino A smo uvrstili 30 (35 %) sevov, od tega jih je bilo 24 (28 %) v filogenetski podskupini A₀ in 6 (7 %) v filogenetski podskupini A₁. V filogenetsko skupino B1 smo uvrstili 20 (23 %) sevov. Filogenetska skupina B2 je imela najmanj predstavnikov. Dva (2 %) seva sta bila uvrščena v filogenetsko podskupino B2₂, le en (1 %) sev pa v filogenetsko podskupino B2₃.

Ob primerjavi zastopanosti sevov iz narave in živalskega vrta v filogenetskih (pod)skupinah smo opazili večje razlike pri sevih iz filogenetske skupine A in B1. V filogenetsko skupino B1 smo uvrstili 3 (7 %) seve iz živalskega vrta in 17 (38 %) sevov iz narave. Da so sevi filogenetske skupine B1 statistično značilno povezani z medvedi iz narave, potrjuje izračunana *P*-vrednost (0,0008). Statistično značilno razliko smo ugotovili tudi pri sevih iz filogenetske skupine A, v kateri je bilo 22 (54 %) sevov iz živalskega vrta in le 8 (18 %) sevov iz narave. Razlike se kažejo pri filogenetski podskupini A₁, kamor smo uvrstili kar 6 (15 %) sevov iz živalskega vrta, sevi iz narave pa niso imeli nobenega predstavnika v tej skupini. Izračunana *P*-vrednost je 0,0096 in kaže, da je razlika statistično značilna. Obstaja torej povezava med virom vzorca in to filogenetsko podskupino. To velja tudi za filogenetsko podskupino A₀, kjer so rezultati prav tako statistično značilni. V to

skupino smo uvrstili 16 (39 %) sevov iz živalskega vrta in le 8 (18 %) sevov iz narave. Pri ostalih filogenetskih (pod)skupinah je bil delež sevov iz obeh okolij podoben, kar je razvidno tudi iz izračunanih *P*-vrednostih (**preglednici 8**), tako da nobena od teh filogenetskih (pod)skupin ni značilno povezana z določenim okoljem ($P > 0,05$).

Preglednica 8: Primerjava števila sevov iz narave in živalskega vrta po filogenetskih (pod)skupinah.

| Filogenetska (pod)skupina | št. sevov (%) | | | <i>P</i> -vrednost |
|------------------------------|---------------|----------|----------|-----------------------|
| | sevi DB | zoo | narava | |
| A | 30 (35) | 22 (54) | 8 (18) | 0,0006 |
| A ₀ | 24 (28) | 16 (39) | 8 (18) | 0,033 |
| A ₁ | 6 (7) | 6 (15) | 0 (0) | 0,0096 |
| B1 | 20 (23) | 3 (7) | 17 (38) | (0,0008) ^a |
| B2 | 3 (3) | 2 (5) | 1 (2) | 0,6034 |
| B2 ₂ | 2 (2) | 2 (5) | 0 (0) | 0,2243 |
| B2 ₃ | 1 (1) | 0 (0) | 1 (2) | 1 |
| D | 33 (38) | 14 (34) | 19 (42) | 0,5088 |
| D ₁ | 24 (28) | 9 (22) | 15 (33) | 0,3361 |
| D ₂ | 9 (10) | 5 (12) | 4 (9) | 0,7309 |
| skupaj | 86 (100) | 41 (100) | 45 (100) | 1 |

Opomba: Statistično značilni rezultati so obarvani rumeno.

^a Statistično značilne *P*-vrednosti, ki nakazujejo na povezavo sevov določene filogenetske (pod)skupine s skupino sevov iz narave, so prikazane v oklepaju ().

4.3 VIRULENTNI DEJAVNIKI

4.3.1 Prevalenca virulentnih dejavnikov

Preverili smo prisotnost 16 pogostih zapisov za virulentne dejavnike. Kot je razvidno iz **preglednice 9**, smo za 6 od testiranih zapisov našli seve, ki so jih vsebovali. Vsi pridobljeni podatki so v **prilogi A**.

Pri sevih DB je bil najpogosteje prisoten gen *fimH*, ki smo ga našli pri kar 62 (72 %) vseh sevov. Pogost je bil tudi zapis *kpsMT*, ki ga je imelo 37 (43 %) sevov. Gen *ibeA* je bil prisoten pri 14 (16 %) sevih, gen *fyuA* pa pri 18 (21 %) sevih. Manj pogosto smo našli gena *usp* in *iucD*. Zapis *usp* je imelo 6 (7 %) sevov, zapis *iucD* pa le dva (2 %) seva.

Prisotnost določenih genov za virulentne dejavnike glede na vir vzorca je bila za oba vira vzorca podobna. Več kot 70 % vseh sevov iz narave je imelo zapis *fimH*, enako velja za seve iz živalskega vrta. Sevi iz narave so imeli podobno pojavnost zapisa *kpsMT* kot sevi iz živalskega vrta. Največja odstopanja so pri zapisu *usp*. Ta zapis je imelo 5 (12 %) sevov iz živalskega vrta in le en (2 %) sev iz narave. Vendar ta razlika ni statistično značilna ($P > 0,05$). To pomeni, da ne obstaja povezava med virom vzorca in zapisom za VD.

Preglednica 9: Število sevov iz narave in živalskega vrta, ki ima zapis za posamezen VD.

| virulentni dejavnik | št. sevov (%) | | | P-vrednost |
|---------------------|---------------|---------|---------|------------|
| | sevi DB | zoo | narava | |
| <i>usp</i> | 6 (7) | 5 (12) | 1 (2) | 0,0986 |
| <i>iucD</i> | 2 (2) | 0 (0) | 2 (4) | 0,4952 |
| <i>ibeA</i> | 14 (16) | 8 (20) | 6 (13) | 0,5616 |
| <i>fimH</i> | 62 (72) | 30 (73) | 32 (71) | 1 |
| <i>fyuA</i> | 18 (21) | 12 (29) | 6 (13) | 0,1101 |
| <i>kpsMT</i> | 37 (43) | 18 (44) | 19 (42) | 1 |

Pri sevih DB nismo našli genov *papGII*, *papGIII*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *cnfI*, *hlyA*, *tcpC*, *ireA*, *iha* in *hbp*.

4.3.2 Primerjava sevov iz narave in živalskega vrta po filogenetskih (pod)skupinah za posamezne gene

Pri sevih iz filogenetske skupine D obstaja povezava med virom seva in zapisom *usp*. Kot prikazuje **preglednica 10** so bili v to skupino uvrščeni 4 (29 %) sevi iz živalskega vrta, sevi iz narave pa tu niso imeli nobenega predstavnika.

V filogenetski skupini D je bilo le 6 (43 %) sevov iz živalskega vrta z zapisom *kpsMT* in kar 16 (84 %) sevov iz narave. Da so bili sevi filogenetske skupine D z zapisom *kpsMT* statistično značilno povezani z medvedi iz narave, potrjuje izračunana *P*-vrednost (0,024). Večji delež sevov iz narave je bil tudi pri sevih iz filogenetske podskupine D₂ z zapisom *kpsMT*. V tej skupini so bili 3 (75 %) sevi iz narave in nobenega seva iz živalskega vrta.

Preglednica 10: Primerjava sevov iz narave in živalskega vrta po filogenetskih (pod)skupinah za posamezne gene.

| filogen. (pod)sk. | vir seva | št. sevov (%) | | | | | |
|----------------------|----------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------------|
| | | <i>usp</i> | <i>iucD</i> | <i>ibeA</i> | <i>fimH</i> | <i>fyuA</i> | <i>kpsMT</i> |
| A | sevi DB | 1 (3) | | 6 (20) | 19 (63) | 8 (27) | 15 (50) |
| | zoo | 0 (0) | | 5 (23) | 14 (64) | 7 (32) | 12 (55) |
| | narava | 1 (12) | | 1 (12) | 5 (62) | 1 (12) | 3 (37) |
| | <i>P</i> | 0,2667 | | 1 | 1 | 0,3911 | 0,6817 |
| A ₀ | sevi DB | 1 (4) | | 6 (25) | 14 (58) | 6 (25) | 12 (50) |
| | zoo | 0 (0) | | 5 (31) | 9 (56) | 5 (31) | 9 (56) |
| | narava | 1 (12) | | 1 (12) | 5 (62) | 1 (12) | 3 (37) |
| | <i>P</i> | 0,3333 | | 0,6214 | 1 | 0,6214 | 0,6668 |
| A ₁ | sevi DB | | | | 5 (83) | 2 (33) | 3 (50) |
| | zoo | | | | 5 (83) | 2 (33) | 3 (50) |
| | narava | | | | n. s. | n. s. | n. s. |
| | <i>P</i> | | | | – | – | – |
| B1 | sevi DB | 1 (5) | 2 (10) | | 20 (100) | 3 (15) | |
| | zoo | 1 (33) | 0 (0) | | 3 (100) | 0 (0) | |
| | narava | 0 (0) | 2 (12) | | 17 (100) | 3 (18) | |
| | <i>P</i> | 0,15 | 1 | | 1 | 1 | |
| B2 | sevi DB | | | 1 (33) | 3 (100) | 1 (33) | |
| | zoo | | | 0 (0) | 2 (100) | 0 (0) | |
| | narava | | | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | |
| | <i>P</i> | | | 0,3333 | 1 | 0,3333 | |
| B2 ₂ | sevi DB | | | | 2 (100) | | |
| | zoo | | | | 2 (100) | | |
| | narava | | | | n. s. | | |
| | <i>P</i> | | | | – | | |
| B2 ₃ | sevi DB | | | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | |
| | zoo | | | n. s. | n. s. | n. s. | |
| | narava | | | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | |
| | <i>P</i> | | | – | – | – | |
| D | sevi DB | 4 (12) | | 7 (21) | 20 (61) | 6 (18) | 22 (67) |
| | zoo | 4 (29) | | 3 (21) | 11 (79) | 5 (36) | 6 (43) |
| | narava | 0 (0) | | 4 (21) | 9 (47) | 1 (5) | 16 (84) |
| | <i>P</i> | 0,0245 | | 1 | 0,0873 | 0,0616 | (0,024) ^a |
| D ₁ | sevi DB | 1 (4) | | 7 (29) | 11 (46) | 2 (8) | 19 (79) |
| | zoo | 1 (11) | | 3 (33) | 6 (67) | 2 (22) | 6 (67) |
| | narava | 0 (0) | | 4 (27) | 5 (33) | 0 (0) | 13 (87) |
| | <i>P</i> | 0,375 | | 1 | 0,206 | 0,1304 | 0,3256 |
| D ₂ | sevi DB | 3 (33) | | | 9 (100) | 4 (44) | 3 (33) |
| | zoo | 3 (60) | | | 5 (100) | 3 (60) | 0 (0) |
| | narava | 0 (0) | | | 4 (100) | 1 (25) | 3 (75) |
| | <i>P</i> | 0,1667 | | | 1 | 0,5238 | (0,0476) |

Opomba: n. s. - v tej skupini ni bilo seva; – - v filogenetski (pod)skupini ni sevov, zato je primerjava nesmiselna. Statistično značilni rezultati so obarvani rumeno.

^a Statistično značilne *P*-vrednosti, ki nakazujejo na povezavo sevov določene filogenetske (pod)skupine in določenim zapisom za VD s skupino sevov iz narave, so prikazane v oklepaju ().

4.3.3 Število zapisov za virulentni dejavnik za posamezno filogenetsko (pod)skupino pri sevih iz narave in živalskega vrta

Vsi sevi so imeli vsaj en zapis za VD in največ tri. Več kot polovica sevov DB je imela zapis za 1 VD, 31 (36 %) sevov je imelo zapis za dva in 11 (13 %) sevov za tri VD. Kot je razvidno iz **preglednice 11**, je imelo kar 27 (60 %) sevov iz narave zapis za en VD, delež takšnih sevov iz živalskega vrta je bil nekoliko manjši, našli smo jih le 17 (41 %). Imeli pa so več zapisov za dva ali tri VD kot sevi iz narave, vendar so podatki vseeno statistično neznačilni ($P > 0,05$). Povezave med virom vzorca in številom VD nismo opazili. Tudi ko smo primerjali deleže sevov po posameznih filogenetskih (pod)skupinah, nismo opazili večjih razlik. Izjema so bili sevi iz filogenetske skupine D, ki so imeli 3 zapise za VD od iskanih. V to skupino je bilo uvrščenih 5 (36 %) sevov iz živalskega vrta in noben sev iz narave. V filogenetski skupini D₂₃ so bili 4 (100 %) sevi iz živalskega vrta z 2 zapisoma za VD in noben tak sev iz narave. Da so sevi filogenetske podskupine D₂₃ z dvema zapisoma za VD statistično značilno povezani z medvedmi iz narave, potrjuje izračunana P -vrednost (0,0079).

Povprečno so imeli sevi DB 1,6 zapisa za VD od iskanih. Sevi iz filogenetske skupine B1 so imeli povprečno le 1,3 zapisa za VD, sevi iz filogenetske skupine A 1,6 zapisa za VD, sevi iz filogenetske skupine D so povprečno imeli 1,8 zapisa za VD od iskanih. Zaradi majhnega števila sevov v filogenetski skupini B2 je izračun povprečnega števila VD na sev nesmiseln. Povprečno so imeli sevi iz ujetništva nekoliko več zapisov za VD (1,8) kot sevi iz narave (1,5).

Preglednica 111: Število zapisov za VD za posamezno filogenetsko (pod)skupino pri sevih iz narave in živalskega vrta.

| filogenetske (pod)skupine | št. VD | št. sevov (%) | | | P-vrednost |
|---------------------------|------------|---------------|---------|---------|---------------------|
| | | sevi DB | zoo | narava | |
| A | 1 | 14 (47) | 9 (41) | 5 (62) | 0,4171 |
| | 2 | 13 (43) | 10 (45) | 3 (38) | 1 |
| | 3 | 3 (10) | 3 (14) | 0 (0) | 0,5448 |
| | št. VD/sev | 1,6 | 1,7 | 1,4 | |
| A ₀ | 1 | 12 (50) | 7 (44) | 5 (62) | 0,6668 |
| | 2 | 9 (37) | 6 (37) | 3 (38) | 1 |
| | 3 | 3 (13) | 3 (19) | 0 (0) | 0,5257 |
| | št. VD/sev | 1,6 | 1,8 | 1,4 | |
| A ₁ | 1 | 2 (33) | 2 (33) | 0 (0) | – |
| | 2 | 4 (67) | 4 (67) | 0 (0) | – |
| | št. VD/sev | 1,7 | 1,7 | n. s. | |
| B1 | 1 | 16 (80) | 2 (67) | 14 (82) | 0,5088 |
| | 2 | 2 (10) | 1 (33) | 1 (6) | 0,2842 |
| | 3 | 2 (10) | 0 (0) | 2 (12) | 1 |
| | št. VD/sev | 1,3 | 1,3 | 1,3 | |
| B2 | 1 | 2 (67) | 2 (100) | 0 (0) | 0,3333 |
| | 2 | 1 (33) | 0 (0) | 1 (100) | 0,3333 |
| | št. VD/sev | 1,7 | 1 | 3 | |
| B2 ₂ | 1 | 2 (100) | 2 (100) | 0 (0) | – |
| | št. VD/sev | 1 | 1 | n. s. | |
| B2 ₃ | 3 | 1 (100) | 0 (0) | 1 (100) | – |
| | št. VD/sev | 3 | n. s. | 3 | |
| D | 1 | 12 (37) | 4 (28) | 8 (42) | 0,4861 |
| | 2 | 16 (48) | 5 (36) | 11 (58) | 0,296 |
| | 3 | 5 (15) | 5 (36) | 0 (0) | 0,0084 |
| | št. VD/sev | 1,8 | 2,1 | 1,6 | |
| D ₁ | 1 | 10 (42) | 2 (22) | 8 (53) | 0,2099 |
| | 2 | 12 (50) | 5 (56) | 7 (47) | 1 |
| | 3 | 2 (8) | 2 (22) | 0 (0) | 0,1304 |
| | št. VD/sev | 1,7 | 2 | 1,5 | |
| D ₂ | 1 | 2 (22) | 2 (40) | 0 (0) | 0,4444 |
| | 2 | 4 (45) | 0 (0) | 4 (100) | 0,0079 ^a |
| | 3 | 3 (33) | 3 (60) | 0 (0) | 0,1667 |
| | št. VD/sev | 2,1 | 2,2 | 2 | |
| skupaj | 1 | 44 (51) | 17 (41) | 27 (60) | 0,1302 |
| | 2 | 31 (36) | 16 (39) | 15 (33) | 0,6557 |
| | 3 | 11 (13) | 8 (20) | 3 (7) | 0,1073 |
| | št. VD/sev | 1,6 | 1,8 | 1,5 | |

Opomba: n. s. - v tej skupini ni bilo seva; – - v filogenetski (pod)skupini ni sevov, zato je primerjava nesmiselna. Statistično značilni rezultati so obarvani rumeno.

^a Statistično značilne P-vrednosti, ki nakazujejo na povezavo sevov določene filogenetske (pod)skupine in določenim številom zapisov za VD s skupino sevov iz narave, so prikazane v oklepaju ().

4.4 PRIMERJAVA MED SEVI DB IN SEVI BJ

4.4.1 Filogenetske (pod)skupine

Kot je razvidno iz **preglednice 12** je bila zastopanost posameznih filogenetskih (pod)skupin podobna glede na vir sevov. Rezultati so bili statistično značilni pri filogenetski podskupini A₀ ($P = 0,006$). V tej skupini je bilo 24 (28 %) sevov DB izoliranih iz prebavnega trakta medvedov in le 7 (8 %) sevov BJ izoliranih iz prebavnega trakta ljudi. Največje razlike smo opazili v zastopanosti filogenetske podskupine B₂₃, v kateri je bilo 29 (32 %) sevov BJ in le 1 (1 %) sev DB. Da so bili sevi filogenetske podskupine B₂₃ statistično značilno povezani s sevi BJ, potrjuje izračunana P -vrednost ($P = 0$). Prav tako so bili sevi celotne filogenetske skupine B₂ statistično značilno povezani ($P = 0$). V tej skupini je bilo 30 (33 %) sevov BJ in le 3 (3 %) sevi DB.

Rezultati so bili statistično neznačilni za filogenetske skupine A, B₁ in D, v katerih je bil podoben delež sevov BJ in sevov DB ($P > 0,05$). Statistično neznačilni so bili tudi rezultati za filogenetske podskupine A₁, B₂₂, D₁ in D₂ kjer nismo opazili povezave med virom seva in filogenetsko podskupino.

Preglednica 12: Primerjava števila sevov BJ in sevov DB po filogenetskih (pod)skupinah.

| filogenetska (pod)skupina | št. sevov (%) | | P -vrednost |
|------------------------------|---------------|----------|------------------|
| | sevi DB | sevi BJ | |
| A | 30 (35) | 20 (22) | 0,0682 |
| A ₀ | 24 (28) | 7 (8) | 0,0006 |
| A ₁ | 6 (7) | 13 (14) | 0,1457 |
| B1 | 20 (23) | 13 (14) | 0,1762 |
| B2 | 3 (3) | 30 (33) | (0) ^a |
| B ₂₂ | 2 (2) | 1 (1) | 0,6144 |
| B ₂₃ | 1 (1) | 29 (32) | (0) |
| D | 33 (38) | 27 (30) | 0,2679 |
| D ₁ | 24 (28) | 21 (23) | 0,4956 |
| D ₂ | 9 (10) | 6 (7) | 0,4257 |
| skupaj | 86 (100) | 90 (100) | 1 |

Opomba: Statistično značilni rezultati so obarvani rumeno.

^a Statistično značilne P -vrednosti, ki nakazujejo na povezavo sevov določene filogenetske (pod)skupine s skupino BJ, so prikazane v oklepaju ().

4.4.2 Prevalenca virulentnih dejavnikov pri sevih DB in BJ

Preglednica 13 prikazuje pogostost pojavljanja VD pri sevih DB in BJ. Sevi BJ so imeli več zapisov za VD kot sevi DB. Povezave med virom vzorca in vrsto VD smo opazili pri sevih z zapisi *usp*, *iucD*, *ibeA*, *fimH* in *fyuA* ($P < 0,05$), ki so statistično značilno povezani s sevi zbirke BJ. Pri sevih BJ so se ti zapisi pojavljali pogosteje. Prisotnost genov *ibeA* in *kpsMT* pri sevih DB in sevih BJ ni pokazala povezave med virom vzorca. Rezultati niso statistično značilni.

Preglednica 13: Prevalenca virulentnih dejavnikov pri sevih DB in BJ.

| Virulentni dejavnik | št. sevov (%) | | P-vrednost |
|---------------------|---------------|---------|-----------------------|
| | DB | BJ | |
| <i>papGII</i> | 0 (0) | 7 (8) | (0,0139) ^a |
| <i>papGIII</i> | 0 (0) | 3 (3) | 0,2461 |
| <i>sfaDE</i> | 0 (0) | 15 (17) | (0) |
| <i>afa/draBC</i> | 0 (0) | 4 (4) | 0,1211 |
| <i>cnfI</i> | 0 (0) | 5 (6) | 0,0593 |
| <i>hlyA</i> | 0 (0) | 7 (8) | (0,014) |
| <i>usp</i> | 6 (7) | 22 (24) | (0,0018) |
| <i>iucD</i> | 2 (2) | 35 (39) | (0) |
| <i>tcpC</i> | 0 (0) | 7 (8) | (0,014) |
| <i>ibeA</i> | 14 (16) | 12 (13) | 0,6726 |
| <i>fimH</i> | 62 (72) | 79 (88) | (0,0134) |
| <i>fyuA</i> | 18 (21) | 59 (66) | (0,0003) |
| <i>ireA</i> | 0 (0) | 18 (20) | (0) |
| <i>iha</i> | 0 (0) | 35 (39) | (0) |
| <i>hbp</i> | 0 (0) | 5 (6) | 0,0593 |
| <i>kpsMT</i> | 37 (43) | 52 (58) | 0,07 |

Opomba: Statistično značilni rezultati so obarvani rumeno.

^a Statistično značilne P-vrednosti, ki nakazujejo na povezavo sevov z zapisom za VD s skupino BJ, so prikazane v oklepaju ().

4.4.3 Primerjava sevov DB in sevov BJ po filogenetskih (pod)skupinah za posamezne gene

Kot prikazuje **preglednica 14** je kar 7 (21 %) sevov DB iz filogenetske skupine D imelo zapis *ibeA*, sevi BJ niso imeli predstavnika v tej skupini. Prav tako so podatki statistično značilni za seve iz filogenetske podskupine D₁ z zapisom *ibeA* ($P = 0,0102$).

Druge statistično značilne P -vrednosti ($P < 0,05$) prikazujejo, da so sevi določene filogenetske (pod)skupine, ki imajo določen zapis za VD, statistično značilno povezani s sevi BJ. Največ razlik med skupinama sevov BJ in DB je bilo pri sevih iz filogenetske skupine D. Primerjava sevov iz filogenetske podskupine D₁, ki so imeli zapis *iucD*, *ibeA*, *fimH*, *fyuA*, *ireA* in *iha* je pokazala, da obstaja povezava med virom vzorca in takimi sevi. Povezava prav tako obstaja za seve iz filogenetske skupine A, ki so imeli zapis *iucD*, *ireA* in *iha*, namreč le sevi BJ imajo predstavnike v teh skupinah. Zapis *iucD* je imelo 8 (40 %) sevov BJ in noben sev DB, zapis *ireA* so imeli 4 (20 %) sevi BJ in noben sev DB, zapis *iha* je imelo 5 (25 %) sevov BJ in noben sev DB. V filogenetsko podskupino A₀ smo uvrstili 3 (43 %) seve BJ z zapisom *iucD*, sevov DB ni bilo v tej skupini. Da so sevi filogenetske skupine A z zapisom *iucD* statistično značilno povezani s sevi BJ, potrjuje izračunana P -vrednost (0,0078). Enako velja za seve iz filogenetske skupine B₁, ki so imeli zapis *iha*. Taki so bili le 4 (31 %) sevi BJ. V filogenetski skupini B₂ so bile statistično značilne razlike med sevi z zapisi *fyuA* in *kpsMT*, namreč zapis *fyuA* je imel le 1 (33 %) sev DB in kar 29 (97 %) sevov BJ in zapis *kpsMT* je imelo 28 (93 %) sevov BJ in noben sev DB. Polovica sevov BJ iz filogenetske podskupine D₂ je imelo zapis *hbp*, medtem ko sevi DB niso imeli predstavnika v tej skupini. V večini primerov, kjer so bili podatki statistično značilni, je bil delež sevov BJ večji kot delež sevov DB.

Barbič D. Virulentni dejavniki sevov bakterije *Escherichia coli* izoliranih iz blata prostoživečih medvedov in medvedov v ujetništvu.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2012

Preglednica 14: Primerjava sevov DB in BJ po filogenetskih (pod)skupinah za posamezne gene.

| filogen. (pod)sk. | vir seva | št. sevov (%) | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-------------|---------------|----------------|--------------|------------------|-------------|-------------|------------|-----------------------------|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | | <i>papGII</i> | <i>papGIII</i> | <i>sfaDE</i> | <i>afa/draBC</i> | <i>cnfI</i> | <i>hlyA</i> | <i>usp</i> | <i>iucD</i> | <i>tcpC</i> | <i>ibeA</i> | <i>fimH</i> | <i>fyuA</i> | <i>ireA</i> | <i>iha</i> | <i>hbp</i> | <i>kpsMT</i> |
| A | DB | | | | 0 (0) | | | 1 (3) | 0 (0) | | 6 (20) | 19 (63) | 8 (27) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 15 (50) |
| | BJ | | | | 1 (5) | | | 0 (0) | 8 (40) | | 0 (0) | 15 (75) | 7 (35) | 4 (20) | 5 (25) | 1 (5) | 9 (45) |
| | P | | | | 0,4 | | | 1 | (0,0002)^a | | 0,0691 | 0,5382 | 0,5467 | (0,021) | (0,0073) | 0,4 | 0,779 |
| A ₀ | DB | | | | | | | 1 (4) | 0 (0) | | 6 (25) | 14 (58) | 6 (25) | 0 (0) | 0 (0) | | 12 (50) |
| | BJ | | | | | | | 0 (0) | 3 (43) | | 0 (0) | 7 (100) | 1 (14) | 1 (14) | 1 (14) | | 5 (71) |
| | P | | | | | | | 1 | (0,0078) | | 0,2928 | 0,0661 | 1 | 0,2258 | 0,2258 | | 0,4117 |
| A ₁ | DB | | | | 0 (0) | | | | 0 (0) | | | 5 (83) | 2 (33) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 3 (50) |
| | BJ | | | | 1 (8) | | | | 5 (38) | | | 8 (62) | 6 (46) | 3 (23) | 4 (31) | 1 (8) | 4 (31) |
| | P | | | | 1 | | | | 0,128 | | | 0,6047 | 1 | 0,517 | 0,2554 | 1 | 0,6169 |
| B1 | DB | | | | | | | 1 (5) | 2 (10) | | | 20 (100) | 3 (15) | | 0 (0) | | 0 (0) |
| | BJ | | | | | | | 0 (0) | 0 (0) | | | 13 (100) | 6 (46) | | 4 (31) | | 2 (15) |
| | P | | | | | | | 1 | 0,5076 | | | 1 | 0,1067 | | (0,0175) | | |
| B2 | DB | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (33) | 3 (100) | 1 (33) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| | BJ | 4 (13) | 3 (10) | 15 (50) | | 5 (17) | 6 (20) | 18 (60) | 16 (53) | 7 (23) | 12 (40) | 26 (87) | 29 (97) | 8 (27) | 11 (37) | 3 (10) | 28 (93) |
| | P | 1 | 1 | 0,233 | | 1 | 1 | 0,0834 | 0,2273 | 1 | 1 | 1 | (0,0167) | 0,5601 | 0,5343 | 1 | (0,0018) |
| B2 ₂ | DB | | | | | | | | | | | 2 (100) | | | | | |
| | BJ | | | | | | | | | | | 1 (100) | | | | | |
| | P | | | | | | | | | | | 1 | | | | | |
| B2 ₃ | DB | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| | BJ | 4 (14) | 3 (10) | 15 (52) | | 5 (17) | 6 (21) | 18 (62) | 16 (55) | 7 (24) | 12 (41) | 25 (86) | 29 (100) | 8 (28) | 11 (38) | 3 (10) | 28 (97) |
| | P | 1 | 1 | 1 | | 1 | 1 | 0,4 | 0,4667 | 1 | 0,4333 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,0667 |
| D | DB | 0 (0) | | | 0 (0) | | 0 (0) | 4 (12) | 0 (0) | | 7 (21) | 20 (61) | 6 (18) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 22 (67) |
| | BJ | 3 (11) | | | 3 (11) | | 1 (4) | 4 (15) | 11 (41) | | 0 (0) | 25 (93) | 17 (63) | 6 (22) | 15 (56) | 1 (4) | 13 (48) |
| | P | 0,0855 | | | 0,0855 | | 0,45 | 1 | (0) | | (0,0134) | (0,0062) | (0,0005) | (0,0059) | (0) | 0,45 | 0,1915 |
| D ₁ | DB | 0 (0) | | | 0 (0) | | | 1 (4) | 0 (0) | | 7 (29) | 11 (46) | 2 (8) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 19 (79) |
| | BJ | 3 (14) | | | 2 (9) | | | 3 (14) | 9 (43) | | 0 (0) | 19 (90) | 13 (62) | 5 (24) | 12 (57) | 1 (5) | 12 (57) |
| | P | 0,0937 | | | 0,2121 | | | 0,3257 | (0,0003) | | (0,0102) | (0,0018) | (0,0003) | (0,0167) | (0) | 0,4667 | 0,1961 |
| D ₂ | DB | | | | 0 (0) | | 0 (0) | 3 (33) | 0 (0) | | | 9 (100) | 4 (44) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 3 (33) |
| | BJ | | | | 1 (17) | | 1 (17) | 1 (17) | 2 (33) | | | 6 (100) | 4 (46) | 1 (17) | 1 (17) | 3 (50) | 1 (17) |
| | P | | | | 0,4 | | 0,4 | 0,6044 | 0,1429 | | | 1 | 0,6084 | 0,4 | 0,4 | (0,044) | 0,6044 |

Opomba: Statistično značilni rezultati so obarvani rumeno.

^a Statistično značilne *P*-vrednosti, ki nakazujejo na povezavo sevov z določeno filogenetsko (pod)skupino s skupino BJ in imajo določen VD, so prikazane v oklepaju ().

4.4.4 Število zapisov za virulentni dejavnik pri sevih DB in sevih BJ

Povprečno je imel en sev DB 1,6 zapisa za VD, medtem ko je imel sev BJ povprečno 4,1 zapise za VD. Ob primerjavi sevov iz obeh okolij smo opazili, da je kar veliko razlik v številu VD (glej **preglednico 15**). Sevi DB so imeli vsaj en zapis in največ tri zapise za VD, sevi BJ so imeli teh zapisov več, do 10. Rezultati statistično niso značilni le pri sevih, ki niso imeli zapisa za VD, pri sevih s tremi, devetimi in desetimi zapisi za VD. Velika razlika je bila med sevi z dvema zapisoma za VD. V tej skupini je bilo kar 31 (36 %) vseh sevov DB in le 3 (3 %) sevi BJ. Med virom seva in dvema zapisoma za VD obstaja povezava ($P < 0,05$). Iz **preglednice 15** je razvidno, da so sevi s številom VD 1 ali 2 statistično značilno povezani s sevi DB in tisti s 4 in več VD s sevi BJ.

Preglednica 15: Število zapisov za VD pri sevih DB in sevih BJ

| št. VD | št. sevov (%) | | P-vrednost |
|-------------------|---------------|---------|-----------------------|
| | DB | BJ | |
| 0 | 0 (0) | 1 (1) | 1 |
| 1 | 44 (51) | 22 (24) | 0,0003 |
| 2 | 31 (36) | 3 (3) | 0 |
| 3 | 11 (13) | 15 (17) | 0,5278 |
| 4 | 0 (0) | 13 (14) | (0,0002) ^a |
| 5 | 0 (0) | 11 (12) | (0,0007) |
| 6 | 0 (0) | 6 (7) | (0,0289) |
| 7 | 0 (0) | 8 (9) | (0,0067) |
| 8 | 0 (0) | 7 (8) | (0,014) |
| 9 | 0 (0) | 3 (3) | 0,2461 |
| 10 | 0 (0) | 1 (1) | 1 |
| št. VD/sev | 1,6 | 4,1 | |

Opomba: Statistično značilni rezultati so obarvani rumeno.

^a Statistično značilne P-vrednosti, ki nakazujejo na povezavo sevov z določenim številom VD s skupino BJ, so prikazane v oklepaju ().

4.4.5 Število zapisov za virulentni dejavnik za posamezno filogenetsko (pod)skupino pri sevih DB in sevih BJ

Preglednica 16 prikazuje število zapisov za VD za posamezno filogenetsko (pod)skupino pri sevih DB in BJ. V filogenetski skupini A so bili podatki statistično značilni za seve z dvema zapisoma za VD. Takih sevov DB je bilo kar 13 (43 %), medtem ko sevi BJ niso imeli predstavnika v tej skupini. V filogenetski podskupini A₁ z 2 zapisoma za VD so bili 4 (67 %) sevi DB, in nobenega seva BJ. Delež sevov DB iz filogenetske skupine B2 z 1 zapisom za VD je prav tako statistično večji od deleža sevov BJ. V tej skupini sta 2 (67 %) seva DB in 1 (3%) sev BJ. Statistično večjo prevalenco sevov DB smo opazili pri sevih iz filogenetske skupine D z 2 zapisoma za VD, kjer je bilo 16 (49 %) takih sevov DB in le 2 (7 %) seva BJ. Podobne rezultate smo dobili pri sevih iz filogenetske podskupine D₁ z 2 zapisoma za VD. Polovica sevov iz filogenetske skupine D₁ je imelo 2 zapisa za VD, sevi BJ niso imeli predstavnika v tej skupini.

Druge statistično značilne *P*-vrednosti ($P < 0,05$) prikazujejo, da so sevi določene filogenetske (pod)skupine, ki imajo določeno število zapisov za VD, statistično značilno povezani s sevi BJ.

Preglednica 16: Število zapisov za VD za posamezno filogenetsko (pod)skupino pri sevih DB in sevih BJ.

| filogen. (pod)sk. | vir seva | št. VD | | | | | | | | | | |
|----------------------|-------------|--------|---------|---------|----------|----------------------|----------|--------|--------|--------|--------|-------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| A | DB | 0 (0) | 14 (47) | 13 (43) | 3 (10) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | | | | |
| | BJ | 1 (5) | 8 (40) | 0 (0) | 5 (25) | 4 (20) | 1 (5) | 1 (5) | | | | |
| | <i>P</i> | 0,4 | 0,7734 | 0,0006 | 0,24 | (0,021) ^a | 0,4 | 0,4 | | | | |
| A₀ | DB | | 12 (50) | 9 (38) | 3 (12) | 0 (0) | | | | | | |
| | BJ | | 2 (29) | 0 (0) | 4 (57) | 1 (14) | | | | | | |
| | <i>P</i> | | 0,4117 | 0,0766 | (0,0292) | 0,2258 | | | | | | |
| A₁ | DB | 0 (0) | 2 (33) | 4 (67) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | | | | |
| | BJ | 1 (8) | 6 (46) | 0 (0) | 1 (8) | 3 (23) | 1 (8) | 1 (8) | | | | |
| | <i>P</i> | 1 | 1 | 0,0039 | 1 | 0,517 | 1 | 1 | | | | |
| B₁ | DB | | 16 (80) | 2 (10) | 2 (10) | 0 (0) | | | | | | |
| | BJ | | 7 (54) | 1 (8) | 4 (31) | 1 (8) | | | | | | |
| | <i>P</i> | | 0,1393 | 1 | 0,1824 | 0,3939 | | | | | | |
| B₂ | DB | | 2 (67) | | 1 (33) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| | BJ | | 1 (3) | | 1 (3) | 4 (13) | 4 (13) | 4 (13) | 6 (20) | 6 (20) | 3 (10) | 1 (3) |
| | <i>P</i> | | 0,0167 | | 0,1761 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| B₂ | DB | | 2 (100) | | | | | | | | | |
| | BJ | | 1 (100) | | | | | | | | | |
| | <i>P</i> | | 1 | | | | | | | | | |
| B₂ | DB | | | | 1 (100) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| | BJ | | | | 1 (3) | 4 (14) | 4 (14) | 4 (14) | 6 (21) | 6 (21) | 3 (10) | 1 (3) |
| | <i>P</i> | | | | 0,0667 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| D | DB | | 12 (36) | 16 (49) | 5 (15) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | | |
| | BJ | | 6 (22) | 2 (7) | 5 (19) | 4 (15) | 6 (22) | 1 (4) | 2 (7) | 1 (4) | | |
| | <i>P</i> | | 0,27 | 0,0006 | 0,7422 | (0,036) | (0,0059) | 0,45 | 0,1983 | 0,45 | | |
| D₁ | DB | | 10 (42) | 12 (50) | 2 (8) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | | |
| | BJ | | 6 (29) | 0 (0) | 4 (19) | 3 (14) | 4 (19) | 1 (5) | 2 (10) | 1 (5) | | |
| | <i>P</i> | | 0,5334 | 0,0001 | 0,3955 | 0,0937 | (0,0402) | 0,4667 | 0,2121 | 0,4667 | | |
| D₂ | DB | | 2 (22) | 4 (44) | 3 (33) | 0 (0) | 0 (0) | | | | | |
| | BJ | | 0 (0) | 2 (33) | 1 (17) | 1 (17) | 2 (33) | | | | | |
| | <i>P</i> | | 0,4857 | 1 | 0,6044 | 0,4 | 0,1429 | | | | | |

Opomba: Statistično značilni rezultati so obarvani rumeno.

^a Statistično značilne *P*-vrednosti, ki nakazujejo na povezavo sevov z določenim številom VD s skupino BJ v določeni filogenetski (pod)skupini, so prikazane v oklepaju ().

4.5 OBČUTLJIVOST ZA ANTIBIOTIKE

Seva DB14-001 in DB14-003 sta rastle na gojiščih s tetraciklinom, streptomycinom in ampicilinom, medtem ko ostali sevi niso rastle na teh gojiščih. Vsi sevi so bili občutljivi za nalidiksično kislino. V **prilogi D** so zbrani podatki o občutljivost sevov DB za antibiotike.

5 RAZPRAVA

Študije, v katerih se ugotavlja raznolikost *E. coli* pri različnih živalskih vrstah, so redke (Gordon in Cowling, 2003; Baldy-Chudzik in sod., 2008; DebRoy in Roberts, 2006). Pogostejše so študije, kjer se raziskuje raznolikost sevov *E. coli* pri eni sami vrsti živali (Chapman in sod., 2006; Budič, 2011), tako kot tudi v tej diplomski nalogi, kjer smo preučevali raznolikost sevov *E. coli* izoliranih iz medvedjih iztrebkov. Izolate smo iz vzorca izbrali naključno. Iz blata medvedov iz narave smo med 160 izolati določili 45 različnih ERIC-profilov. Torej so imeli v povprečju 4 izolati enak ERIC-profil. Iz blata medvedov v ujetništvu smo iz 80 izolatov določili 41 različnih ERIC-profilov in sta imela povprečno 2 izolata enak ERIC-profil, kar bi nakazovalo na večjo pestrost *E. coli* pri medvedih iz ujetništva. Vendar, vzorci iz živalskega vrta so bili sveži, stari največ en dan, medtem ko so bili iztrebki medvedov iz narave starejši (natančne starosti nismo mogli določiti). Za raziskave so primernejši sveži iztrebki, saj pride, ko jih žival izloči, do spremembe fizikalnih pogojev in do možnosti kontaminacije z zunanjimi viri bakterij. Weaver in sod. (2005) so izvedli študijo, ki poroča, da je v svežem iztrebku goveda, konjev in ovac večja populacija *E. coli*, ki se s starostjo iztrebka manjša.

Nekatere raziskave so pokazale, da pri vsejedihi živalih prevladujejo bakterije *E. coli* iz filogenetske skupine A, pri rastlinojedih pa iz B1 (Baldy-Chudzik in sod., 2008; Carlos in sod., 2010). Pri našem diplomskem delu se je izkazalo, da je bila tretjina sevov v filogenetski skupini D, tretjina v filogenetski skupini A, nekaj manj jih je bilo v filogenetski skupini B1 in le 3 sevi so bili v filogenetski skupini B2. Ob primerjavi obeh populacij medvedov smo opazili večje razlike v zastopanosti filogenetske skupine A in B1. Nekaj več kot polovica sevov iz živalskega vrta je bilo v filogenetski skupini A, medtem ko je bilo takih sevov iz narave manj kot 20 %. Obratna je bila zastopanost filogenetske skupine B1, v kateri je bilo skoraj 40 % sevov iz narave in le 7 % sevov iz živalskega vrta. Medvedje v živalskem vrtu dobijo zelo raznoliko hrano, najpogosteje se hranijo s sadjem, zelenjavo, oreščki. Za razliko od medvedov v naravi dobijo medvedje v Živalskem vrtu Ljubljana tudi veliko mlečnih izdelkov. V hladnejših mesecih so pogosteje oskrbovani tudi z mesom, hranijo pa se skozi vse leto in zaradi zadostne količine hrane ne prezimujejo.

Prostoživeči medvedje se hranijo s hrano, ki jim je trenutno dostopna v naravi. Predvsem je njihova hrana rastlinskega izvora, kar delno pojasni dobljene razlike v podatkih v naši raziskavi.

Tudi človek je kot medved vsejed in bi lahko pričakovali podobno sestavo črevesne mikrobiote. Vendar je študija človeških črevesnih sevov *E. coli* pokazala, da so sevi pri človeku razmeroma enakomerno porazdeljeni po filogenetskih skupinah. Največ sevov je bilo v filogenetski skupini B2 (33 %) (Čitar, 2010), medtem ko je naša študija pokazala, da je bilo v tej filogenetski skupini le 3 % črevesnih sevov medveda. Ob primerjavi črevesnih sevov medveda in človeka so bili podatki statistično značilni pri sevih iz filogenetske podskupine A₀, v kateri je bila prevalenca medvedjih sevov DB višja kot prevalenca človeških sevov BJ.

V naši raziskavi je bil izmed iskanih virulentnih dejavnikov najpogostejši zapis za fimbrije tipa 1 (*fimH*). Kar 72 % vseh črevesnih sevov *E. coli* medveda je imelo ta gen. Primerjali smo pojavnost zapisov za VD po posameznih filogenetskih (pod)skupinah. Večjih razlik v pojavnosti zapisa *fimH* med sevi medvedov iz ujetništva in iz narave nismo opazili. Sevi iz narave niso imeli predstavnika v filogenetskima podskupinama A₁ in B2₂, prav tako v filogenetski podskupini B2₃ ni bilo sevov iz živalskega vrta, zato v teh skupinah nismo mogli primerjati rezultatov. Kot je razvidno iz **preglednice 8** so primerjane skupine precej majhne in različno velike, zato moramo biti pri interpretaciji rezultatov previdni. Filogenetska skupina B2 ima le 3 predstavnike in vsi imajo zapis *fimH*. Zaradi majhnega števila sevov ne moremo trditi, da imajo vsi sevi *E. coli*, ki so v prebavnem traktu medvedov in so v filogenetski skupini B2, zapis *fimH*. Za verodostojnejše zaključke bi morali pridobiti več sevov, ki bi sodili v to filogenetsko skupino. Primerjani skupini medvedjih sevov iz filogenetskih skupin A in B1 sta bili različno veliki, kar moramo tudi upoštevati pri interpretaciji rezultatov. Kar 14 sevov iz ujetništva, ki so v filogenetski skupini A, je imelo zapis *fimH*. Takih sevov iz narave je bilo le 5, vendar pa so deleži med skupinama podobni, zato so rezultati statistično neznačilni. Chapman in sod. (2006) so v svoji raziskavi odkrili, da je zapis *fimH* pogost tudi pri črevesnih sevih *E. coli* prašičev. Zapis za fimbrije tipa 1 je bil najpogosteje prisoten tudi pri človeških črevesnih sevih BJ. Ob primerjavi črevesnih sevov *E. coli* človeka in medveda smo ugotovili, da imajo

človeški črevesni sevi BJ pogosteje ta gen (88 %). Torej lahko sklepamo, da obstaja povezava med prisotnostjo *fimH* in virom seva. Sevi filogenetske skupine D, ki so imeli zapis *fimH*, so statistično značilno povezani s sevi BJ. Kar 93 % sevov BJ iz filogenetske skupine D je imelo zapis *fimH* in le 61 % sevov DB.

Kar 43 % sevov medveda je imelo zapis *kpsMT*. Le nekateri sevi iz filogenetskih skupin A in D so imeli zapis *kpsMT*. Sevi medvedov iz narave in ujetništva so imeli podoben delež prisotnosti tega gena. Pri sevih iz narave, ki so bili v filogenetski skupini D, je bil ta gen pogosteje prisoten kot pri takih sevih iz ujetništva. Ko smo primerjali medvedje seve DB in človeške seve BJ, smo ugotovili, da je prevalenca *kpsMT* pri obeh populacijah podobna. Razlika se kaže pri sevih iz filogenetske skupine B2, ki so imeli zapis *kpsMT*. Kar 93 % vseh sevov iz filogenetske skupine B2 je imelo zapis *kpsMT*, medtem ko medvedji sevi iz te filogenetske skupine niso imeli tega zapisa. Ponovno moramo upoštevati, da smo v raziskavo vključili le 3 medvedje seve iz filogenetske skupine B2, zato zaključki ob primerjavi sevov v tej skupini manj zanesljivi.

Zapis za sideroforni receptor jersiniabaktin (*fyuA*) je imelo 21 % črevesnih sevov *E. coli* medvedov. Tudi med sevi medvedov iz različnih okolij ni bilo večjih razlik v pojavnosti tega gena. Ko smo primerjali seve po posameznih filogenetskih (pod)skupinah, nismo opazili večjih razlik, vendar pa so bile primerjane skupine sevov medvedov iz narave in ujetništva precej majhne, zato rezultate težko posplošimo na celotno populacijo medvedov. Človeški sevi BJ so imeli zapis *fyuA* pogosteje, kar 66 % vseh sevov, ki so bili večinoma v filogenetski podskupini B2₃. Sevi DB medveda so imeli le enega predstavnika v tej filogenetski podskupini. Če bi iz medvedjih iztrebkov izolirali več sevov iz filogenetske podskupine B2₃, bi obstajala večja verjetnost, da bi imeli zapis *fyuA*. Do takega sklepanja lahko pridemo na podlagi podatkov sevov BJ, kjer so imeli skoraj vsi sevi iz filogenetske podskupine B2₃ zapis *fyuA*. Raziskava VD *E. coli* iz blata goveda je pokazala, da je imelo zapis *fyuA* 18 % sevov. Torej je bil delež sevov goveda s tem genom nekoliko manjši od deleža takih sevov izoliranih iz blata medveda (21 %). Pomembno je upoštevati tudi podatek, da je preiskovana skupina sevov iz blata goveda vsebovala le 34 izolatov, medtem ko smo mi v svojo raziskavo vključili 86 sevov izoliranih iz blata medvedov (Budič, 2011).

Pomemben VD, ki smo ga iskali, je tudi invazin *ibeA*. Ta gen je imelo 16 % vseh sevov. Gen ni statistično značilno povezan z določeno populacijo medvedov, saj je bil v podobnih % prisoten tako pri medvedih v naravi kot pri medvedih v ujetništvu ($P = 0,5616$). Pri statistični analizi podatkov po filogenetskih podskupinah za seve medvedov obeh populacij nismo našli statistične povezave. Ob primerjavi človeških in medvedjih sevov, ki so imeli zapis *ibeA*, nismo opazili večjih razlik. Pri statistični analizi podatkov po filogenetskih skupinah pa smo našli statistično povezavo pri sevih iz filogenetske skupine D, v kateri je imelo kar 21 % sevov DB zapis *ibeA*. Sevi BJ, ki so bili v filogenetski skupini D, niso imeli zapisa *ibeA*. Moulin-Schouleur in sod. (2006) so naredili raziskavo, v kateri so primerjali med drugim tudi pojavnost *ibeA* pri sevih človeka in ptic. Ugotovili so, da so imeli zapis *ibeA* vsi ptičji sevi in 95,5 % človeških sevov, kar je veliko več kot pri medvedjih sevih (16 %). Vendar pa moramo biti pri interpretaciji njihovih rezultatov previdni, saj so v raziskavo vključili premalo sevov.

Preverjali smo tudi pogostost gena *usp* (uropatogeni specifični protein USP), ki je sicer povezan s patogenostjo UPEC. Prisoten je bil pri 7 % sevov DB, pri čemer ni statistične povezave gena s posamezno populacijo medvedov, prav tako ne s posamezno filogenetsko (pod)skupino. Statistično značilno razliko smo opazili le pri sevih iz filogenetske skupine D, v kateri so bili 4 sevi iz živalskega vrta s tem genom, medtem ko sevi iz narave niso imeli predstavnika v tej skupini. Zapis *usp* je imelo 24 % človeških sevov BJ, kar je v primerjavi z medvedjimi sevi DB veliko več. Pri filogenetski razporeditvi sevov s tem genom nismo opazili razlik med človeškimi in medvedjimi sevi, vendar zaradi že prej omenjene različne zastopanosti sevov po filogenetskih (pod)skupinah ne moremo priti do objektivnih oz. relevantnih zaključkov za *usp*.

Zapis za aerobaktin *iucD* sta imela le 2 seva medvedov iz narave, ki smo ju uvrstili v filogenetsko podskupino B1. Iz medvedjih vzorcev DB smo torej izolirali 2 % sevov s tem genom, medtem ko je bilo v človeških vzorcih BJ takih sevov 39 %. Izračunana P -vrednost (0) kaže na statistično značilno povezavo sevov z *iucD* s sevi BJ. Po filogenetski razporeditvi sevov BJ z genom *iucD* smo jih največ uvrstili v filogenetsko podskupino B2₃. Kar 55 % sevov BJ iz filogenetske podskupine B2₃ je imelo zapis *iucD*. Obe skupini (BJ in DB) težko primerjamo, saj smo iz medvedjih iztrebkov izolirali le dva seva s tem genom.

Preiskovali smo tudi prevalenco genov za P-fimbrije (*papGII*, *papGII*), S-fimbrije (*sfaDE*), Dr-fimbrije (*afa/draBC*), nehemaglutininski adhezin Iha (*iha*), citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1 (*cnf1*), hemolizin A (*hlyA*), sideroforni receptor IreA (*ireA*), hemoglobin proteazo (*hbp*) in protein, ki vsebuje domeno TIR (*tcpC*). Teh genov ni vseboval nobeden medvedji sev *E. coli*. Prisotni pa so bili pri človeških sevih BJ v različnih odstotkih (glej **preglednico 13**).

Baldy-Chudzik in sod. (2008) so v svoji raziskavi ugotavljali pojavnost VD sevov IPEC pri komezalnih sevih *E. coli* izoliranih iz iztrebkov sesalcev istega živalskega vrta. Izmed 16 iskanih zapisov za VD so jih odkrili le 8. Pri rastlinojedih živalih so bili vsi sevi z zapisi za VD uvrščeni v filogenetsko skupino B1 in so tvorili 8 različnih virulentnih profilov. Pri vsejedih in rastlinojedih živalih je bilo veliko sevov iz filogenetske skupine A in so tvorili 3 različne virulentne profile, bili pa so tudi sevi iz skupine B2 in D z enim virulentnim genom. V naši raziskavi, kjer smo preučevali zapise za VD medvedjih črevesnih sevov, so imeli sevi *E. coli* vsaj 1 in največ 3 zapise za iskane VD. Od tega je imelo 51 % sevov zapis za 1 VD, 36 % sevov zapis za 2 VD in ostali zapis za 3 VD. V povprečju je imel sev pridobljen iz živalskega vrta 1,8 zapisa za VD, sev iz narave pa 1,5 zapisa za VD. Ko smo primerjali število VD po posameznih filogenetskih (pod)skupinah pri sevih medvedov iz ujetništva in narave, so bili podatki statistično neznačilni. Izjema so bili sevi iz filogenetske skupine D z zapisom za 3 VD. Kar 36 % sevov iz ujetništva, ki so bili v filogenetski skupini D, je imelo 3 zapise za VD in noben sev iz narave, ki je bil v filogenetski skupini D, ni imel 3 zapisov za VD.

Analiza podatkov o črevesnih sevih BJ pri ljudeh je pokazala, da so imeli nekateri sevi tudi po 10 zapisov za VD na sev, kar je več kot pri medvedjih črevesnih sevih DB, kjer smo določili največ 3 zapise za VD na sev. V povprečju je imel sev BJ 4,1 zapisov za VD. Ugotovili smo torej, da so imeli sevi *E. coli* medvedov manj zapisov za VD kot sevi v črevesju ljudi. Sevi BJ, ki so bili v filogenetski skupini B2, so imeli največ zapisov za VD. Iz teh podatkov bi lahko sklepali, da imajo tudi medvedji sevi iz filogenetske skupine B2 večje število VD, vendar pa naša raziskava tega ne more potrditi, saj smo preučevali le 3 seve filogenetske skupine B2. Iz teh rezultatov zato težko sklepamo na dejansko stanje v populaciji medvedov.

Van den Bogaard in Stobberingh (2000) sta ugotavljala povezavo med epidemiologijo rezistenčnih bakterijskih sevov med človekom in živalmi. Ugotovila sta, da uporaba antibiotikov povzroča povečanje rezistence patogenih in komezalnih bakterij. Rezistentna bakterija, ki je v hrani, se lahko naseli v prebavnem traktu živali ali človeka, ki to hrano zaužije, lahko pa prenese gene za rezistentnco na druge bakterije v črevesju. Večje kot je število rezistentnih bakterij večja je verjetnost, da pride do prenosa genov za rezistenco na druge (potencialno patogene) bakterije. Kako uporaba antibiotikov pri živalih vpliva na rezistentne seve v človeški medicini še ni znano, vendar pa ne moremo zanemariti možnosti, da lahko živalski sevi služijo kot vir rezistence. Pri našem diplomskem delu so bili vsi sevi pridobljeni iz iztrebkov medvedov iz ujetništva občutljivi za vse 4 testirane antibiotike. Medvedje niso prejemale nobenih protimikrobnih zdravil. Pri sevih iz narave smo ugotovili, da so večinoma občutljivi za vse testirane antibiotike, razen sevov D14-001 in DB14-003, ki sta rastle na gojiščih s tetraciklinom, streptomycinom in ampicilinom ne pa na gojišču z nalidiksično kislino. Bila sta torej občutljiva le za nalidiksično kislino. Oba seva smo uvrstili v filogenetsko podskupino B1. Pričakovali bi, da se pri sevih *E. coli* medvedov iz živalskega vrta pojavljajo rezistenčni sevi, saj so medvedje v vsakdanjem stiku s človekom. Vendar pa so podatki pokazali, da pri naših medvedih v Živalskem vrtu v času raziskave ni bilo odpornih sevov.

6 SKLEPI

- Pri testiranih vzorcih medvedov so bili sevi enakomerno porazdeljeni po filogenetskih skupinah A, B1 in D, medtem ko je bilo v filogenetski skupini B2 le 3 % vseh sevov.
- V filogenetski skupini A je bilo več sevov iz živalskega vrta (54 %) kot sevov iz narave (18 %). V filogenetsko podskupino B1 spada statistično značilno več (38 %) sevov medvedov iz narave in kot sevov medvedov iz ujetništva (7 %).
- Človeški črevesni sevi so bili razmeroma enakomerno porazdeljeni po filogenetskih skupinah, medtem ko je bilo medvedjih črevesnih sevov v filogenetski skupini B2 bistveno manj. Rezultati so statistično značilni tudi za seve, ki so bili v filogenetski podskupini A₀, v tej skupini je bilo več medvedjih sevov ($P = 0,0006$).
- Medvedji črevesni sevi so imeli od iskanih VD najpogosteje gen *fimH* (72 %). Ti so bili enakomerno porazdeljeni po filogenetskih skupinah. Človeški sevi BJ so imeli v primerjavi medvedjimi sevi DB pogosteje zapis *fimH* (88 %). Kar 93 % sevov BJ iz filogenetske skupine D je imelo zapis *fimH*, takih sevov DB je bilo le 61 %.
- Gen *kpsMT* je imelo 43 % medvedjih sevov, zapis za invazin *ibeA* pa je imelo 16 % medvedjih sevov. Prevalenca gena *kpsMT* je bila pri medvedjih in človeških sevih podobna.
- Gen *fyuA* je imelo 21 % medvedjih sevov DB. Razporeditev sevov po filogenetskih skupinah je bila med sevi medvedov iz narave in ujetništva enakomerna. Ta gen je imelo 66 % človeških sevov BJ.
- Gen *usp* je imelo 7 % sevov DB in 24 % človeških sevov BJ.
- Gen *iucD* je imelo 2 % medvedjih sevov DB, medtem ko je bilo v človeških vzorcih BJ takih sevov 39 %.
- Pri sevih DB nismo določili genov *papGII*, *papGIII*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *cnfI*, *hlyA*, *tcpC*, *ireA*, *iha* in *hbp*, ki pa so bili prisotni pri človeških sevih BJ.
- Medvedji sevi *E. coli* so imeli vsaj 1 in največ 3 zapise za iskane VD. 51 % sevov je imelo zapis za 1 VD, 36 % sevov zapis za 2 VD in ostali zapis za 3 VD. Sevi iz živalskega vrta, ki so bili v filogenetski skupini D, so imeli večjo pojavnost 3 zapisov za VD kot sevi pridobljeni iz narave ($P = 0,0084$). Sevi iz narave, ki so bili

v filogenetski podskupini D2, so imeli večjo pojavnost 2 zapisov VD kot sevi pridobljeni iz živalskega vrta ($P = 0,0079$). V povprečju je imel sev BJ 4,1 zapisov za VD, sev DB pa 1,6. Ugotovili smo torej, da imajo sevi *E. coli* medvedov manj zapisov za VD kot človeški črevesni sevi.

- Medvedji sevi DB iz ujetništva so bili občutljivi za vse 4 testirane antibiotike. Sevi iz narave so bili večinoma občutljivi za vse testirane antibiotike, razen sevov D14-001 in DB14-003, ki sta bila od testiranih antibiotikov občutljiva le za nalidiksično kislino. Oba seva smo uvrstili v filogenetsko podskupino B1.

7 VIRI

- Akcijski načrt upravljanja z rjavim medvedom (*Ursus arctos* L.) v Sloveniji za obdobje 2007 – 2011: predlog. 2006. Ljubljana, Zavod za gozdove Slovenije, Ministrstvo za okolje in prostor: 23 str.
- http://www.arhiv.mop.gov.si/fileadmin/mop.gov.si/pageuploads/podrocja/okolje/pdf/zveri/akcijski_nacrt_medved_predlog_apr07.pdf (junij 2012)
- Andlovic A. 2002. *Escherichia coli* V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 185–188.
- ARSO/LUZ. 2007. Atlas okolja. Ljubljana, Agencija Republike Slovenije za okolje, Ljubljanski urbanistični zavod: 1 str.
- http://gis.arso.gov.si/atlasokolja/profile.aspx?id=Atlas_Okolja_AXL@Arso (maj 2012)
- Baldy-Chudzik K., Mackiewicz P., Stosik M. 2008. Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. *Veterinary Microbiology*, 131: 173–184.
- Banu A., Kabbin J. S., Anand M. 2011. Extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: An emerging issue. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 5, 3: 486–490.
- Bio-Rad. 2007. UriSelect™4: Direct identification visibly reliable. Hercules, Bio-Rad laboratories: 4 str.
- <http://did.it/contenuti/biorad/UriSelect.pdf> (februar 2012)
- Blattner F. R., Plunkett III G., Bloch C. A., Perna N. T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J. D., Rode C. K., Mayhew G. F., Gregor J., Wayne Davis N., Kirkpatrick H. A., Goeden M. A., Rose D. J., Mau B., Shao Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277, 5331: 1453–1462.
- Budič M. 2011. Virulentni dejavniki sevov bakterije *Escherichia coli* izoliranih iz blata goveda. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 46 str.

- Carlos C., Pires M. M., Stoppe N. C., Hachich E. M., Sato M. I. Z., Gomes T. A. T., Amaral L. A., Ottoboni L. M. M. 2010. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiology*, 10: 161, doi: 10.1186/1471-2180-10-161: 10 str.
- Chapman T. A., Wu X.-Y., Barchia I., Bettelheim K. A., Driesen S., Trott D., Wilson M., Chin J. J.-C. 2006. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7: 4782–4795.
- Clarke B. R., Pearce R., Roberts I. S. 1999. Genetic organization of the *Escherichia coli* K10 capsule gene cluster: Identification and characterization of two conserved regions in group iii capsule gene clusters encoding polysaccharide transport functions. *Journal of Bacteriology*, 181, 7: 2279–2285.
- Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4555–4558.
- Connell H., Agace W., Klemm P., Schembri M., Marild S., Svanborg C. 1996. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 9827–9832.
- Crosa J. H., Walsh C. T. 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 2: 223–249.
- Čitar M. 2011. Virulentni dejavniki izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata zdravih ljudi. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 97 str.
- Dean P., Kenny B. 2009. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Current Opinion in Microbiology*, 12: 101–109.
- DebRoy C., Roberts E. 2006. Screening petting zoo animals for presence of potentially pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18: 597–600.

- Denich K., Blyn L. B., Craiu A., Braaten B. A., Hardy J., Low D. A., O'Hanley P. D. 1991. DNA sequences of three *papA* genes from uropathogenic *Escherichia coli* strains: Evidence of structural and serological conservation. *Infection and Immunity*, 59, 11: 3849–3858.
- Escobar-Parámo P., Grenet K., Le Menac'h A., Rode L., Salgado E., Amorin C., Gouriou S., Picard B., Rahimy M. C., Andremont A., Denamur E., Ruimy R. 2004. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 9: 5698–5700.
- Fabbri A., Travaglione S., Fiorentini C. 2010. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1): Toxin biology, *in vivo* applications and therapeutic potential. *Toxins*, 2: 83–296.
- Gordon D., Cowling A. 2003. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology*, 149: 3575–3586.
- Gupta S. K., Keck J., Ram P. K., Crump J. A., Miller M. A., Mintz E. D. 2008. Part III. Analysis of data gaps pertaining to enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in low and medium human development index countries, 1984–2005. *Epidemiology and Infection*, 136, 6: 721–738.
- Hacker J., Kestler H., Hoshutzky H., Jann K., Lottspeich F., Korhonen T. K. 1992. Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* 018:K1 meningitis isolate. *Infection and Immunity*, 61, 2: 544–550.
- Ihan A. 2002. Bakterijska celica. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 3–15.
- Ingledeu W. J., Poole R. K. 1984. The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 48, 3: 222–271.
- Johnson J. R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4, 1: 80–128.
- Johnson J. R., Brown J. J. 1996. A novel multiply primed polymerase chain reaction assay for identification of variant *papG* genes encoding the Gal(al-4)Gal-binding PapG adhesins of *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*, 173: 920–926.

- Johnson J. R., Russo T. A., Tarr P. I., Carlino U., Bilge S. S., Vary J. C., Stell A. L. 2000. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN_{E. coli}*, among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infection and Immunity*, 68, 5: 3040–3047.
- Johnson, J., Stell A. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 261–272.
- Klemm P., Schembri M. A. 2000. Bacterial adhesins: function and structure. *International Journal of Medical Microbiology*, 290, 1: 27–35.
- Kline K. A., Fälker S., Dahlberg S., Normark S., Henriques-Normark B. 2009. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host & Microbe*, 5: 580–592.
- Koren S., Ihan A., Gubina M. 2002. Patogeneza in širjenje bakterijskih okužb V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 65–73.
- Kotnik V. 2002. Antibiotiki in kemoterapevtiki. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 427–438.
- Kuhar I., Grabnar M., Žgur-Bertok D. 1998. Virulence determination of uropathogenic *Escherichia coli* in fecal strains from intestinal infections and healthy individuals. *FEMS Microbiology Letters*, 164: 243–248.
- Langsrud Ø. 2004. Fisher's exact test. Oslo, Statistics Norway, Division for Statistical Methods and Standards: software.
<http://www.langsrud.com/fisher.htm> (november, 2009)
- Le Bouguéne C., Archambaud M., Labigne A. 1992. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa* and *sfa* adhesion-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 5: 1189–1193.
- Ley R. E., Hamady M., Lozupone C., Turnbaugh P. J., Ramey R. R., Bircher J. S., Schlegel M. L., Tucker T. A., Schrenzel M. D., Knight R., Gordon J. I. 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320: 1647–1651.

- May A. K., Gleason T. G., Sawyer R. G., Pruett T. L. 2000. Contribution of *Escherichia coli* alpha-hemolysin to bacterial virulence and to intraperitoneal alterations in peritonitis. *Infection and Immunity*, 68, 1: 176–183.
- Moulin-Schouleur M., Schouler C., Tailliez P., Kao M.-R., Bre'e A., Germon P., Oswald E., Mainil J., Blanco M., Blanco J. 2006. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 10: 3484–3492.
- Nakano M., Yamamoto S., Terai A., Ogawa O., Makino S., Hayashi H., Nair G. B., Kurazono H. 2001. Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein. *FEMS Microbiology Letters*, 205: 71–76.
- Nataro J. P., Steiner t., Guerrant R. L. 1998. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, 4, 2: 251–261.
- Nowicki B., Truong L., Moulds J., Hull R. 1988. Presence of the Dr receptor in normal human tissues and its possible role in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *American Journal of Pathology*, 133, 1: 1–4.
- Paciorek J. 2002. Virulence properties of *Escherichia coli* faecal strains isolated in Poland from healthy children and strains belonging to serogroups O18, O26, O44, O86, O126 and O127 isolated from children with diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*, 51: 548–556.
- Penders J., Thijs C., Vink C., Stelma F. F., Snijders B., Kummeling I., van den Brandt P. A., Stobberingh E. E. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118, 2: 511–521.
- Russo T. A., Carlino U. B., Johnson J. R. 2001. Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 69, 10: 6209–6216.
- Schubert S., Rakin A., Karch H., Carniel E., Heesemann J. 1998. Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infection and Immunity*, 66, 2: 480–485.
- Schwab C., Cristescu B., Boyce M. S., Stenhouse G. B., Gänzle M. 2009. Bacterial populations and metabolites in the feces of free roaming and captive grizzly bears. *Canadian Journal of Microbiology*, 55, 12: 1335–1346.

- Schwab C., Cristescu B., Northrup J. M., Stenhouse G. B., Gänzle M. 2011. Diet and environment shape fecal bacterial microbiota composition and enteric pathogen load of grizzly bears. *PLoS ONE*, 6, 12: e27905, doi: 10.1371/journal.pone.0027905: 8 str.
- Seme K. 2002. Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 439–453.
- Starčič Erjavec M., Arbiter T., Žgur-Bertok D. 2009. Pathogenicity islands, plasmids and iron uptake systems in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Acta Biologica Slovenica*, 52, 2: 73–83.
- Starčič Erjavec M., Jesenko B., Petkovšek Ž., Žgur-Bertok D. 2010. Prevalence and associations of *tcpC*, a gene encoding a Toll/interleukin-1 receptors domain-containing protein, among *Escherichia coli* urinary tract infection, skin and soft tissue infection, and commensal isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 3: 966–968.
- Starčič Erjavec M., Palandačič A., Žgur-Bertok D., Ambrožič Avguštin J. 2011. Genetic background of uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Slovenia in relation to fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole. *Acta Biologica Slovenica*, 54, 2: 5–13.
- Todar K. 2008. Pathogenic *E. coli*. V: *Todar's online textbook of bacteriology*. Madison, University of Wisconsin, Department of Wisconsin: 4 str.
<http://textbookofbacteriology.net/e.coli.html> (junij 2012)
- Van den Bogaard A. E., Stobberingh E. E. 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14: 327–335.
- Veranič P. 2008. Uropatogena *Escherichia coli* – priložnostni znotrajcelični parazit. *Medicinski razgledi*, 47: 251–257.
- Weaver R.W., Entry J. A., Graves A. 2005. Numbers of fecal streptococci and *Escherichia coli* in fresh and dry cattle, horse, and sheep manure. *Canadian Journal of Microbiology*, 51: 847–851.
- Weintraub A. 2007. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. *Journal of Medical Microbiology*, 56: 4–8.

- WHO. 2009. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Geneva, World Health Organization: 5 str.
http://www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/index4.html (maj 2012)
- Yamamoto S., Terai A., Yuri K., Kurazono H., Takeda Y., Yoshida O. 1995. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 12: 85–90.
- Zhang L., Foxman B., Marrs C. 2002. Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 11: 3951–3955.
- Žgur-Bertok D., Starčič Erjavec M. 2009. Teoretične osnove in navodila za vaje pri predmetu Mikrobna genetika. Ljubljana, Študentska založba: 116 str.

ZAHVALA

Lepo se zahvaljujem prof. dr. Darji Žgur-Bertok in prof. dr. Marjanci Starčič Erjavec za mentorstvo, vse nasvete ter pomoč pri zasnovi in pisanju diplomske naloge. Prof. dr. Manici Müller-Premru se zahvaljujem za hitro recenzijo.

Zahvaljujem se gospodu Francu Kljunu iz Skupine za ekologijo živali Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete ter lovcema Janezu Hočevanju in Jožetu Šperarju za dobljene vzorce iz narave. Prav tako se zahvaljujem Živalskemu vrtu Ljubljana za dostop in pomoč pri vzorčenju medvedjih iztrebkov v ogradah.

Zahvaljujem se vsem zaposlenim na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov za vso pomoč in uporabne praktične nasvete pri delu v laboratoriju, še posebej Gregorju Bajcu, Barbari Kastelic Bokal in dr. Zdravku Podlesku.

Hvala tudi družini, sošolcem in prijateljem za vso moralno podporo in potrpljenje. Hvala vsem, ki ste kakorkoli pripomogli pri končanju diplomske naloge.

PRILOGE

Priloga A: Preglednica rezultatov analize sevov *E. coli* zbirke DB; uvrstitev v filogenetske (pod)skupine in prisotnost VD pri vsakem posameznem sevu.

| Oznaka DB | št. DB | <i>chuA</i> | <i>yjaA</i> | TSPE4.C2 | filog. sk. | filog. podsk. | <i>papGII</i> | <i>papGIII</i> | <i>sfaDE</i> | <i>afa/draBC</i> | <i>cnfI</i> | <i>hlyA</i> | <i>usp</i> | <i>iucD</i> | <i>tcpC</i> | <i>ibeA</i> | <i>fimH</i> | <i>fyuA</i> | <i>ireA</i> | <i>iha</i> | <i>hbp</i> | <i>kpsMT</i> |
|-----------|--------|-------------|-------------|----------|------------|-----------------|---------------|----------------|--------------|------------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|--------------|
| DB1 005 | 2 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB2 001 | 42 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB2 002 | 47 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB2 006 | 46 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB2 010 | 43 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB2 019 | 45 | 1 | 0 | 1 | D | D ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB2 021 | 44 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB3 001 | 55 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB3 004 | 51 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB3 008 | 56 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB3 009 | 54 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB3 011 | 49 | 0 | 1 | 0 | A | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB3 012 | 52 | 1 | 1 | 0 | B2 | B2 ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB3 015 | 48 | 1 | 0 | 1 | D | D ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB3 021 | 50 | 0 | 0 | 1 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 001 | 19 | 0 | 1 | 0 | A | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 002 | 24 | 0 | 1 | 0 | A | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB4 004 | 25 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 006 | 26 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB4 007 | 27 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 009 | 31 | 0 | 0 | 1 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 011 | 20 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB4 013 | 28 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB4 015 | 15 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB4 016 | 29 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB4 020 | 22 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB4 021 | 16 | 1 | 0 | 1 | D | D ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 023 | 17 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 025 | 32 | 1 | 1 | 0 | B2 | B2 ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Opomba:VD - virulentni dejavniki, 1 - pozitiven rezultat, 0 - negativen rezultat.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **priloge A**: Preglednica rezultatov analize sevov *E. coli* zbirke DB; uvrstitev v filogenetske (pod)skupine in prisotnost VD pri vsakem posameznem sevu.

| oznaka DB | št. DB | <i>chuA</i> | <i>yjaA</i> | TSPE4_C2 | filog. sk. | filog. podsk. | <i>papGII</i> | <i>papGIII</i> | <i>sfaDE</i> | <i>afa/draBC</i> | <i>cnfI</i> | <i>hlyA</i> | <i>usp</i> | <i>iucD</i> | <i>tcpC</i> | <i>ibeA</i> | <i>fimH</i> | <i>fyuA</i> | <i>ireA</i> | <i>iha</i> | <i>hbp</i> | <i>kpsMT</i> |
|-----------|--------|-------------|-------------|----------|------------|-----------------|---------------|----------------|--------------|------------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|--------------|
| DB4 026 | 30 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 028 | 21 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 029 | 23 | 0 | 1 | 0 | A | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 030 | 18 | 1 | 0 | 1 | D | D ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB5 002 | 33 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB5 005 | 41 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB5 012 | 35 | 0 | 1 | 0 | A | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB5 013 | 37 | 0 | 0 | 1 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB5 014 | 40 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB5 015 | 39 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB5 019 | 38 | 1 | 0 | 1 | D | D ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB5 021 | 36 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB5 025 | 34 | 0 | 1 | 0 | A | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB6 001 | 62 | 0 | 0 | 1 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB6 002 | 63 | 0 | 0 | 1 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB6 003 | 64 | 0 | 0 | 1 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB7 001 | 8 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB7 002 | 4 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB7 006 | 6 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB7 009 | 7 | 1 | 0 | 1 | D | D ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB7 010 | 5 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB7 014 | 3 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB8 020 | 9 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB9 002 | 11 | 0 | 0 | 1 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB9 006 | 10 | 0 | 0 | 1 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB9 008 | 14 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB9 013 | 13 | 0 | 0 | 1 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB9 019 | 12 | 0 | 0 | 1 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB10 001 | 65 | 1 | 1 | 1 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Opomba: VD - virulentni dejavniki, 1 - pozitiven rezultat, 0 - za negativen rezultat.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **priloge A**: Preglednica rezultatov analize sevov *E. coli* zbirke DB; uvrstitev v filogenetske (pod)skupine in prisotnost VD pri vsakem posameznem sevu.

| Oznaka DB | št. DB | <i>chuA</i> | <i>yjaA</i> | TSPE4_C2 | filog. sk. | filog. podsk. | <i>papGII</i> | <i>papGIII</i> | <i>sfaDE</i> | <i>afa/draBC</i> | <i>cnfI</i> | <i>hlyA</i> | <i>usp</i> | <i>iucD</i> | <i>tcpC</i> | <i>ibeA</i> | <i>fimH</i> | <i>fyuA</i> | <i>ireA</i> | <i>iha</i> | <i>hbp</i> | <i>kpsMT</i> |
|-----------|--------|-------------|-------------|----------|------------|----------------|---------------|----------------|--------------|------------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|--------------|
| DB10 002 | 66 | 0 | 0 | 1 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB10 003 | 67 | 1 | 0 | 1 | D | D ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB10 004 | 68 | 0 | 0 | 1 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB11 001 | 69 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB11 002 | 70 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB11 003 | 71 | 0 | 0 | 1 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB11 004 | 72 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB12 005 | 57 | 0 | 0 | 1 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB12 006 | 58 | 0 | 0 | 1 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB13 001 | 59 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB13 002 | 60 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB13 003 | 61 | 1 | 0 | 1 | D | D ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB14 001 | 73 | 0 | 0 | 1 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB14 002 | 74 | 1 | 0 | 1 | D | D ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB14 003 | 75 | 0 | 0 | 1 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB14 004 | 76 | 0 | 0 | 1 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB15 001 | 77 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB15 002 | 78 | 0 | 0 | 1 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB15 003 | 79 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB15 004 | 80 | 0 | 0 | 1 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB15 005 | 81 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB16 001 | 82 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB16 002 | 83 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB16 003 | 84 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB17 001 | 85 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB18 001 | 86 | 1 | 0 | 0 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| DB18 002 | 87 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB18 003 | 88 | 0 | 0 | 0 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Opomba: VD - virulentni dejavniki, 1 - pozitiven rezultat, 0 - negativen rezultat.

Priloga B: Preglednica rezultatov analize sevov *E. coli* zbirke BJ; uvrstitev v filogenetske (pod)skupine in prisotnost VD pri vsakem posameznem sevu.

| Oznaka BJ | št. BJ | filog. sk. | filog. podsk. | <i>papGII</i> | <i>papGIII</i> | <i>sfaDE</i> | <i>afa/draBC</i> | <i>cnfI</i> | <i>hlyA</i> | <i>usp</i> | <i>iucD</i> | <i>tcpC</i> | <i>ibeA</i> | <i>fimH</i> | <i>fyuA</i> | <i>ireA</i> | <i>iha</i> | <i>hbp</i> | <i>kpsMT</i> |
|-----------|--------|------------|-----------------|---------------|----------------|--------------|------------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|--------------|
| BJ1 | 1 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ2 | 2 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ3 | 3 | A | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| BJ4 | 4 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ5 | 5 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| BJ6 | 6 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| BJ7 | 7 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ8 | 8 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ9 | 9 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| BJ10 | 10 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| BJ11 | 11 | A | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| BJ12 | 12 | D | D ₁ | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| BJ13 | 13 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ14 | 14 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ15 | 15 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ16 | 16 | A | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ17 | 17 | A | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ18 | 18 | A | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ19 | 19 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| BJ20 | 20 | A | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| BJ21 | 21 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ22 | 22 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ23 | 23 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| BJ25 | 25 | A | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ26 | 26 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| BJ27 | 27 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| BJ28 | 28 | D | D ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| BJ29 | 29 | D | D ₁ | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| BJ30 | 30 | B2 | B2 ₃ | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| BJ31 | 31 | B2 | B2 ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Opomba: VD - virulentni dejavniki, 1 - pozitiven rezultat, 0 - negativen rezultat.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **priloge B**: Preglednica rezultatov analize sevov *E. coli* zbirke BJ; uvrstitev v filogenetske (pod)skupine in prisotnost VD pri vsakem posameznem sevu.

| Oznaka BJ | št. BJ | filog. sk. | filog. podsk. | <i>papGII</i> | <i>papGIII</i> | <i>sfaDE</i> | <i>afa/draBC</i> | <i>cnfI</i> | <i>hlyA</i> | <i>usp</i> | <i>iucD</i> | <i>tcpC</i> | <i>ibeA</i> | <i>fimH</i> | <i>fyuA</i> | <i>ireA</i> | <i>iha</i> | <i>hbp</i> | <i>kpsMT</i> |
|-----------|--------|------------|-----------------|---------------|----------------|--------------|------------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|--------------|
| BJ32 | 32 | B2 | B2 ₃ | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| BJ33 | 33 | B2 | B2 ₃ | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| BJ34 | 34 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| BJ35 | 35 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| BJ36 | 36 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| BJ37 | 37 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ38 | 38 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ39 | 39 | A | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| BJ40 | 40 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ41 | 41 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| BJ42 | 42 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| BJ43 | 43 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ44 | 44 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| BJ45 | 45 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ46 | 46 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ47 | 47 | D | D ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ48 | 48 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ49 | 49 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ50 | 50 | A | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ51 | 51 | B2 | B2 ₃ | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| BJ52 | 52 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| BJ53 | 53 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| BJ54 | 54 | D | D ₂ | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ55 | 55 | A | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ56 | 56 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ57 | 57 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ58 | 58 | B2 | B2 ₃ | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| BJ59 | 59 | A | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ60 | 60 | D | D ₁ | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| BJ61 | 61 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |

Opomba: VD - virulentni dejavniki, 1 - pozitiven rezultat, 0 - za negativen rezultat.

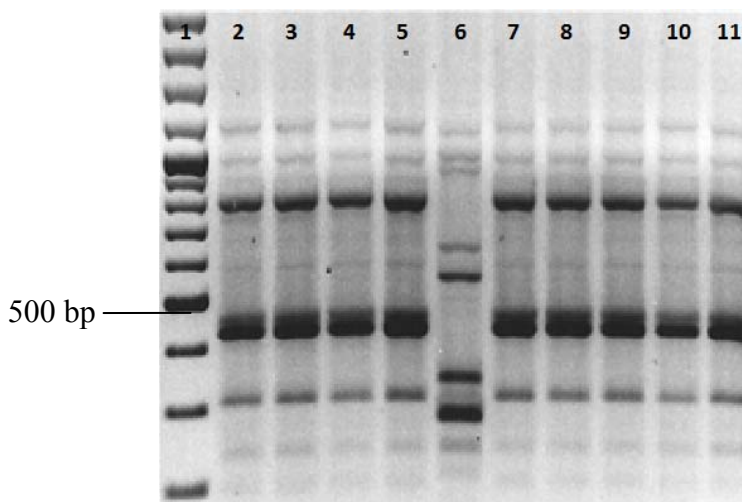
Se nadaljuje

Nadaljevanje **priloge B**: Preglednica rezultatov analize sevov *E. coli* zbirke BJ; uvrstitev v filogenetske (pod)skupine in prisotnost VD pri vsakem posameznem sevu.

| Oznaka BJ | št. BJ | filog. sk. | filog. podsk. | <i>papGI</i> | <i>papGIII</i> | <i>sfaDE</i> | <i>afa/draBC</i> | <i>cnfI</i> | <i>hlyA</i> | <i>usp</i> | <i>iucD</i> | <i>tcpC</i> | <i>ibeA</i> | <i>fimH</i> | <i>fyuA</i> | <i>ireA</i> | <i>iha</i> | <i>hbp</i> | <i>kpsMT</i> |
|-----------|--------|------------|-----------------|--------------|----------------|--------------|------------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|--------------|
| BJ62 | 62 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| BJ63 | 63 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ64 | 64 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ65 | 65 | A | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ66 | 66 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ67 | 67 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| BJ68 | 68 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ69 | 69 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ70 | 70 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| BJ71 | 71 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ72 | 72 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| BJ73 | 73 | A | A ₀ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| BJ74 | 74 | D | D ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ75 | 75 | D | D ₂ | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| BJ76 | 76 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ77 | 77 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ78 | 78 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| BJ79 | 79 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ80 | 80 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ82 | 82 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ83 | 83 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| BJ84 | 84 | B1 | B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ88 | 88 | A | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ89 | 89 | D | D ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ92 | 92 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ93 | 93 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| BJ94 | 94 | D | D ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJ95 | 95 | B2 | B2 ₃ | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| BJ96 | 96 | B2 | B2 ₃ | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| BJ97 | 97 | B2 | B2 ₃ | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |

Opomba: VD - virulentni dejavniki, 1 - pozitiven rezultat, 0 - negativen rezultat.

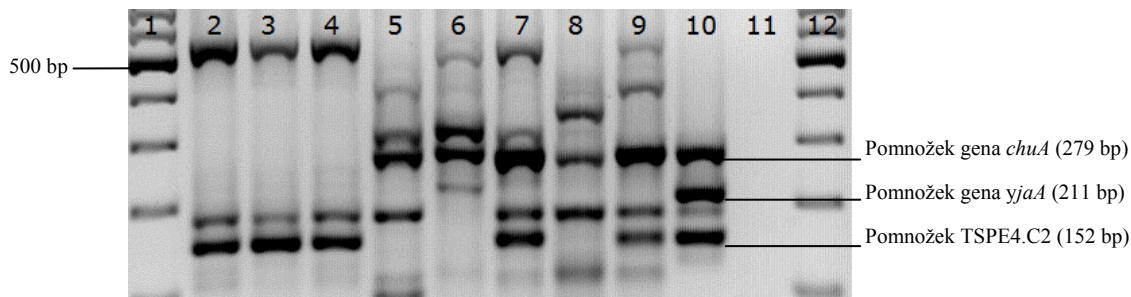
Priloga C: Primeri slik gelov gelskih elektroforez pomnožkov PCR.



Priloga C1: Primer elektroforeze pomnožkov ERIC-PCR izolatov *E. coli* zbirke DB.

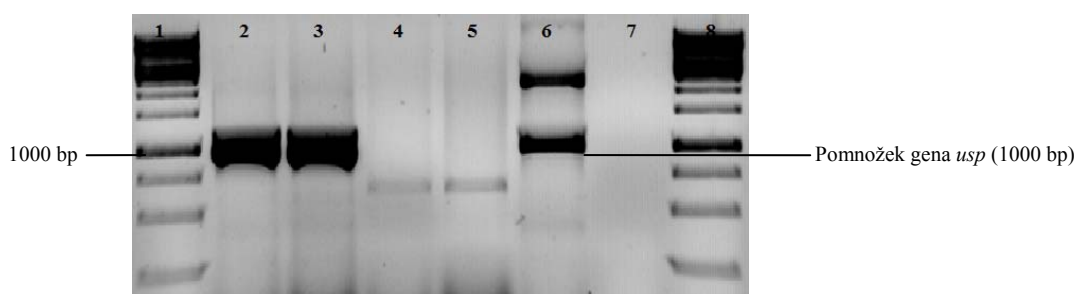
Med izolati iz vzorca DB1 smo našli dva različna ERIC-profila – torej dva različna seva. Izolat DB1-005 (linija 6) se razlikuje od ostalih.

Legenda: 1 - standardna DNA-lestevica 100-bp (Fermentas), 2 - izolat DB1-001, 3 - izolat DB1-002, 4 - izolat DB1-003, 5 - izolat DB1-004, 6 - izolat DB1-005, 7 - izolat DB1-006, 8 - izolat DB1-007, 9 - izolat DB1-008, 10 - izolat DB1-009, 11 - izolat DB1-010.



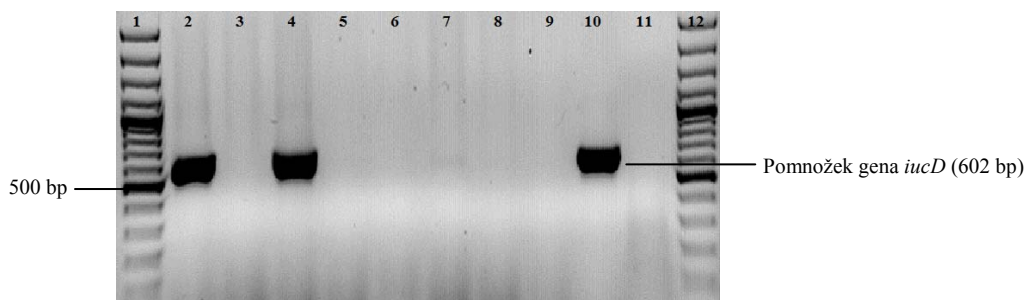
Priloga C2: Primer elektroforeze pomnožkov PCR-reakcije za ugotavljanje filogenetskih (pod)skupin sevov DB.

Legenda: 1 - standardna DNA-lestevica 100-bp (Fermentas), 2 - sev DB9-002 (B₁), 3 - sev DB9-019 (B₁), 4 - sev DB9-013 (B₁), 5 - sev DB9-008 (D₁), 6 - sev DB4-015 (A₀), 7 - sev DB4-021 (D₂), 8 - sev DB4-023 (A₀), 9 - sev DB4-030 (D₂), 10 - sev BJ92 (pozitivna kontrola) (B₂₃), 11 – negativna kontrola (destilirana voda), 12 – standardna DNA – lestevica 100-bp (Fermentas).



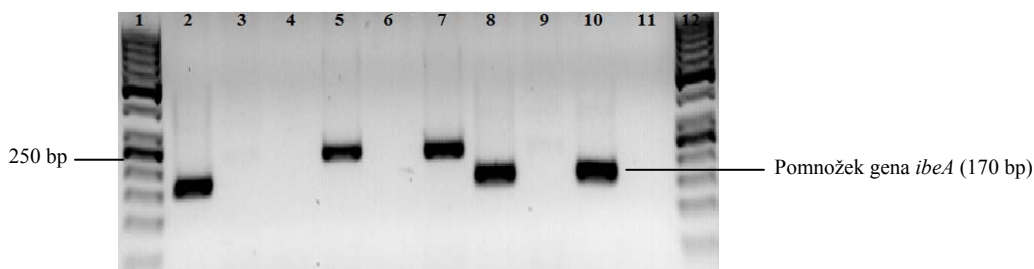
Priloga C3: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *usp* sevov *E. coli* zbirke BD.

Legenda: 1 - standardna DNA-lestvica 1-kbp (Fermentas), 2 - sev DB4-021, 3 - sev DB3-015, 4 - sev DB3-001, 5 - sev DB3-008, 6 - *E. coli* BJ12 (pozitivna kontrola), 7 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 8 - standardna DNA-lestvica 1-kbp (Fermentas).



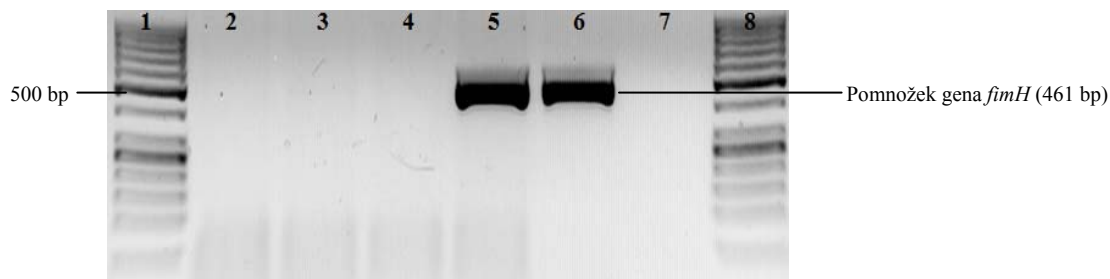
Priloga C4: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *iucD* sevov *E. coli* zbirke DB.

Legenda: 1 - standardna DNA-lestvica 100-bp (Fermentas), 2 - sev DB14-001, 3 - sev DB14-002, 4 - sev DB14-003, 5 - sev DB1-004, 6 - sev DB15-001, 7 - sev DB15-002, 8 - sev DB15-003, 9 - sev DB15-004, 10 - *E. coli* BJ2 (pozitivna kontrola), 11 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 12 - standardna DNA-lestvica 100-bp (Fermentas).



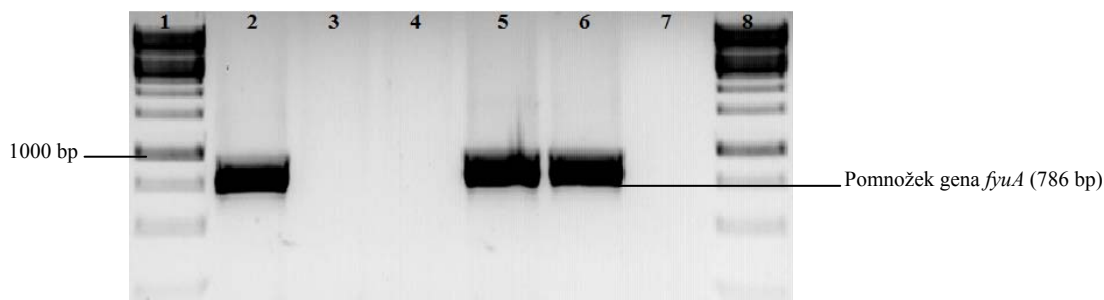
Priloga C5: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *ibeA* sevov *E. coli* zbirke DB.

Legenda: 1 - standardna DNA-lestvica 50-bp (Fermentas), 2 - sev DB5-021, 3 - sev DB5-013, 4 - sev DB5-019, 5 - sev DB5-015, 6 - sev DB5-014, 7 - sev DB5-005, 8 - sev DB2-001, 9 - sev DB2-010, 10 - *E. coli* BJ9 (pozitivna kontrola), 11 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 12 - standardna DNA-lestvica 50-bp (Fermentas).



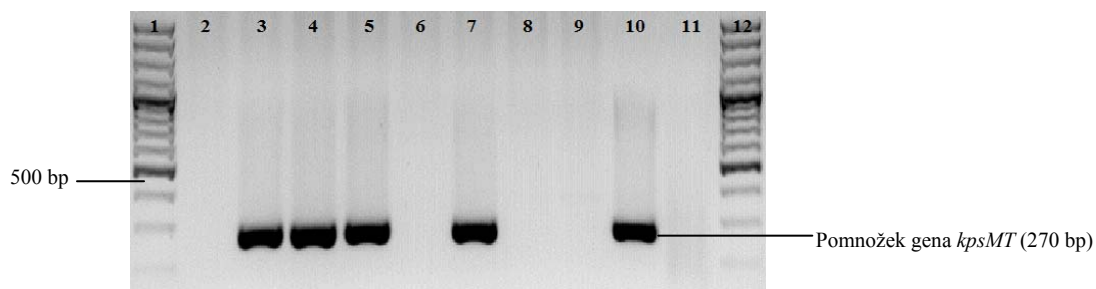
Priloga C6: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *fimH* sevov *E. coli* zbirke DB.

Legenda: 1 - standardna DNA-lestvica 50-bp (Fermentas), 2 - sev DB3-010, 3 - sev DB3-009, 4 - sev DB3-001, 5 - sev DB3-008, 6 - *E. coli* BJ50 (pozitivna kontrola), 7 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 8 - standardna DNA-lestvica 50-bp (Fermentas).



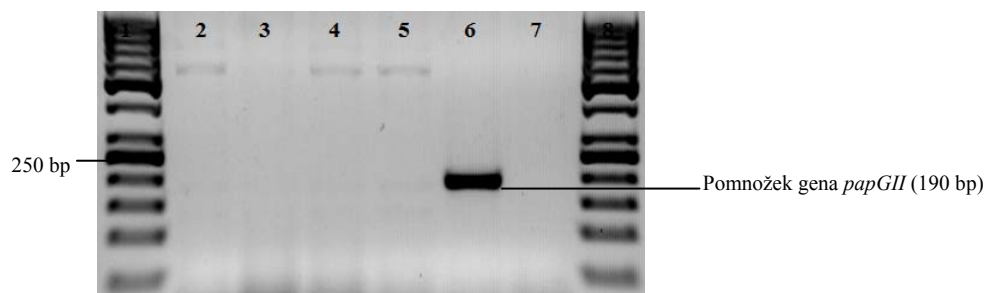
Priloga C7: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *fyuA* sevov *E. coli* zbirke DB.

Legenda: 1 - standardna DNA-lestvica 1-kbp (Fermentas), 2 - sev DB3-010, 3 - sev DB3-009, 4 - sev DB3-001, 5 - sev DB3-008, 6 - *E. coli* BJ1 (pozitivna kontrola), 7 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 8 - standardna DNA-lestvica 1-kbp (Fermentas).



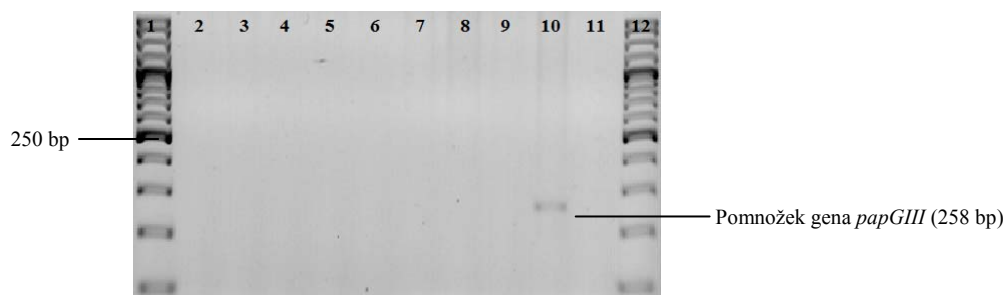
Priloga C8: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *kpsMT* sevov *E. coli* zbirke DB.

Legenda: 1 - standardna DNA-lestvica 100-bp (Fermentas), 2 - sev DB15-005, 3 - sev DB16-001, 4 - sev DB16-002, 5 - sev DB16-003, 6 - sev DB17-001, 7 - sev DB18-001, 8 - sev DB18-002, 9 - sev DB18-003, 10 - *E. coli* BJ72 (pozitivna kontrola), 11 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 12 - standardna DNA-lestvica 100-bp (Fermentas).



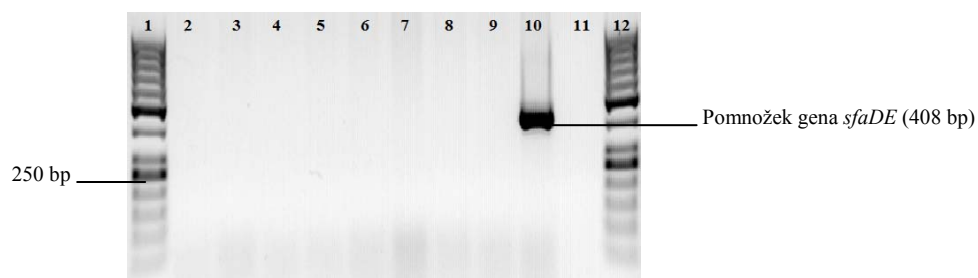
Priloga C9: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *papGII* sevov *E. coli* zbirke DB.

Legenda: 1 - standardna DNA-lestvica 50-bp (Fermentas), 2 - sev DB3-010, 3 - sev DB3-009, 4 - sev DB3-001, 5 - sev DB3-008, 6 - *E. coli* BJ12 (pozitivna kontrola), 7 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 8 - standardna DNA-lestvica 50-bp (Fermentas).



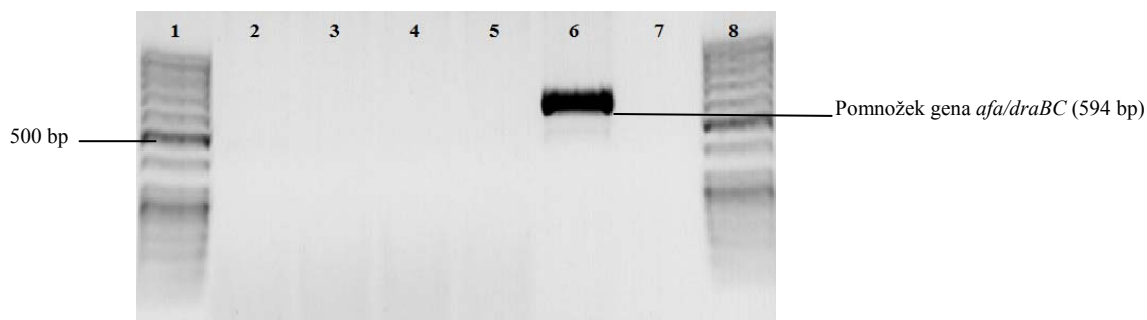
Priloga C10: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *papGIII* sevov *E. coli* zbirke DB.

Legenda: 1 - standardna DNA-lestvica 50-bp (Fermentas), 2 - sev DB5-021, 3 - sev DB5-013, 4 - sev DB5-019, 5 - sev DB5-015, 6 - sev DB5-014, 7 - sev DB5-005, 8 - sev DB2-001, 9 - sev DB2-010, 10 - *E. coli* BJ32 (pozitivna kontrola), 11 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 12 - standardna DNA-lestvica 50-bp (Fermentas).



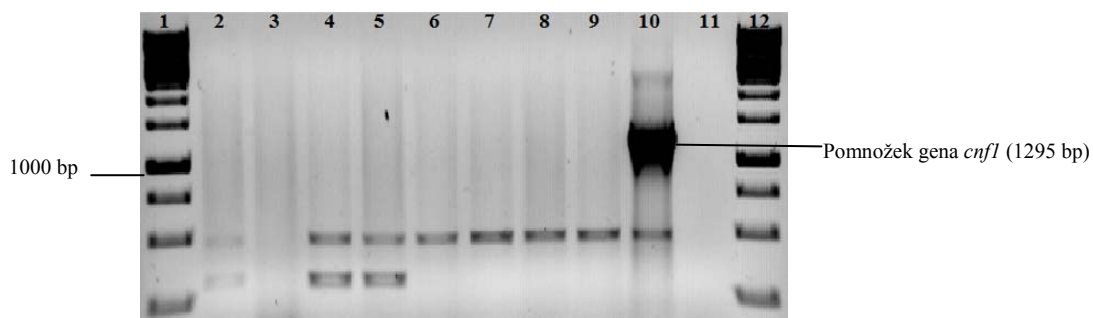
Priloga C11: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *sfaDE* sevov *E. coli* zbirke DB.

Legenda: 1 - standardna DNA-lestvica 50-bp (Fermentas), 2 - sev DB5-021, 3 - sev DB5-013, 4 - sev DB5-019, 5 - sev DB5-015, 6 - sev DB5-014, 7 - sev DB5-005, 8 - sev DB2-001, 9 - sev DB2-010, 10 - *E. coli* BJ32 (pozitivna kontrola), 11 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 12 - standardna DNA-lestvica 50-bp (Fermentas).



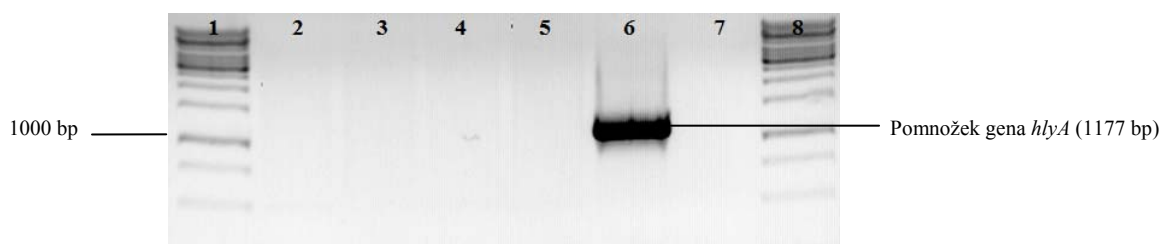
Priloga C12: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *afa/draBC* sevov *E. coli* zbirke DB.

Legenda: 1 - standardna DNA-lestevica 50-bp (Fermentas), 2 - sev DB3-010, 3 - sev DB3-009, 4 - sev DB3-001, 5 - sev DB3-008, 6 - *E. coli* BJ54 (pozitivna kontrola), 7 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 8 - standardna DNA-lestevica 50-bp (Fermentas).



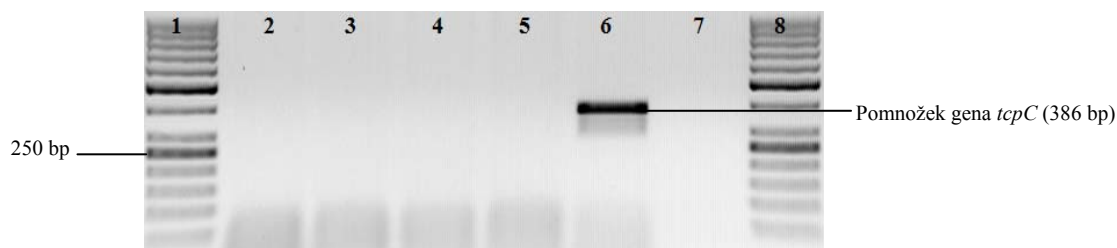
Priloga C13: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *cnfI* sevov *E. coli* zbirke DB.

Legenda: 1 - standardna DNA-lestevica 1-kbp (Fermentas), 2 - sev DB2-021, 3 - sev DB2-019, 4 - sev DB2-006, 5 - sev DB2-002, 6 - sev DB3-015, 7 - sev DB3-011, 8 - sev DB3-021, 9 - sev DB3-004, 10 - *E. coli* BJ32 (pozitivna kontrola), 11 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 12 - standardna DNA-lestevica 1-kbp (Fermentas).



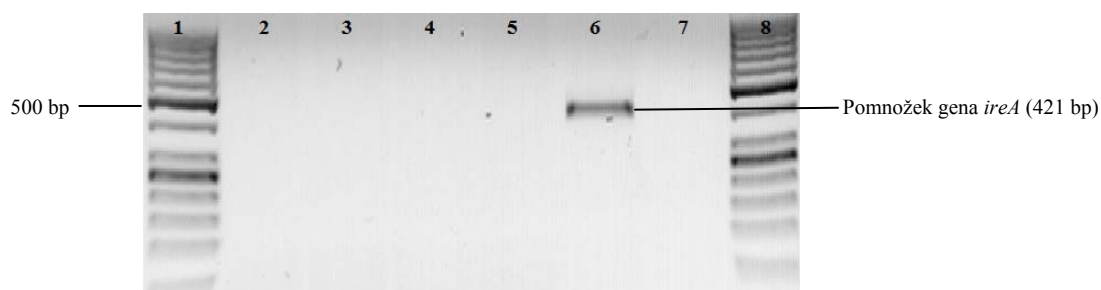
Priloga C14: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *hlyA* sevov *E. coli* zbirke DB.

Legenda: 1 - standardna DNA-lestevica 1-kbp (Fermentas), 2 - sev DB3-010, 3 - sev DB3-009, 4 - sev DB3-001, 5 - sev DB3-008, 6 - *E. coli* BJ30 (pozitivna kontrola), 7 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 8 - standardna DNA-lestevica 1-kbp (Fermentas).



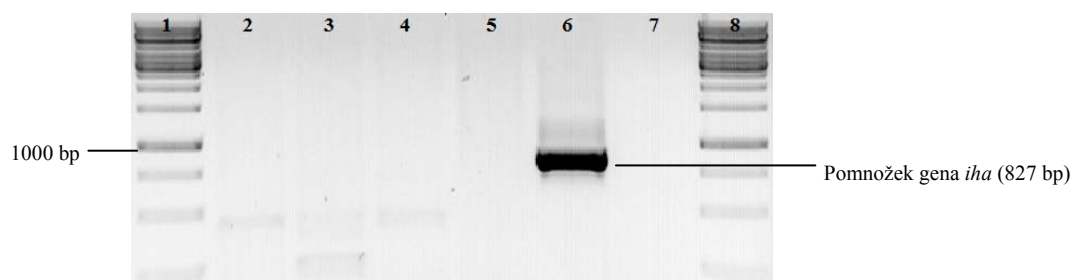
Priloga C15: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *tcpC* sevov *E. coli* zbirke DB.

Legenda: 1 - standardna DNA-lestvica 50-bp (Fermentas), 2 - sev DB3-010, 3 - sev DB3-009, 4 - sev DB3-001, 5 - sev DB3-008, 6 - *E. coli* BJ33 (pozitivna kontrola), 7 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 8 - standardna DNA-lestvica 50-bp (Fermentas).



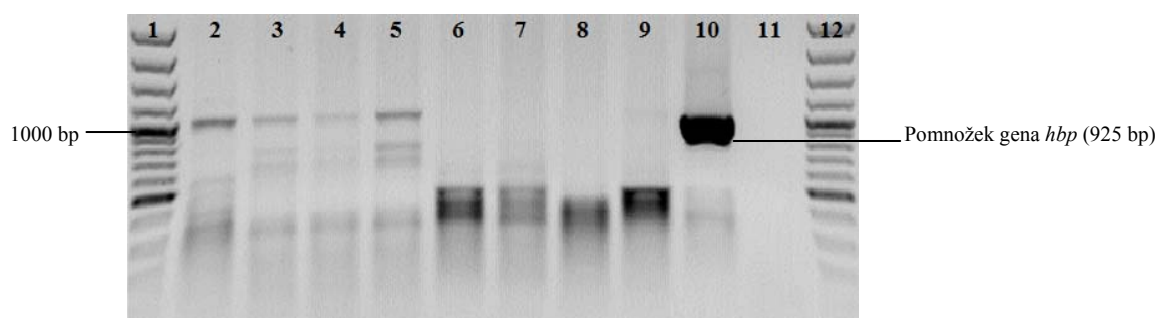
Priloga C16: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *ireA* sevov *E. coli* zbirke DB.

Legenda: 1 - standardna DNA-lestvica 50-bp (Fermentas), 2 - sev DB3-010, 3 - sev DB3-009, 4 - sev DB3-001, 5 - sev DB3-008, 6 - *E. coli* BJ11 (pozitivna kontrola), 7 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 8 - standardna DNA-lestvica 50-bp (Fermentas).



Priloga C17: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *iha* sevov *E. coli* zbirke DB.

Legenda: 1 - standardna DNA-lestvica 1-kbp (Fermentas), 2 - sev DB3-010, 3 - sev DB3-009, 4 - sev DB3-001, 5 - sev DB3-008, 6 - *E. coli* BJ11 (pozitivna kontrola), 7 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 8 - standardna DNA-lestvica 1-kbp (Fermentas).



Priloga C18: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *hbp* sevov *E. coli* zbirke DB.

Legenda: 1 - standardna DNA-lestvica 100-bp (Fermentas), 2 – sev DB15-005 , 3 - sev DB16-001, 4 – sev DB16-002, 5 - sev DB16-003, 6 - sev DB17-001, 7 - sev DB18-001, 8 - sev DB18-002, 9 - sev DB18-003, 10 - *E. coli* BJ70 (pozitivna kontrola), 11 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 12 - standardna DNA-lestvica 100-bp (Fermentas).

Priloga D: Občutljivost za antibiotike sevov *E. coli* zbirke DB.

| Oznaka DB | Sm | Ap | Tc | Nal | Oznaka DB | Sm | Ap | Tc | Nal | Oznaka DB | Sm | Ap | Tc | Nal |
|-----------|-----------|-----------|----------|---------|-----------|-----------|-----------|----------|---------|-----------|-----------|-----------|----------|---------|
| | 100 µg/mL | 100 µg/mL | 10 µg/mL | 5 µg/mL | | 100 µg/mL | 100 µg/mL | 10 µg/mL | 5 µg/mL | | 100 µg/mL | 100 µg/mL | 10 µg/mL | 5 µg/mL |
| DB1 005 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB4 009 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB13 003 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB7 014 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB4 025 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB6 001 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB7 002 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB5 002 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB6 002 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB7 010 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB5 025 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB6 003 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB7 006 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB5 012 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB10 001 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB7 009 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB5 021 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB10 002 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB7 001 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB5 013 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB10 003 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB8 020 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB5 019 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB10 004 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB9 006 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB5 015 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB11 001 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB9 002 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB5 014 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB11 002 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB9 019 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB5 005 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB11 003 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB9 013 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB2 001 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB11 004 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB9 008 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB2 010 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB14 001 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| DB4 015 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB2 021 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB14 002 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 021 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB2 019 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB14 003 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| DB4 023 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB2 006 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB14 004 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 030 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB2 002 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB15 001 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 001 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB3 015 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB15 002 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 011 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB3 011 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB15 003 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 028 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB3 021 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB15 004 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 020 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB3 004 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB15 005 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 029 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB3 012 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB16 001 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 002 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB3 009 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB16 002 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 004 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB3 001 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB16 003 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 006 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB3 008 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB17 001 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 007 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB12 005 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB18 001 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 013 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB12 006 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB18 002 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 016 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB13 001 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB18 003 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DB4 026 | 0 | 0 | 0 | 0 | DB13 002 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |

Opomba: 0 – ni rasti; 1 – rast; Sm – streptomycin; Ap – ampicilin; Tc – tetraciklin; Nal – nalidiksična kislina.

Barbič D. Virulentni dejavniki sevov bakterije *Escherichia coli* izoliranih iz blata prostoživečih medvedov in medvedov v ujetništvu.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2012
