

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Matija BUDIČ

**VIRULENTNI DEJAVNIKI SEVOV BAKTERIJE
Escherichia coli IZOLIRANIH IZ BLATA GOVEDA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Matija BUDIČ

**VIRULENTNI DEJAVNIKI SEVOV BAKTERIJE *Escherichia coli*
IZOLIRANIH IZ BLATA GOVEDA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**VIRULENT FACTORS OF *Escherichia coli* ISOLATES FROM FECES
OF CATTLE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

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

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega študija mikrobiologije z dne 29.5.2009 je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Darja Žgur-Bertok, za somentorico doc. dr. Marjanca Starčič Erjavec ter za recenzentko doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja.

Mentorica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Somentorica: doc. dr. Marjanca Starčič Erjavec

Recenzentka: doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Marjanca Starčič Erjavec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

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

Matija Budič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠD Dn
- DK UDK 579.25 + 579.64 : 577.2.083 (043) = 163.6
- KG *Escherichia coli*/filogenetske skupine/virulentni dejavniki/kolicini/fagi/PCR
- AV BUDIČ, Matija
- SA ŽGUR-BERTOK, Darja (mentorica)/ STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (somentorica)/ HERZOG VELIKONJA, Blagajana (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2011
- IN VIRULENTNI DEJAVNIKI SEVOV BAKTERIJE *Escherichia coli* IZOLIRANIH IZ BLATA GOVEDA
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XI, 46 str., 11 pregl., 10 sl., 1 pril., 45 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Bakterije *E. coli* so del mikrobiote živali s stalno telesno temperaturo in ljudi ter večinoma ne povzročajo okužb. Nekateri sevi so patogeni in povzročajo črevesne in zunajčrevesne okužbe. Sposobnost, da sevi vrste *E. coli* povzročijo bolezen, je odvisna od genskih zapisov za različne virulentne dejavnike, ki bakterijam omogočajo kolonizacijo gostiteljskih celic, vdor, preživetje in izločanje toksinov. V tem diplomskem delu smo preučevali zbirko 34 izolatov, ki so bili izolirani iz blata zdravega goveda na kmetijah v okolici Ljubljane. Z metodo verižne reakcije s polimerazo smo vse izolate uvrstili v filogenetske skupine, preverili smo tudi gene za virulentne dejavnike, ki so značilni za seve EHEC in tudi gene za nekatere druge virulentne dejavnike, ki so značilni za druge patotipe *E. coli*. Ugotavljali smo genetske zapise za Šigove toksine *stx1* in *stx2*, jersinijabaktin *fyuA*, citotoksični nekrotizirajoči dejavnik *cnf1*, intimin *eaeA*, enterohemolizin *EHEC hlyA*, flagelin serotipa O157:H7 *fliC H7* in inhibitorni faktor celičnega cikla *cif-int*. Pomemben del naloge je bil tudi ugotavljanje lizogenih fagov in kolicinov. Med vsemi 34 izolati smo jih 9 (23 %) uvrstili v skupino A, 13 (33 %) v skupino B1, 5 (13 %) v skupino B2 in 12 (31 %) v skupino D. Gen za Šigove toksine *stx2* je bil prisoten v 4 izolatih naše zbirke, kar predstavlja skoraj 10 % vseh preučevanih izolatov *E. coli*, kar pomeni visok odstotek med zdravo populacijo. Podatek je v neki meri kar zaskrbljujoč in daje še posebno pozornost sami pripravi prehrane in rokovanju z mesom. Prisotnost lizogenih fagov je bila dokazana pri 5 (13 %) izolatih *E. coli* naše zbirke. Vendar so bili lizogeni fagi dokazani le pri 3 izolatih iz naše zbirke, ki so bili tudi pozitivni za *stx2*.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

- ND Dn
- DC UDC 579.25 + 579.64 : 577.2.083 (043) = 163.6
- CX *Escherichia coli*/phylogenetic groups/virulence factors/colicins/phages/PCR
- AU BUDIČ, Matija
- AA ŽGUR-BERTOK, Darja (supervisor)/ STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (co-advisor)/ HERZOG VELIKONJA, Blagajana (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2011
- TI VIRULENT FACTORS OF *Escherichia coli* ISOLATES FROM FECES OF CATTLE
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO XI, 46 p., 11 tab., 10 fig., 1 ann., 45 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Bacteria *E. coli* are part of the microbiota of warm-blooded animals and humans and most do not cause infections. Some strains are pathogenic and cause intestinal and extra-intestinal infections. The ability of *E. coli* strains to cause disease depends on the genes encoding different virulence factors that allow bacteria to colonize host cells, invade, survive and produce toxins. In this thesis we studied a collection of 39 isolates, that were isolated from stools of healthy cattle and horses on farms in the vicinity of Ljubljana. With the method of polymerase chain reaction all isolates were classified into phylogenetic groups and also tested for virulence factor genes that are characteristic for EHEC strains and some other virulence factor genes that are characteristic for other *E. coli* pathotypes. We assessed the genes coding for the Shiga toxins *stx1* and *stx2*, yersiniabactin *fyuA*, cytotoxic necrotizing factor *cnf1*, *eaeA* intimin, EHEC *hlyA* enterohemolysine, flagellin of the serotype O157:H7 *fliCH7* and inhibitory factor of cell cycle *cif-int*. An important part of the study was also to identify lysogenic phages and colicins. Among all 39 isolates 9 (23%) were classified into group A, 13 (33%) into group B1, 5 (13%) into group B2 and 12 (31%) into group D. Shiga toxin gene *stx2* was present in 4 isolates in our collections, representing almost 10% of all isolates, which means a high percentage of the healthy population. Data are in some sense worrying and give special attention to food preparation and handling of meat. The presence of lysogenic phages was demonstrated in 5 (13%) isolates of *E. coli* in our collection. However, lysogenic phages were demonstrated in only three isolates from our collection, which were also positive for *stx2*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG.....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA.....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJA <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.1 Enterohemoragična <i>E. coli</i>	4
2.1.2 O157:H7.....	5
2.1.3 "non-O157:H7"	5
2.2 VIRULENTNI DEJAVNIKI.....	6
2.2.1 Šigovi toksini	6
2.2.2 Intimin	7
2.2.3 Enterohemolizin.....	7
2.2.4 Flageli.....	8
2.2.5 Faktor inhibicije celičnega cikla.....	9
2.2.6 Jersinijabaktin	9
2.2.7 Citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1 (CNF1)	10
2.3 KOLICINI	10
2.4 BAKTERIOFAGI.....	11
2.5 FILOGENETSKE SKUPINE.....	12

3	MATERIAL IN METODE	15
3.1	MATERIAL	15
3.1.1	Bakterijski sevi	15
3.1.1.1	Laboratorijski sevi	15
3.1.1.2	Izolati <i>E. coli</i>	15
3.1.2	Gojišča	15
3.1.2.1	Priprava tekočih gojišč Luria-Bertani (LB).....	15
3.1.2.2	Priprava trdnih gojišč LB	15
3.1.2.3	Priprava gojišč MacConkey-agar	16
3.1.2.4	Priprava gojišč MacConkey-sorbitol-agar	16
3.1.2.5	Priprava gojišč za test IMVC	16
3.1.3	Kemikalije	17
3.1.4	Pufri in reagenti	18
3.1.4.1	Agarozna gelska elektroforeza	18
3.1.5	Oprema	18
3.2	METODE	19
3.2.1	Gojenje izolatov	19
3.2.2	Preverjanje izolatov	19
3.2.3	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	19
3.2.3.1	Priprava lizatov	19
3.2.3.2	Začetni oligonukleotidi za PCR.....	20
3.2.3.3	Reakcijska mešanica za PCR.....	21
3.2.3.4	Pogoji pomnoževanja s PCR	22
3.2.4	Agarozna gelska elektroforeza	24
3.2.5	Določanje kolicinogenosti izolatov <i>E. coli</i>	25
3.2.6	Indukcija lizogenih fagov z UV	25
3.2.7	Statistične metode	26
4	REZULTATI	27
4.1	ZBIRKA IZOLATOV	27
4.2	PREVALENCA FILOGENETSKIH SKUPIN	27

4.3	PREVALENCA VIRULENTNIH DEJAVNIKOV	29
4.4	SINTEZA KOLICINOV	33
4.5	PRISOTNOST LIZOGENIH FAGOV.....	33
4.6	STATISTIČNA ANALIZA.....	34
5	RAZPRAVA	35
6	SKLEPI	39
7	POVZETEK.....	40
8	VIRI	42

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razdelitev <i>E. coli</i> v filogenetske skupine (Escobar-Páramo in sod., 2004)	13
Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi uporabljeni pri PCR.....	20
Preglednica 3: Sestava reakcijske mešanice za PCR pri določevanju filogenetskih podskupin	21
Preglednica 4: Sestava reakcijske mešanice za PCR pri določanju <i>fyuA</i> in <i>fliCH7</i>	21
Preglednica 5: Sestava reakcijske mešanice za PCR pri določanju <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>cif</i> , <i>eaeA</i> in EHEC <i>hlyA</i>	22
Preglednica 6: Sestava reakcijske mešanice za PCR pri določanju <i>cnf1</i>	22
Preglednica 7: Uvrstitev izolatov <i>E. coli</i> v filogenetske skupine	27
Preglednica 8: Uvrstitev izolatov <i>E. coli</i> v filogenetske podskupine	28
Preglednica 9: Prevalenca virulentnih dejavnikov izolatov naše zbirke.....	29
Preglednica 10: Porazdelitev virulentnih dejavnikov, kolicinogenost in prisotnost fagov glede na filogenetske skupine.....	34
Preglednica 11: Porazdelitev <i>fyuA</i> in <i>stx2</i> glede na kolicinogenost in prisotnost fagov....	34

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz določevanja filogenetskih skupin, na podlagi pomnoževanja specifičnih produktov PCR (Escobar-Páramo in sod., 2004).....	14
Slika 2: Gelska elektroforeza produktov PCR za določanje filogenetskih skupin	28
Slika 3: Gelska elektroforeza produktov PCR za določanje pomnožkov <i>fyuA</i>	30
Slika 4: Gelska elektroforeza produktov PCR za določanje pomnožkov <i>cnf1</i>	30
Slika 5: Gelska elektroforeza produktov PCR za določanje pomnožkov <i>stx1</i>	31
Slika 6: Gelska elektroforeza produktov PCR za določanje pomnožkov <i>stx2</i>	31
Slika 7: Gelska elektroforeza produktov PCR za določanje pomnožkov <i>fliC</i> H7	32
Slika 8: Gelska elektroforeza produktov PCR za določanje pomnožkov <i>eaeA</i>	32
Slika 9: Gelska elektroforeza produktov PCR za določanje pomnožkov EHEC <i>hlyA</i>	32
Slika 10: Gelska elektroforeza produktov PCR za določanje pomnožkov <i>cif</i>	33

KAZALO PRILOG

Priloga A: Zbirka izolatov *E. coli* izoliranih iz blata goveda.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp	bazni par
CNF	citotoksični nekrotizirajoči dejavnik
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dsDNA	dvoverižna deoksiribonukleinska kislina
dsRNA	dvoverižna ribonukleinska kislina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EAggEC	enteroagregativni sevi <i>Escherichia coli</i>
EHEC	enterohemoragični sevi <i>Escherichia coli</i>
EIEC	enteroinvazivni sevi <i>Escherichia coli</i>
EPEC	enteropatogeni sevi <i>Escherichia coli</i>
ETEC	enterotoksigeni sevi <i>Escherichia coli</i>
EtBr	etidijev bromid
ExPEC	zunajčrevesni patogeni sevi <i>Escherichia coli</i>
IL	interlevkin
kDa	kilodalton
kb	kilobaza
kbp	kilobazni par
LB	gojišče Luria-Bertani
ORF	odprt bralni okvir
PCR	verižna reakcija s polimerazo
RNA	ribonukleinska kislina
ssDNA	enoverižna deoksiribonukleinska kislina
ssRNA	enoverižna ribonukleinska kislina
STEC	sevi <i>Escherichia coli</i> , ki sinterizirajo Šigove toksine
STX	Šigovi toksini
TBE	Tris-borat EDTA
TNF	dejavnik tumorske nekroze
TTSS	sistem izločanja tipa III
VP	gojišče Voges-Proskaur

1 UVOD

Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) je del mikrobiote v prebavilih živali s stalno telesno temperaturo in ljudi ter večinoma ne povzroča okužb. Nekateri sevi so patogeni in povzročajo črevesne in zunajčrevesne okužbe.

V svetovnem merilu so patogeni sevi *E. coli* med poglavitnimi povzročitelji črevesnih okužb. Sevi skupine enterohemoragične *E. coli* (EHEC) povzročajo hemoragični kolitis in hemolitični uremični sindrom z akutno odpovedjo ledvic. Proizvajajo citoksine, ki inhibirajo sintezo proteinov in adhezine, ki omogočajo pritrditev na celice epitela prebavnega trakta. Poglavitni rezervoar sevov EHEC so zdravi prežvekovalci. Do okužbe pri ljudeh običajno pride ob zaužitju okužene hrane, vode ali pri telesnem stiku z okuženo osebo. Za okužbo je značilna majhna infektivna mera (manj kot 100 bakterijskih celic).

Da so lahko sevi *E. coli* sposobni povzročiti okužbe oz. so patogeni, je odvisno od zapisov za različne virulentne dejavnike značilne za seve EHEC, kot so Šigovi toksini *stx1*, *stx2*; citotoksični nekrotizirajoči dejavnik *cnf1*, ter sistemi za prevzem železa. Pomembna je tudi zmožnost sinteze bakteriocinov *E. coli*, kolicinov, kot tudi okuženost z bakteriofagi, ki predstavljajo možnost prenosa genov za virulentne dejavnike med sevi *E. coli*.

1.1 NAMEN DELA

Cilj diplomskega dela je bil pripraviti zbirko izolatov bakterije *E. coli* izoliranih iz iztrebkov zdravega goveda s kmetij, ki se nahajajo v okolici Ljubljane in z biološkimi testi ter z verižno reakcijo s polimerazo določiti v izoliranih sevih nabor virulentnih dejavnikov, ki ga povezujejo z enterohemoragičnimi sevi *E. coli* (Šigovi toksini, jersinijabaktin, citotoksični nekrotizirajoči dejavnik, intimin, enterohemolizin, flagelin serotipa O157:H7 in inhibitorni faktor celičnega cikla) ter vsem izolatom določiti tudi sposobnost tvorjenja kolicinov in vsebnost lizogenih fagov.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Naše predpostavke so bile sledeče:

- Pri izolatih *E. coli* izoliranih iz iztrebkov zdravega goveda iz Slovenije najdemo seve iz skupine EHEC.
- Poleg sinteze toksinov je ključna tudi sinteza sistemov prevzema železa, katerega bakterije potrebujejo za svojo rast.
- Patogeni sevi *E. coli* so pogosto lizogeni za bakteriofage, saj so le-ti lahko vektorji prenosa genetskih zapisov za sintezo virulentnih dejavnikov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJA *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) je po Gramu negativna bakterija paličaste oblike, poimenovana po nemškem pediatru Teodorju Escherichu, ki jo je leta 1884 odkril. Celice so velike med 2 in 3 μm , široke približno 0,5 μm . Uvrščamo jo med γ -proteobakterije in sicer v družino *Enterobacteriaceae* (Madigan in sod., 2003).

Bakterija *E. coli* je fakultativni anaerob in ni sposobna sporulacije. Bakterije so komenzali in so del normalne črevesne flore ljudi in živali. Živi v črevesju človeka in drugih živali s stalno telesno temperaturo, najdemo jo tudi v zemlji in vodi. Prebavni trakt novorojenčka kolonizira v prvih urah po porodu. V prebavilih štiti pred vdorom patogenih bakterij in sintetizira vitamin K ter vitamine skupine B (Madigan in sod., 2003; Nataro in Kaper, 1998).

Lahko raste na veliko različnih substratih, energijo pridobiva tako z respiratornim, kot tudi s fermentativnim metabolizmom. V anaerobnih pogojih izrablja mešanokislinsko fermentacijo, pri kateri nasatajajo laktat, sukcinat, etanol, acetat in CO_2 . Optimalno raste pri 37 °C, nekateri laboratorijski sevi lahko zrastejo tudi pri višjih temperaturah (vse do 49 °C). Največkrat jo gojimo na MacConkey-agarju, ki je selektivno gojišče za predstavnike družine *Enterobacteriaceae* (Madigan in sod., 2003; Nataro in Kaper, 1998).

Večinoma so sevi *E. coli* gibljivi in imajo peritrihe bičke. Za pritrjevanje na gostiteljske celice imajo nekateri sevi tudi fimbrije. Nekateri sevi imajo tudi, ki sodelujejo pri izmenjavi genskega materiala med dvema celicama (Madigan in sod., 2003).

Dolžina genoma *E. coli*, ki je krožne oblike, je $4,64 \times 10^6$ bp in ima zapis za več kot 4000 genov. Vsebnost G:C parov je med 49 in 52 odstotkov. Pogosti so tudi izvenkromosomski elementi DNA ali plazmidi. Pogost je tudi prenos DNA in plazmidov med sevi s pomočjo

konjugacije, transdukcije in transformacije, kar omogoča hiter prenos dednega materiala v populaciji (Blattner in sod., 1997; Madigan in sod., 2003).

Nekateri sevi *E. coli* so lahko tudi patogeni za ljudi in živali, saj sintetizirajo tako imenovane virulentne dejavnike, ki omogočajo kolonizacijo, vdor ter preživetje v gostiteljskih celicah. Patogeni sevi povzročajo različna obolenja in največkrat povzročajo infekcije urinarnega trakta, sepso, meningitis, pljučnico, vnetje rodil in različne oblike drisk. Glede na mehanizem patogeneze ločimo enterotoksigene (ETEC), enteropatogene (EPEC), enterohemoragične (EHEC), enteroinvazivne (EIEC) in enteroagregativne (EAaggEC) seve *E. coli*. Sevi, ki povzročajo bolezni izven prebavnega trakta, so t. i. ekstraintestinalni patogeni sevi *E. coli* ali ExPEC (Andlovic, 2002; Bekal in sod., 2003).

2.1.1 Enterohemoragična *E. coli*

Enterohemoragične *E. coli* (EHEC) predstavljajo podmnožico serotipov (*E. coli* O157 in druge seroskupine), ki sintetizirajo Šigove toksine (Stx), poimenovane kot STEC. Medtem ko sevi STEC niso vsi patogeni, sevi EHEC so. Seve EHEC povezujemo z različnimi obolenji pri ljudeh, kot so hemoragični kolitis, krvava driska in hemolitični uremični sindrom z ledvično odpovedjo in nevrološki zapleti. Sinteza Šigovih toksinov je nujna, vendar ni zadostna za virulenco sevov EHEC. Večina sevov je sposobna kolonizacije črevesja gostitelja s svojimi mehanizmi za pritrditev (Caprioli in sod., 2005; Nataro in Kaper, 1998).

Sevi EHEC so zoonozni patogeni. Zelo redko povzročajo bolezni pri živalih. Prežvekovalci so njihov največji naravni rezervoar. Govedo je najpogostejši vir okužbe ljudi. Do okužb prihaja preko premalo prekuhane okužene hrane (mesa) in tudi vode. Poleg goveda, so seve EHEC našli tudi pri drugih živalih, kot so konji, ovce, koze in jelenjad. Znanje o načinu prenosa in predelavi hrane, je v zadnjih 20 letih veliko pripomoglo k zmanjšanju pojavnosti obolenj (Caprioli in sod., 2005).

Večina primerov bolezni je povezanih s sevi serotipa O157:H7, vendar so infekcije povezane tudi z drugimi serotipi, kot so O26, O111, O103 in O145, ki jih velikokrat označujejo tudi kot "non-O157 EHEC". Sevi EHEC so visoko patogeni. Za okužbo je

značilna zelo majhna infekcijska doza, manj kot 100 bakterij (Reid in sod., 1991; Nataro in Kaper 1998).

2.1.2 O157:H7

Sev O157:H7 je napogostejši in najbolj proučen predstavniki EHEC. Sev so odkrili leta 1982, ko so preučevali dva izbruha krvave driske. Okužbo so povezali s slabo pripravljenimi hamburgerji. V zadnjih letih so ugotovili, da se sev zelo pogosto pojavlja v blatu bolnikov s hemoragičnim kolitisom, hkrati ga niso odkrili v blatu zdravih oseb (Griffin in Tauxe, 1991).

S črko "O" zapisujemo somatski antigen, medtem ko črka "H" označuje flagelarne antigene. Za razliko od večine *E. coli*, sevi O157:H7 ne fermentirajo sorbitola in ne sintetizirajo β -glukuronidaze, hkrati zelo slabo rastejo pri temperaturah višjih od 41 °C, tako da jih ni mogoče odkriti s standardnimi metodami za odkrivanje koliformnih bakterij v vodi ali hrani (Raghubeer in Matches, 1990)

Patogeneza O157:H7 še ni do potankosti raziskana. Mehanizmi virulence se razlikujejo od tistih pri sevih EPEC, ETEC ali EIEC. Študije so pokazale, da ni prisotnega ogromnega vdora in velikega znotrajceličnega pomnoževanja. Za virulenco so predvsem pomembni mehanizmi pritrjevanja in sinteze Šigovih toksinov (Griffin in Tauxe, 1991).

2.1.3 "non-O157:H7"

Tudi drugi sevi EHEC povzročajo veliko zdravstvenih problemov. Zelo težko je natančno oceniti v kakšni meri so ti sevi patogeni, saj ni natančnih selektivnih gojišč, ki bi določile njihovo prisotnost. Poleg tega je prepoznavanje pravih patogenov v skupini zelo težko, saj sami geni za Šigove toksine ponavadi niso zadostni in so za patogenost nujni tudi drugi virulentni dejavniki, nekateri že poznani, drugi še ne (Griffin in Tauxe, 1991).

Najpogostejše serotipe "non-O157:H7", ki tudi povzročajo krvavo drisko in hemoragični uremični sindrom (HUS) uvrščamo med O26:H7, O103:H2, O111:NM in O113:H21. O več deset izbruhih bolezni, ki so jih povzročili ti serotipi so poročali po celem svetu. Okoli

20-25 % vseh HUS je povzročenih s strani serotipov "non-O157:H7". Velikokrat so izolirani tudi pri nekrvavi driski.

2.2 VIRULENTNI DEJAVNIKI

Virulenca je definirana kot sposobnost organizma, da povzroči bolezen v določenem gostitelju. Potencialni patogeni sevi *E. coli* se od komenzalnih črevesnih sevov razlikujejo v zapisih za virulentne dejavnike, rezultat skupnega vpliva enega ali več virulentnih dejavnikov je patogenost seva (Johnson, 1991).

Pomemben del raziskav v preteklosti je bilo definirati, kakšni so virulentni dejavniki in mehanizmi, ki naredijo sev EHEC patogen za človeka. Sinteza Stx naj bi bila obvezna, vendar le sama sinteza ni dovolj, da imajo sevi patogen efekt. Sevi EHEC, ki jih povezujejo s hudimi oblikami bolezni, posedujejo mehanizme pritrjevanja in izogibanja in imajo virulentne plazmide, medtem ko so te lastnosti zelo redke pri sevih STEC. V sevih EHEC so odkrili tudi veliko drugih virulentnih dejavnikov, ki so ponavadi zapisani na plazmidih in otokih patogenosti (Caprioli in sod., 2005).

2.2.1 Šigovi toksini

Šigovi toksini (Stx) so verjetno najbolj pomemben virulentni dejavnik EHEC. Stx so citotoksini, ki so zaslužni za simptome in smrti pacientov okuženih s sevi EHEC (Nataro in Kaper, 1998).

Družina Stx vsebuje dve imunološko nepovezani skupini Stx1 in Stx2. Sev EHEC lahko izraža samo eno skupino ali vsebuje obe skupini toksinov ali celo več podskupin toksina Stx2 (Stx2c, Stx2v, Stx2e, ipd.). Toksini so sestavljeni iz ene podenote A in petih enakih podenot B (Nataro in Kaper, 1998).

Gene za Stx1 in Stx2 najdemo na lizogenih bakteriofagih λ , geni za Stx2 so kodirani v kromosomu. Sinteza Stx1 v *E. coli* je uravnana s strani prevzema železa in temperature, medtem ko ti dejavniki ne vplivajo na izražanje toksina Stx2 (Nataro in Kaper, 1998).

V črevesju povzročajo hudo krvavo drisko in enterokolitis. Pentamer podenot B je zadolžen za pritrdjanje na glikolipidni receptor gostiteljske celice, podenota A inhibira sintezo proteinov v gostiteljski celici.

Stx naj bi prehajali skozi črevesje v krvni obtok, čeprav vsebnosti toksinov niso nikoli potrdili v krvi okuženega bolnika. Stx so citotoksični za človeške celice renalnega endotelija in neposredno okvarijo endotelijske celice, v nekaterih primerih je bilo zaznati tudi povezavo s citokini (TNF- α in IL-6) (Nataro in Kaper, 1998).

2.2.2 Intimin

Intimin je 94-97 kDa velik protein zunanje membrane in je edini črevesni kolonizacijski dejavnik, ki je bil identificiran do sedaj pri sevih EHEC. Zapis za intimin ima gen *eae* in je izražen tako v sevih EPEC kot v sevih EHEC.

Gen *eae* je del velikega kompleksnega zapisa, ki je sestavljen iz treh delov. Prvi del kodira sistem izločanja tipa III (TTSS), ki izloča efektorske molekule, drugi del ima zapis za proteine EspA, B in D, katerih funkcija je pomagati TTSS. Tretji del kodira adhezin intimin in intiminski receptor. Intimin je transportiran skozi celično membrano gostitelja s pomočjo sistema TTSS (Delahay in sod., 2001).

Intimin je zadolžen za takojšnjo pritrditev sevov EHEC na gostiteljsko celico in ima pomembno vlogo v patogenezi. Na podlagi aminokislinskih sekvenc so odkrili več različnih tipov intimina. Glavne tipe poimenujejo po grških črkah α , β , ϵ in γ . Intimin α se ponavadi nahaja v sevih EPEC, medtem ko sta ϵ in γ tesno povezana s sevi EHEC. Intimin γ sintetizirajo seroskupine O157, O111 in O145, intimin ϵ seroskupine O103 in O121. Intimin β najdemo tako pri sevih EPEC, kot pri sevih EHEC (Oswald in sod., 2000).

2.2.3 Enterohemolizin

Plazmidi veliki 90 kbp, ki jih pogosto najdejo v sevih O157:H7 (pO157) kodirajo gen za enterohemolizin. Najdemo ga v praktično vseh sevih O157:H7, prisoten je tudi v veliko sevih STEC. Enterohemolizin spada v družino toksinov RTX ("repeats in toxin proteins").

Predstavniki te skupine so prisotni pri uropatogenih sevih *E. coli*, *Pateurella haemolytica* in tudi pri ostalih sevih, ki so patogeni za človeka in živali (Schmidt in sod., 1995).

Gen, ki ima zapis za enterohemolizin (*ehxA*), ima 60 % podobnosti z genom za zapis hemolizina (*hlyA*) pri uropatogenih *E. coli*, zato gen za hemolizin radi zapisujejo tudi kot EHEC-*hlyA*. Operon *hly* kodira štiri ORF, ki so nujni za sintezo in transport enterohemolizina (Schmidt in sod., 1995).

Njegova naloga je še vedno dokaj slabo raziskana. Po nekaterih raziskavah je njegova vloga predvsem povezana s privzemom železa, ki je zelo pomemben dejavnik, predvsem pri rasti. Hemolizin naj bi bil tako zaslužen za lizo eritrocitov, ki privede do sprostitve hema in hemoglobina, ki služi kot vir železa pri rasti *E. coli* O157:H7. Hkrati toksin lizira goveje, vendar ne humanih leukocitov (Bauer in Welch, 1996).

2.2.4 Flageli

Flageli *E. coli* so kompleksne strukture, sestavljene iz treh glavnih regij: bazalnega telesca, kaveljčka in filamenta. Flagelni filament je sestavljen iz več tisoč kopij enega samega proteina flagelina. Molekula flagelina ima determinanto za H-antigen (H1, H7, H12, H23, H45, H49 in H51), katerega uporabljajo za identifikacijo specifičnih H-protiteles. Flagelini enterobakterij vsebujejo visoko ohranjene amino in karboksi konce, medtem ko je osrednja regija zelo variabilna (Schoenahls in Whitfield, 1993).

Flageli in gibljivost sta ena najpomembnejših elementov virulence mnogih patogenih sevov bakterij *E. coli*. Nujno sta potrebna za kolonizacijo gostitelja in indukcijo vnetja. Poleg tega imajo flageli pomembno vlogo pri nastanku biofilma. V nekaterih primerih (sev O25:H1), flageli vežejo odvečni glikoprotein plazminogen iz človeške plazme (Erdem in sod., 2007).

Sinteza falgelarnega antigena H7 je zelo pomembna lastnost sevov O157:H7. Vendar tudi drugi serotipi *E. coli* izražajo antigene H7. Flagel H7 je nujno potreben za prvi stik seva s črevesnimi epitelijskimi celicami gostitelja. Flagelin kodira *fliC*, za katerega genske analize kažejo, da vsebuje polimorfizme. Vsi sevi O157:H7 in STEC vsebujejo identične

fliC H7, ki se razlikujejo od preostalih H7 sintetizirajočih sevov. Identifikacija *fliC* je velikokrat pomembna metoda pri identificiranju različnih sevov bakterije *E. coli* (Ratiner in sod., 2003).

2.2.5 Faktor inhibicije celičnega cikla

Takoj po kontaktu z epiteljsko gostiteljsko celico, bakterija *E. coli* vanjo vbrizga protein Cif. Vnos poteka s pomočjo TTSS, ki je kodiran na otoku patogenosti LEE. Cif vpliva na ureditev aktinskega citoskeleta in povzroči zaustavitev celičnega cikla v fazi G₂/M, tako da inaktivira fosforiliran Cdk1 (Marches in sod., 2003).

Cif je efektorska molekula, ki ni kodirana na otoku patogenosti LEE, ampak na bakteriofagu λ, ki je vključen v kromosom in je prisoten v sevih EPEC in EHEC. Zapis za protein Cif je v genu *cif*. Zapis *cif* ni prisoten v visokopatogenih sevih O157:H7 (Loukiadis in sod., 2008).

Cif je protein sestavljen iz N-terminalnega dela, ki skrbi za izločanje in translokacijo in C-terminalnega, ki ima efektorsko funkcijo v gostiteljski celici. Za razliko od ostalih molekul, ki inhibirajo celični cikel, Cif ni genotoksičen efektor in prav tako ne aktivira molekul, ki bi poškodovale gostiteljsko DNA, kar bi privedlo do fosforilacije Cdk1 in tako do ustavitve celičnega cikla faze G₂/M. Cif na edinstven način inhibira celični cikel, vendar je njegov natančen mehanizem delovanja, ki privede do zaustavitve celičnega cikla v fazi G₂/M, še nepojasnen (Taieb in sod., 2006).

2.2.6 Jersinijabaktin

Železo je nujen element za skoraj vse žive organizme. Nizka topnost železa pri nevtralnem pH pod aerobnimi pogoji je prisilila patogene mikrobo, da so razvili visoko učinkovite transportne sisteme, ki priskrbijo zadostno količino železa za rast.

Ena izmed rešitev je transport s pomočjo sideroforjev, ki imajo visoko afiniteto za železove ione. Nase vežejo železo iz okolja ali ga prevzamejo železovezavnim proteinom

gostiteljske celice. Sistem transporta s sideroforjem igra zelo pomembno vlogo v patogenosti bakterijskih sevov (Braun in sod., 1998).

Skupek genov *fyu* je zelo pomemben dejavnik pri patogenezi bakterij *Yersinia* spp. (*Y. pestis*, *Y. enterocolitica*). Skupek genov kodira sistem za privzemanje železa, katerega uravnava siderofor jersinijabaktin in je del velikega otoka patogenosti ("high pathogenicity island" ali HPI). Jersinijabaktin je zunaj-membranski protein, ki ima dvojno funkcijo in služi tudi kot receptor za pesticin. HPI so močno prisotni tudi v drugih sevih vrst družine *Enterobacteriaceae*, ki so patogeni za človeka. Prevladuje predvsem pri sevih EAaggEC, redko tudi pri sevih EPEC in EIEC, medtem ko naj HPI ne bi bil prisoten pri sevih EHEC (Schubert in sod., 1998).

2.2.7 Citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1 (CNF1)

Citotoksični nekrotizirajoči dejavnik je virulentni dejavnik, ki je pogosto povezan z infekcijami sečil. Sinteza CNF1 je bolj pogosta pri kliničnih izolatih, kot pri bakterijah izoliranih iz fekalij.

Njegov genetski zapis se velikokrat nahaja skupaj z genetskim zapisom za α -hemolizin. CNF1 je 113-kDa velik protein, ki ga kodira en sam gen *cnf*. Čeprav še ni trdnih dokazov, naj bi sprožil spremembe v citoskeletu gostiteljskih celic, ter tako omogočil sicer nepatogenim bakterijam vstop v celico. V mehurju naj bi povzročil luščenje uroepitalnih celic, v črevesju naj bi induciral, uničenje mikrovilov, povečal permeabilnost celičnih plasti in zmanjšal fagocitozo imunskih celic (Bahrani-Mougeot in sod., 2002).

2.3 KOLICINI

Bakterije *E. coli* izdelujejo bakteriocine imenovane kolicine. Kolicini so toksični eksoproteini, ki jih tvorijo kolicinogene bakterije *E. coli*. Njihova naloga je zaviranje in preprečevanje rasti sevom iste vrste ali ozko sorodnih vrst (*Salmonella*, *Shigella*). Približno ena tretjina vseh sevov *E. coli*, ki se pojavljajo v človeškem intestinalnem traktu, je kolicinogenih. Pri govedu je prevalenca kolicinogenosti zelo podobna. To kaže na

pomembnost kolicinov, s katerimi bakterija brani svojo ekološko nišo in uravnava mikrobno raznolikost (Kelly, 2006; Dhillon in Elvera, 1981).

V stresnih pogojih se inducira manjši ali večji del potencialno kolicin-sintetizirajočih celic. Te začnejo sintetizirati toksičen protein-kolicin, ki se sprosti z lizo proizvajalske celice. Sproščeni kolicin je letalen za vse okoliške celice, ki niso odporne, imune ali tolerantne (Riley, 1993).

Kolicini so pomembni tudi za ohranjanje plazmidov, na katerih so poleg zapisov za kolicin, kodirani tudi virulentni dejavniki, ki pripomorejo k preživetju bakterij. Kodirani so na manjših plazmidih (5 kb), ki so v celicah v večjem številu ali na večjih konjugativnih plazmidih (50 kb), ki se pojavljajo v manjšem številu kopij (Braun in sod., 2002).

Na zunanji membrani tarčnih celic kolicini prepoznajo določen receptor in se nanj vežejo. Na celico delujejo na enega od treh načinov: i) tvorijo pore v celični membrani, ii) delujejo kot endonukleaze (RNAze, DNAze) in razgrajujejo dedni material, iii) inhibirajo proteinsko sintezo ali inhibirajo sintezo mureina (Riley in Wertz, 2002).

2.4 BAKTERIOFAGI

Bakteriofagi so virusi, ki so sposobni okužbe bakterije in so eni izmed najbolj pogostih življenjskih oblik na Zemlji. Velikokrat se v literaturi omenjajo samo z besedo fagi.

Tipični bakteriofag vsebuje zunanjo proteinsko kapsido, ki obdaja genetski material. Genetski material je lahko v obliki enoverižne ribonukleinske kisline (ssRNA), dvoverižne ribonukleinske kisline (dsRNA), enoverižne deoksiribonukleinske kisline (ssDNA) ali dvoverižne deoksiribonukleinske kisline (dsDNA), ki so lahko v linearni ali krožni obliki. Najpogostejša oblika genetskega materiala je dsDNA, katero naj bi vsebovalo približno 95 % vseh fagov (McGrath in van Sinderen, 2007).

Bakteriofag lambda (λ) je fag, ki okuži bakterijo *E. coli*. Vsebuje kapsido, ki obdaja dsDNA in repek, ki služi za pritrditev na gostiteljsko bakterijo in skozi katerega potuje

genetski material v celico. V večini primerov nastopi litični cikel, kjer fag izrabi bakterijo za izražanje genov za kapsido, repek in litičnih proteinov. To privede do sestave novih bakteriofagov in posledično lize gostiteljske bakterije. Pod določenimi pogoji nastopi lizogen fagni cikel, takrat se fagna DNA vgradi v kromosom gostiteljske bakterije in takšno obliko faga označimo kot profag. Profag v kromosomu se z vsako bakterijsko delitvijo pomnožuje in ne povzroča škode gostiteljski celici. Če je gostiteljska celica pod stresom (stradanje, strupi), se profag izloči iz kromosoma in preide v litični cikel (McGrath in van Sinderen, 2007).

Pri številnih bakterijah se zapisi za virulentne dejavnike najdejo v bakteriofagnih genomih. Bakteriofagi so tako lahko pomembni vektorji prenosa genetskih zapisov za sintezo virulentnih dejavnikov. Fagi lahko spremenijo lastnosti bakterij, ki so pomembne za vse faze patogenosti. Med drugimi imajo največji vpliv na adhezijo, kolonizacijo in včasih vdor bakterij. Poleg tega so pomembni tudi pri odpornosti proti imunskemu odzivu, sintezi toksinov, občutljivosti za antibiotike in povečajo prenos patogenih bakterij iz enega osebk na drugega (Wagner in Waldor, 2002).

2.5 FILOGENETSKE SKUPINE

Filogenetska analiza bakterij *E. coli* je pokazala, da jih lahko delimo v štiri skupine (A, B1, B2 in D). Virulentni sevi *E. coli* ponavadi spadajo predvsem v skupini B2 in D, medtem ko večina komenzalnih sevov pripada skupini A. Študije filogenetskih skupin so pripomogle k boljšemu razumevanju same patogeneze in kako posamezni sevi pridobijo gene za virulentne dejavnike (Bingen in sod., 1998).

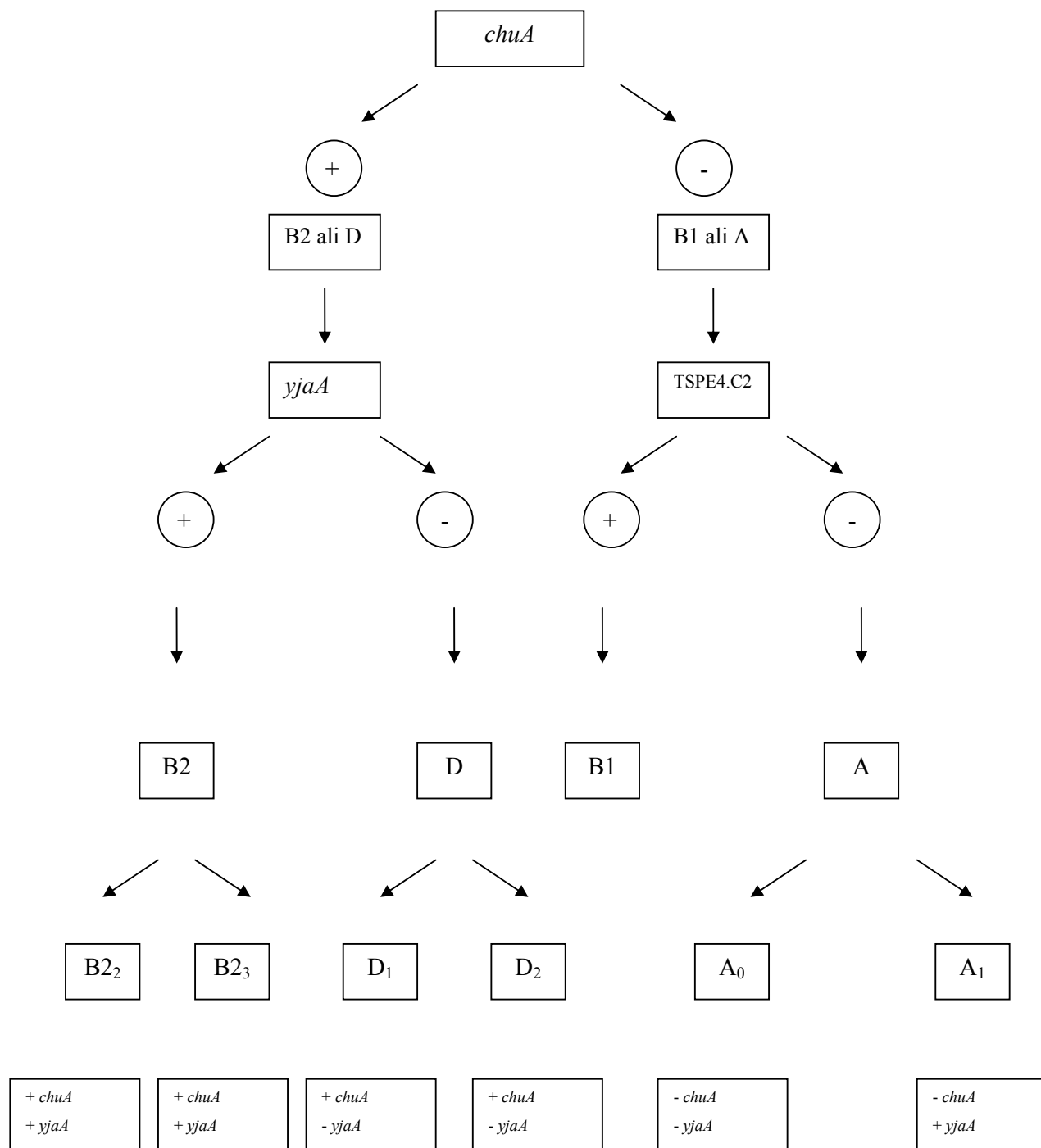
Nekatere raziskave so nakazale, da naj bi bili določeni geni in fragmenti DNA specifični označevalci za posamezno filogenetsko skupino: *chuA*, gen ki kodira encime zadolžene za transport hema pri sevih O157:H7, *yjaA*, gen katerega so identificirali s pomočjo celotne genomske sekvence *E. coli* seva K-12 in katerega funkcija še ni poznana in fragment DNA TSPE4.C2. Delitev je narejena na osnovi teh treh zapisov, ki so jih našli v DNA-knjžnici *E. coli* (Clermont in sod., 2000).

Preglednica 1: Razdelitev *E. coli* v filogenetske skupine (Escobar-Páramo in sod., 2004)

filogenetska skupina	filogenetska podskupina	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE4.C2
A	A ₀	-	-	-
	A ₁	-	+	-
B1		-	-	+
B2	B2 ₂	+	+	-
	B2 ₃	+	+	+
D	D ₁	+	-	-
	D ₂	+	-	+

Seve delimo v štiri skupine: A, B1, B2 in D. Skupine A, B2 in D, delimo še na podskupine A₀, A₁ (skupina A), B2₂, B2₃ (skupina B) in D₁, D₂ (skupina D).

Sevi, ki spadajo v podskupino A₀ nimajo nobenega od treh genetskih označevalcev, medtem ko sevi v podskupini A₁ imajo *yjaA*. Sevi, ki spadajo v podskupino B2₂, imajo *chuA* in *yjaA*, v podskupini B2₃ so vsi trije specifični označevalci. Sevi, ki spadajo v skupino B1 imajo samo fragment DNA TSPE4.C2. Sevi, katere uvrščamo v podskupino D₁ imajo samo *chuA*, v podskupini D₂ se nahajajo sevi z *chuA* in fragmentom DNA TSPE4.C2 (Escobar-Páramo in sod., 2004).



Slika 1: Shematski prikaz določevanja filogenetskih skupin, na podlagi pomnoževanja specifičnih produktov PCR (Escobar-Páramo in sod., 2004)

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Bakterijski sevi

3.1.1.1 Laboratorijski sevi

Uporabljeni laboratorijski sevi izvirajo iz zbirke sevov Skupine za molekularno genetiko Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

3.1.1.2 Izolati *E. coli*

Zbirka sevov *E. coli*, ki so bili izolirani iz prebavnega trakta zdravega goveda iz slovenskih kmetij. Izolati *E. coli* so bili kultivirani na MacConkey-agarju, ki je selektivno gojišče za *E. coli*.

3.1.2 Gojišča

3.1.2.1 Priprava tekočih gojišč Luria-Bertani (LB)

Za pripravo tekočih gojišč LB smo v 1 L destilirane vode raztopili 25 g osnove za gojišče LB (10 g tripton, 10 g NaCl, 5 g kvasni ekstrakt). Gojišče smo nato odpipetirali v pipete (5 mL ali 10 mL) in jih sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C.

3.1.2.2 Priprava trdnih gojišč LB

Za pripravo trdnih gojišč LB smo v 1 L destilirane vode raztopili 25 g osnove za gojišče LB in 15 g agarja. Gojišče smo sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C. Ko se je gojišče ohladilo na približno 50 °C, smo ga razlili v plastične petrijevke.

3.1.2.3 Priprava gojišč MacConkey-agar

Za pripravo gojišč MacConkey-agar smo v 1 L destilirane vode raztopili 50 g osnove za gojišče MacConkey-agar. Gojišče smo sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C. Ko se je gojišče ohladilo na približno 50 °C, smo ga razlili v plastične petrijevke.

3.1.2.4 Priprava gojišč MacConkey-sorbitol-agar

Za pripravo gojišč MacConkey-sorbitol-agarja, smo po avtoklaviranju gojišča MacConkey-agar, le temu dodali sorbitol. Ko se je gojišče ohladilo na približno 50 °C, smo ga razlili v plastične petrijevke.

3.1.2.5 Priprava gojišč za test IMVC

Test IMVC je sestavljen iz štirih testov, test indol, test metil rdeče, test Voges-Proskaur in test citrat.

Za pripravo gojišča za test indol smo uporabili 20 g peptona 5 g NaCl in 1000 mL destilirane vode. Vse to smo umerili na pH 7,2 in razdelili v epruvete.

Pri testu citrat smo pripravili poševno gojišče po Simmons. To je definirano gojišče, ki vsebuje 5 g NaCl, 0,2 g MgSO₄, 1 g NH₄H₂PO₄, 1 g KH₂PO₄, 5 g Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O, 40 mL bromtimol modro 0,2 %, 20 g agarja in 1000 mL destilirane vode. Vse skupaj je umerjeno na pH 6,8.

Pri testu metil rdeče in Voges-Proskauer smo uporabili enako gojišče, le indikator je bil drug (indikator pri testu metil rdeče je bil metil rdeče (0,25 % v etanolu), pri testu Voges-Proskauer 5 % α-naftol v 96 % etanolu). Gojišče za test metil rdeče in Voges-Proskauer smo pripravili iz 0,5 g K₂HPO₄, 0,5 g peptona, 0,5 g glukoze in 100 mL destilirane vode. Vse skupaj smo umerili s pomočjo HCl na pH 7,5.

3.1.3 Kemikalije

BIOLIFE, Milano, Italija

- agar
- tripton

BMA, Rockland, ME, ZDA

- agaroz

FERMENTAS

- PCR Master Mix (0,05 enot/ μ L *Taq*-polimeraze v reakcijskem pufru: 25 mM $MgCl_2$, 0,4 mM dNTP)
- pufer za *Taq*-polimerazo z $(NH_4)_2SO_4$
- lestvica 1-kb
- lestvica 50-bp
- destilirana voda brez nukleaz
- nanašalni pufer za elektroforezo

KEMIKA, Zagreb, Hrvaška

- EDTA

MERCK, Darmstadt, Nemčija

- 96 % alkohol
- $MgCl_2$

ROTH, Karlsruhe, Nemčija

- LB
- agar

SIGMA Chemicals, St. Luis, MO, ZDA

- LB
- Etidijev bromid (EtBr)
- agaroz
- baza TRIS
- EDTA

3.1.4 Pufri in reagenti

3.1.4.1 Agarozna gelska elektroforeza

- elektroforezni agarozni gel, ki smo ga pripravili tako, da smo 0,6 g agaroze dodali v 30 mL 0,5× TBE in segrevali, da se je agarozna raztopila. Ko se je gel ohladil, smo dodali še 1,5 µL EtBr (10 mg/mL)
- 5× TBE (0,45 mM Tris-borat; 10 mM EDTA), shranjen na sobni temperaturi
- našalni elektroforezni pufer (0,25 % bromfenol modro; 0,25 % ksilen cianol, 40 % saharoza)

3.1.5 Oprema

Pri našem delu smo uporabljali naslednjo opremo:

- stresalnik (Infors HT, Bottmingen, Švica)
- hibridizacijska vodna kopel (Stoval Life Science, Norton Shores, MI, ZDA)
- rotacijski stresalnik (Biofuge 13, Heraeus, Frankfurt, Nemčija)
- PCR aparatura
 - GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Ontario, Kanada)
 - Biometra UNO II (Biometra, Göttingen, Nemčija)
- avtomatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- namizna centrifuga (Eppendorf centrifuge5417C, Eppendorf Hamburg, Nemčija)
- namizna centrifuga (BECKMAN J2-21MIE Centrifuge, Beckman Coulter, Fullerton, CA, ZDA)
- elektroforeza 2301 Mascrodribe 1 (LKB Bromma, Stockholm, Švedska)
- UV luč 2011 Macrovue (LKB Bromma, Stockholm, Švedska)
- centrifuga Rotanta 460R (Hettich AG, Bäch, Švica)
- vibracijski stresalnik (EV 100, Tehnica, Železniki, Slovenija)
- naprava za slikanje elektroforeznih gelov (UVI Tec, St. John Innovations Centre, Cambridge, Velika Britanija)
- tehtnica exacta 310EB (Tehnica, Železniki, Slovenija)
- tehtnica ET-1111 (Tehnica, Železniki, Slovenija)

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje izolatov

Vse izolate smo gojili na MacConkey-agarju, ki je selektivno gojišče za bakterije *E. coli*. Inkubirali smo jih preko noči pri 37 °C in jih hranili v hladni sobi.

Nadalje smo vsak izolat presejali na plošče MacConkey-sorbitol-agar, ki je selektivno gojišče za serotipe O157:H7 bakterije *E. coli*. Plošče smo prav tako inkubirali preko noči pri 37 °C.

3.2.2 Preverjanje izolatov

Vse izolate smo s testom IMVC preverili, če gre res za bakterijo *E. coli*.

Pri testu indol smo cepili v tekoče gojišče s peptonom (v katerem je triptofan). Inkubirali 24 ur ali več pri 37 °C. Po inkubaciji smo dodali v vsako epruveto tri kapljice indolnega reagenta.

Pri testu citrat smo cepili po poševni ploskvi. Inkubirali smo 24 ur ali več pri 37 °C. Pazili smo, da pri cepljenju ne prenašamo hranil iz drugih gojišč. Vcepek ni smel biti prebogot.

Test Voges-Proskauer (VP) smo delali v tekočem gojišču v epruveti (1,6 mL). Po 48 urni inkubaciji pri 37 °C smo najprej dodali štiri kapljice 5 % α -naftola in nato dve kapljici 40 % KOH.

Test z metil rdečim smo delali v tekočem gojišču (5 mL), katerega sestava je enaka kot pri testu VP. Inkubacija je morala biti zadosti dolga, saj so v začetku vse kulture MR+, do razlik pride šele kasneje. Po 2 do 5 dnevni inkubaciji pri 37 °C smo v gojišče dodali 1 do 2 kapljici indikatorja metil rdeče in opazovali spremembo barve.

3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

3.2.3.1 Priprava lizatov

V 5 mL tekočega gojišča LB smo nacepili eno kolonijo bakterijskega izolata in inkubirali preko noči na rotacijskem stresalniku (250 obr/min) pri 37 °C. Naslednji dan smo odpipetirali 1 mL prekonočne bakterijske kulture v novo sterilno mikrocentrifugirko in centrifugirali 1 min pri najvišjih obratih (14.000 obr/min), da so se celice usedle. Odlili

sno supernatant, pelet resuspendirali v 200 µL sterilne destilirane vode. Resuspendirane celice smo nato inkubirali 10 min pri 100 °C. Po inkubaciji smo mikrocentrifugirko ponovno centrifugirali pri enakih obratih, tokrat za 10 min. Iz dobljenega supernatanta smo 150 µL prenesli v svežo sterilno mikrocentrifugirko in hranili do uporabe pri –80 °C. Supernatant s celokupno celično DNA smo uporabili za namnožitev specifičnega dela DNA pri izvedbi verižne reakcije s polimerazo.

3.2.3.2 Začetni oligonukleotidi za PCR

Za pomnoževanje genov s PCR smo uporabili začetne oligonukleotide, ki so navedeni v preglednici 2.

Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi uporabljeni pri PCR

Gen	Oznaka začetnega oligonukleotida	Nukletidno zaporedje (5'→3')	Velikost pomnožka (bp)	Referenca
<i>chuA</i>	<i>chuA1</i> <i>chuA2</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	Clermont in sod., 2000
<i>yjaA</i>	<i>yjaA1</i> <i>yjaA2</i>	TGAAGTGTGTCAGGAGACGCTG ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211	
TSPE4.C2	<i>tspE4.C2-1</i> <i>tspE4.C2-2</i>	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA CGCGCCAACAAAGTATTACG	152	
<i>fyuA</i>	<i>fyuA1</i> <i>fyuA2</i>	TGATTAACCCCGCGACGGGAA CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	880	Johnson in Stell, 2000
<i>cnf1</i>	<i>CNF1-1</i> <i>CNF1-2</i>	CTGACTTGCCCGTGGTTTACTCGG TACACTATTGACATGCTGCCCGGA	1295	Kuhar in sod., 1998
<i>stx1</i>	<i>stx1F</i> <i>stx1R</i>	ATAAATCGCCATTTCGTTGACTAC AGAACGCCCACTGAGATCATC	180	Paton in Paton, 1998
<i>stx2</i>	<i>stx2F</i> <i>stx2R</i>	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC TCGCCACTTATCTGACATTCTG	255	Karch in sod., 1993
<i>eaeA</i>	<i>SK1</i> <i>SK2</i>	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC CCCGGATCCGTCCTCGCCAGTATTCG	881	Paton in Paton, 1998
EHEC <i>hlyA</i>	<i>hlyAF</i> <i>hlyAR</i>	GCATCATCAAGCGTACGTTCC AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	543	Paton in Paton, 1998
<i>fliCH7</i>	<i>fliC-a</i> <i>fliC-b</i>	TACCATCGCAAAAGCAACTCC GTCGGCAACGTTAGTGATACC	247	Wang in sod., 2002
<i>cif</i>	<i>cif-int-s</i> <i>cif-int-as</i>	AACAGATGGCAACAGACTGG AGTCAATGCTTTATGCGTCAT	383	Oswald in sod., 2000

3.2.3.3 Reakcijska mešanica za PCR

Za PCR reakcijo, s katero smo uvrščali izolate v filogenetske skupine, smo pripravili 20 μ L reakcijske mešanice. Sestava je podana v preglednici 3.

Preglednica 3: Sestava reakcijske mešanice za PCR pri določevanju filogenetskih podskupin

začetni oligonukleotid 1 (<i>chuA1</i> in <i>yjaA1</i> in <i>tspE4.C2-1</i>)	po 1 μ L vsakega (3x)
začetni oligonukleotid 2 (<i>chuA2</i> in <i>yjaA2</i> in <i>tspE4.C2-2</i>)	po 1 μ L vsakega (3x)
PCR Master Mix	4,9 μ L
destilirana voda	6,1 μ L
celični lizat	3 μ L

Za PCR reakcijo, s katero smo preverjali *fyuA*, *cnf1* in *fliC* H7 smo pripravili 20 μ L reakcijske mešanice. Sestava je podana v preglednici 4.

Preglednica 4: Sestava reakcijske mešanice za PCR pri določanju *fyuA* in *fliCH7*

začetni oligonukleotid 1 (<i>fliC/fyuA1</i>)	1 μ L
začetni oligonukleotid 2 (<i>fliC-b/fyuA2</i>)	1 μ L
PCR Master Mix	5 μ L
destilirana voda	10 μ L
celični lizat	3 μ L

Za PCR reakcijo, s katero smo preverjali *stx1*, *stx2*, *cif*, *eaeA* in EHEC *hlyA* smo pripravili 50 μ L reakcijske mešanice. Sestava je podana v preglednici 5.

Preglednica 5: Sestava reakcijske mešanice za PCR pri določanju *stx1*, *stx2*, *cif*, *eaeA* in EHEC *hlyA*

začetni oligonukleotid 1 (<i>stx1F/stx2F/SK1/cif-int-s/hlyAF</i>)	1 μ L
začetni oligonukleotid 2 (<i>stx1R/stx2R/SK2/cif-int-as/hlyAR</i>)	1 μ L
PCR Master Mix	11,2 μ L
destilirana voda	26,8 μ L
celični lizat	10 μ L

Za PCR reakcijo, s katero smo preverjali *cnf1* smo pripravili 25 μ L reakcijske mešanice. Sestava je podana v preglednici 6.

Preglednica 6: Sestava reakcijske mešanice za PCR pri določanju *cnf1*

začetni oligonukleotid 1 (<i>CNF1-1</i>)	0,5 μ L
začetni oligonukleotid 2 (<i>CNF1-2</i>)	0,5 μ L
PCR Master Mix	3,2 μ L
destilirana voda	15,8 μ L
celični lizat	5 μ L

3.2.3.4 Pogoji pomnoževanja s PCR

- Program pomnoževanja nukleotidnih zaporedij *chuA*, *yjaA* in *TSPE.C2*.

začetna denaturacija	94 °C	4 min	1 \times
denaturacija	94 °C	30 s	
prileganje	59 °C	30 s	30 \times
pomnoževanje	72 °C	30 s	
končno pomnoževanje	72 °C	5 min	1 \times

- Program pomnoževanja nukleotidnih zaporedij *fyuA*.

začetna denaturacija	94 °C	2,5 min	1 ×
denaturacija	94 °C	30 s	
prileganje	59 °C	30 s	25 ×
pomnoževanje	72 °C	3 min	
končno pomnoževanje	72 °C	10 min	1 ×

- Program pomnoževanja nukleotidnih zaporedij *stx1* in *stx2*.

začetna denaturacija	94 °C	4 min	1 ×
denaturacija	94 °C	30 s	
prileganje	58 °C	30 s	30 ×
pomnoževanje	72 °C	30 s	
končno pomnoževanje	72 °C	5 min	1 ×

- Program pomnoževanja nukleotidnih zaporedij *cnf1*.

začetna denaturacija	94 °C	4 min	1 ×
denaturacija	94 °C	1,5 min	
prileganje	59 °C	1,5 min	30 ×
pomnoževanje	72 °C	2 min	
končno pomnoževanje	72 °C	5 min	1 ×

- Program pomnoževanja nukleotidnih zaporedij *eaeA*.

začetna denaturacija	94 °C	5 min	1 ×
denaturacija	94 °C	30 s	
prileganje	52 °C	1 min	30 ×
pomnoževanje	72 °C	2 min	
končno pomnoževanje	72 °C	7 min	1 ×

- Program pomnoževanja nukleotidnih zaporedij EHEC *hlyA*.

začetna denaturacija	94 °C	4 min	1 ×
denaturacija	94 °C	30 s	
prileganje	64 °C	30 s	30 ×
pomnoževanje	72 °C	2 min	
končno pomnoževanje	72 °C	7 min	1 ×

- Program pomnoževanja nukleotidnih zaporedij *fliCH7*.

začetna denaturacija	95 °C	4 min	1 ×
denaturacija	95 °C	30 s	
prileganje	58 °C	30 s	30 ×
pomnoževanje	72 °C	30 s	
končno pomnoževanje	72 °C	7 min	1 ×

- Program pomnoževanja nukleotidnih zaporedij *cif*.

začetna denaturacija	94 °C	4,5 min	1 ×
denaturacija	94 °C	30 s	
prileganje	64 °C	30 s	35 ×
pomnoževanje	72 °C	30 s	
končno pomnoževanje	72 °C	10 min	1 ×

3.2.4 Agarozna gelska elektroforeza

Prisotnost in ustrezno velikost fragmentov, pomnoženih s PCR smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Pripravili smo 30 mL 1 % ali 2 % agaroznega gela, odvisno od velikosti pomnoženih fragmentov DNA.

1 % agarozni gel smo pripravili tako, da smo 0,3 g agaroze raztopili v 30 mL pufra $0,5 \times$ TBE. Ko se je gel rahlo ohladil, smo dodali še 1,5 μ L 10 mg/mL EtBr. 2 % agarozni gel smo pripravili tako, da smo 0,6 g agaroze raztopili v 30 mL pufra $0,5 \times$ TBE pufra. Ko se je gel rahlo ohladil smo dodali še 1,5 μ L 10 mg/mL EtBr.

Ko se je gel strdil, smo ga dali v elektroforezno banjico in vse skupaj prelili s $0,5 \times$ TBE pufrom. Pred nanosom vzorcev (namnoženih fragmentov) smo le-te zmešali z nanašalnim

barvilom, v razmerju 5:1. Nanašalno barvilo zagotovi, da se vzorec usede na dno jamice v gelu, poleg tega omogoča sledenje poteka elektroforeze. Elektroforeza je potekala pri napetosti 110 V.

Za velikostni standard na gelu smo uporabili 1-kb DNA lestvico (Fermentas) in 50-bp DNA lestvico (Fermentas).

Po končani elektroforezi smo gele presvetlili z UV-svetlobo valovne dolžine 302 nm in slikali rezultate.

3.2.5 Določanje kolicinogenosti izolatov *E. coli*

S sterilnim zobotrebcem smo prepikirali na ploščo LB po 25 kolonij preiskovanih izolatov. Plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Hkrati smo s sterilno zanko prenesli indikatorski sev CL173 v 5 mL tekočega gojišča LB in ga inkubirali preko noči na stresalniku pri 37 °C.

Naslednji dan smo kolonije na plošči za 15 min izpostavili hlapom kloroforma na staničevini. Zaradi varnosti smo delali v digestoriju. Lizirane bakterije smo pustili še 15 min pri sobni temperaturi, da je kloroform izhlapel. S segrevanjem smo raztopili mehki agar in ga odpipetirali po 4 mL v male epruvete. Epruvete smo inkubirali 10 min pri 46 °C. Ohlajenemu mehкому agarju smo dodali 200 µL prekonočne kulture indikatorskega bakterijskega seva, ki je občutljiv za kolicine in smo ga prelili preko liziranih kolonij. Plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Na ploščah liziranih in z indikatorskim sevom prelitih kolonij so bile vidne cone zbistritve indikatorskega seva okoli kolonij, ki so sintetizirale kolicin.

3.2.6 Indukcija lizogenih fagov z UV

V 5 mL tekočega gojišča LB smo nacepili izolate za preverjanje lizogenih fagov in indikatorsko kulturo DSM7, ter jih inkubirali preko noči pri 37 °C.

Naslednji dan smo prekonočne kulture prelili v sterilne steklene petrijevke ter jih odprte za 70 s izpostavili UV svetlobi. Steklene petrijevke smo ves čas mešali z roko. Po obsevanju smo petrijevke s kulturo inkubirali pri 37 °C. Po eni uri smo 1 mL obsevane kulture prenesli v mikrocentrifugirko in centrifugirali 2 min pri najvišjih obratih (14.000 obr/min).

Nato smo supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko. Supernatant smo nato redčili do 10^{-6} in 10^{-7} saj smo tako lahko redčili eventualno prisotne kolicine, ki prav tako nastanejo pri indukciji z UV svetlobo.

S segrevanjem smo raztopili mehki agar in ga odpipetirali po 3 mL v male epruvete. Epruvete smo inkubirali 10 min pri 46 °C. V epruvete z mehkim agarjem smo dodali 200 µL prekonočne kulture indikatorskega seva in 100 µL redčenega supernatanta z bakteriofagi. Vsebino epruvete smo premešali med dlanmi in prelili plošče LB, ki smo jih predhodno ogreli v topli sobi. Ko se je mehki agar strdil, smo plošče LB inkubirali preko noči pri 37 °C. Kot kontrolo števila bakterij v supernatantu smo 100 µL le tega razmazali s stekleno Drigalsko spatulo po gojišču plošče LB in plošče inkubirali preko noči pri 37 °C.

3.2.7 Statistične metode

Statistično značilnost povezav dobljenih rezultatov smo ugotavljali s Fisherjevim eksaktnim testom s pomočjo programa Fisher's exact test, ki je dostopen na internetni strani <http://www.langsrud.com/fisher.htm>. Program je posebej prirejen za številčno majhne vzorce. S pomočjo Fisherjevega eksaktnega testa smo izračunali, katere izmed razlik v pogostosti pojavljanja delov genov za izbrane virulentne dejavnike in filogenetskih skupin, so statistično značilne. Kot statistično značilne rezultate štejemo tiste, ki imajo vrednost $P \leq 0,05$. Takrat lahko trdimo, da sta primerjana podatka statistično značilno povezana (Langsrud, 2004).

4 REZULTATI

4.1 ZBIRKA IZOLATOV

Zbrali smo zbirko 34 izolatov *E. coli*, izoliranih iz iztrebkov zdravega goveda s kmetij v okolici Ljubljane.

Cepilno zanko smo pomočili v iztrebek in jo razmazali na MacConkey-agar, ter preko noči inkubirali pri 37 °C. Nadalje smo vse izolate precepili tudi na MacConkey-sorbitol-agar, ker smo tako želeli ugotoviti potencialne seve O157:H7. Noben izmed preučevanih izolatov ni bil O157:H7. Vse izolate smo preverili tudi s testom IMVC, da smo preverili, če so res izolirani sevi *E. coli*. Pri vseh 34 izolatih se je izkazalo, da gre za bakterijo *E. coli*.

Preverjali smo uvrstitve izolatov v filogenetske skupine in virulentne dejavnike (Šigovi toksini, jersinijabaktin, citotoksični nekrotizirajoči dejavnik, intimin, enterohemolizin, flagelin serotipa H7 in inhibitorni faktor celičnega cikla). Prav tako smo preverjali, kolikšen delež izolatov je okuženih z bakteriofagi in določili kolicinogenost izolatov v naši zbirki. Vsi dobljeni rezultati so zbrani v preglednici v prilogi.

4.2 PREVALENCA FILOGENETSKIH SKUPIN

Z metodo verižne reakcije s polimerazo smo testirali vseh 34 izolatov naše zbirke. Rezultati so navedeni v preglednici 8.

Preglednica 7: Uvrstitev izolatov *E. coli* v filogenetske skupine

Filogenetska skupina	Prevalenca izolatov N (%)
A	7 (20)
B1	12 (35)
B2	3 (9)
D	12 (35)

Kot je razvidno iz preglednice 7 smo največ izolatov 12 (35 %) uvrstili v filogenetski skupini B1 in D. Sledili so izolati A, 7 (20 %), in B2 skupine, 3 (9 %).

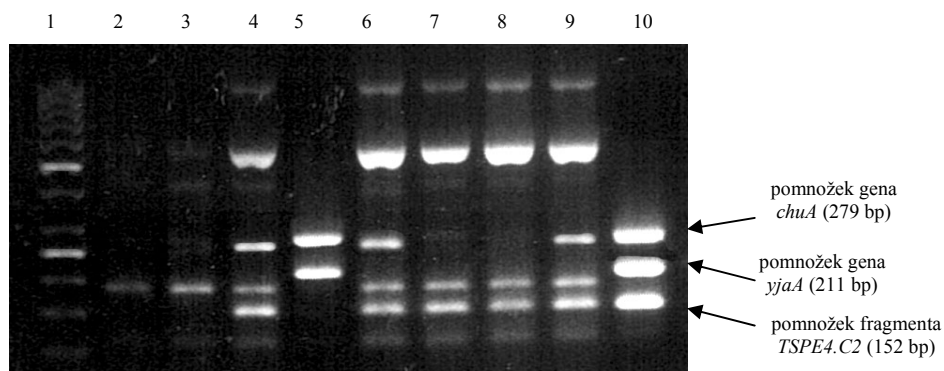
Izolate smo uvrstili tudi v filogenetske podskupine in rezultati so prikazani v preglednici 8.

Preglednica 8: Uvrstitev izolatov *E. coli* v filogenetske podskupine

Filogenetska podskupina	Prevalenca izolatov N (%)
A ₀	4 (12)
A ₁	3 (9)
B2 ₂	1 (3)
B2 ₃	2 (6)
D ₁	5 (15)
D ₂	7 (21)

Če povzamemo preglednico 8 smo največ izolatov uvrtili v podskupino D₂ 7 (21 %), sledita podskupini A₀, 4 (12 %) in D₁, 5 (15 %) vseh izoliranih izolatov *E. coli*. V podskupino A₁ smo uvrstili 3 (9 %) izolate. Najmanj izolatov smo uvrstili v podskupini B2₃, 2 (6 %), in B2₂, 1 (3 %).

Na sliki 2 je prikazan rezultat gelske elektroforeze produktov PCR za določanje filogenetskih skupin izolatov.



Slika 2: Gelska elektroforeza produktov PCR za določanje filogenetskih skupin

Legenda: 1 - standardna lestvica 50-bp, 2 - izolat MB33, 3 - izolat MB34, 4 - izolat MB35, 5 - izolat MB36, 6 - izolat MB37, 7 - izolat MB38, 8 - izolat MB39, 9 - izolat MB40, 10 - pozitivna kontrola.

4.3 PREVALENCA VIRULENTNIH DEJAVNIKOV

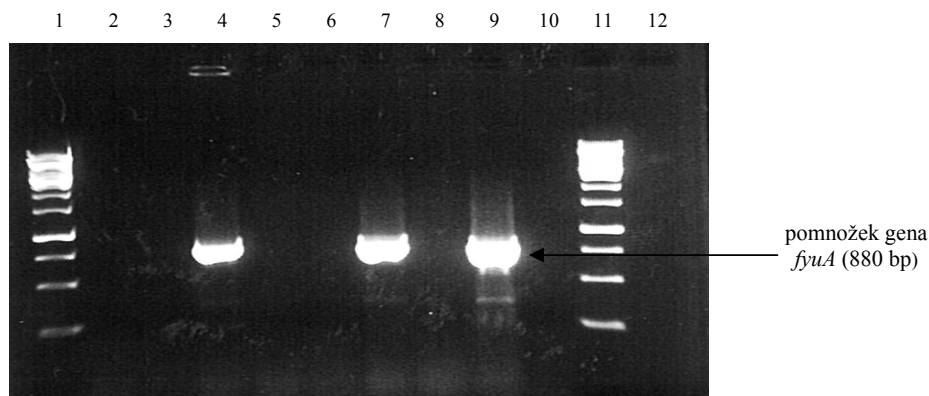
Z metodo verižne reakcije s polimerazo smo testirali izolate za genske zapise za virulentne dejavnike. Pri vseh 34 izolatih smo preverjali *fyuA*, *cnf1*, *stx1*, *stx2* in *cif*. Tiste izolate, ki so bili *stx2*-pozitivni, smo nadaljnje testirali še na *eaeA*, *flic* H7 in EHEC *hlyA*. Rezultati prevalence testiranih genskih zapisov so podani v preglednici 9.

Preglednica 9: Prevalenca virulentnih dejavnikov izolatov naše zbirke

	število pozitivnih izolatov	število testiranih izolatov	procent (%) pozitivnih izolatov
<i>stx1</i>	0	34	0
<i>stx2</i>	4	34	12
<i>fyuA</i>	6	34	18
<i>cnf1</i>	0	34	0
<i>cif</i>	0	34	0
<i>eaeA</i> *	1	4	25
<i>fliC</i> H7*	4	4	100
EHEC <i>hlyA</i> *	3	4	75

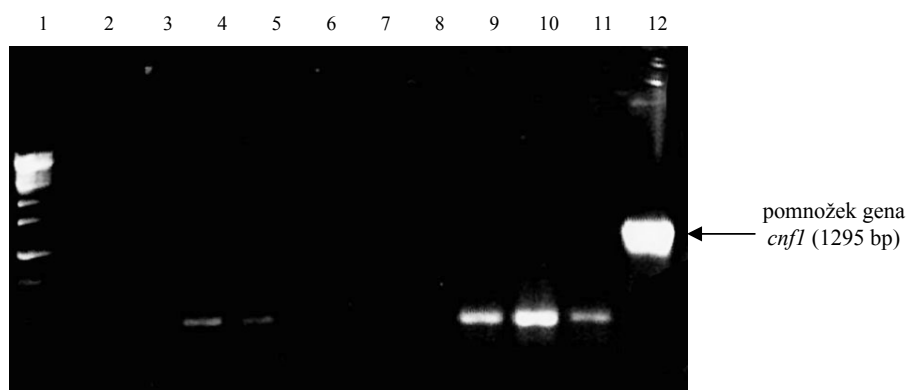
* testirali smo samo 4 *stx2*-pozitivne izolate

Če povzamemo preglednico 9, smo pri 6 izolatih ugotovili gen *fyuA*, kar znaša 18 % vseh izolatov. Pri nobenem od izolatov *E. coli* nismo ugotovili *stx1*, *cnf1* in *cif*. Gen za Šigove toksine tipa 2 smo prav tako preverjali pri vseh izolatih. Pozitivni izolati za *stx2* so bili 4, kar predstavlja skoraj 12 % vseh izolatov. Izolate, ki so bili pozitivni za *stx2*, smo preverili še za *eaeA*, *flic* H7 in EHEC *hlyA*. Gen *eaeA* je bil prisoten pri 1 izolatu, kar znaša 25 % vseh *stx2* pozitivnih izolatov. *flic* H7 smo ugotovili pri vseh štirih izolatih in EHEC *hlyA* pri 3 (75 %) *stx2*-pozitivnih izolatih.



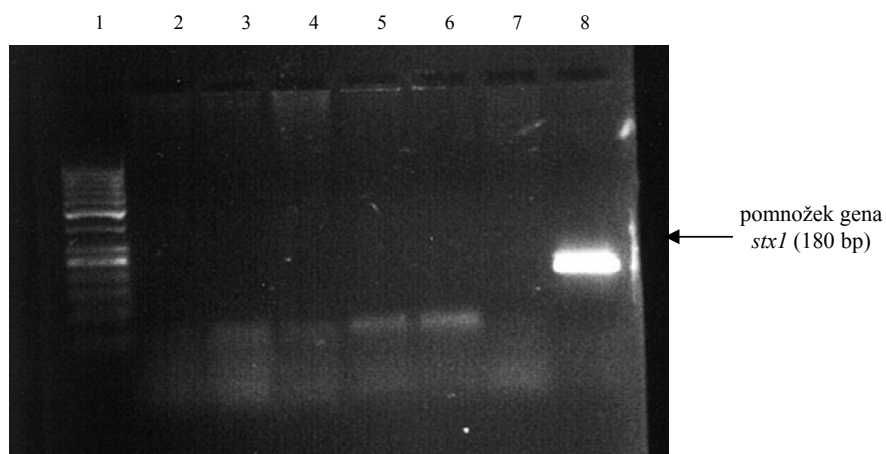
Slika 3: Gelska elektroforeza produktov PCR za določanje pomnožkov *fyuA*

Legenda: 1 - standardna lestvica 1-kb, 2 – izolat MB34, 3 - izolat MB35, 4 - izolat MB36, 5 - izolat MB37, 6 - izolat MB38, 7 - izolat MB39, 8 - izolat MB40, 9 - pozitivna kontrola, 10 - izolat MB1, 11 - standardna lestvica 1-kb, 12 - negativna kontrola.



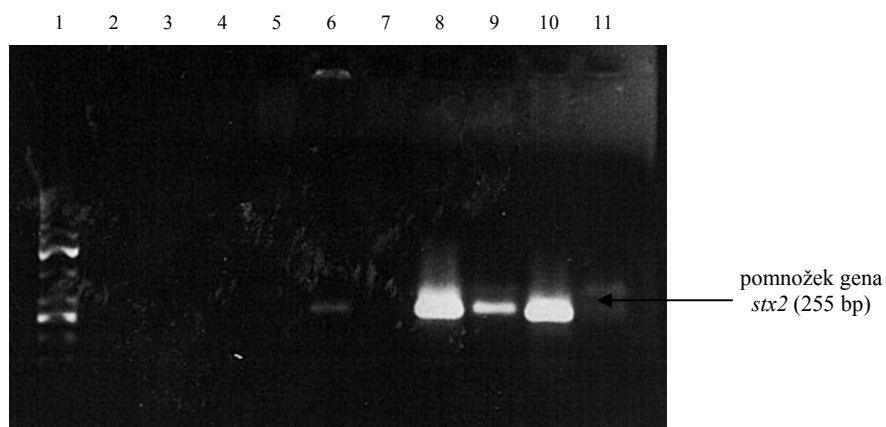
Slika 4: Gelska elektroforeza produktov PCR za določanje pomnožkov *cnf1*

Legenda: 1 - standardna lestvica 1-kb, 2 – negativna kontrola, 3 - izolat MB1, 4 - izolat MB2, 5 - izolat MB3, 6 - izolat MB4, 7 - izolat MB5, 8 - izolat MB6, 9 - izolat MB7, 10 - izolat MB8, 11 - izolat MB9, 12 - pozitivna kontrola.



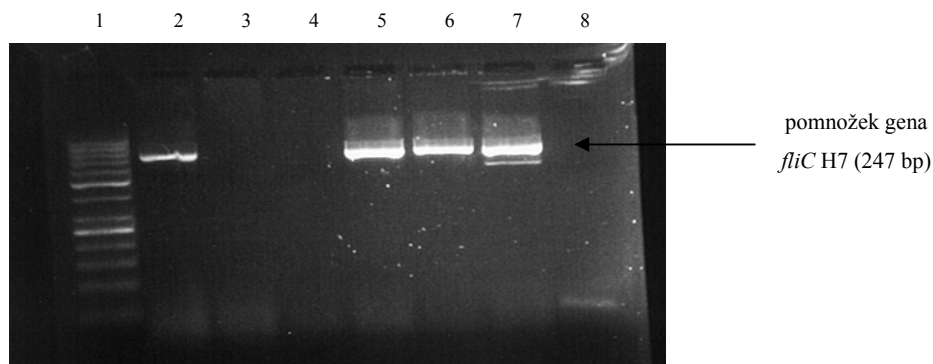
Slika 5: Gelska elektroforeza produktov PCR za določanje pomnožkov *stx1*

Legenda: 1 - standardna lestvica 50-bp, 2 - negativna kontrola, 3 - izolat MB1, 4 - izolat MB2, 5 - izolat MB3, 6 - izolat MB4, 7 - izolat MB5, 8 - pozitivna kontrola.



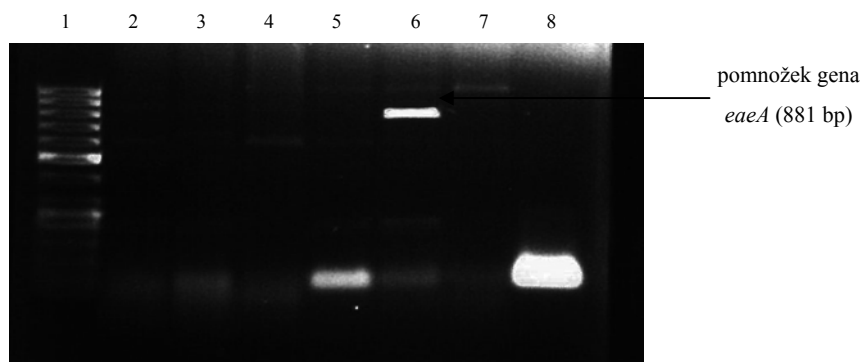
Slika 6: Gelska elektroforeza produktov PCR za določanje pomnožkov *stx2*

Legenda: 1 - standardna lestvica 50-bp, 2 - negativna kontrola, 3 - izolat MB33, 4 - izolat MB34, 5 - izolat MB35, 6 - izolat MB36, 7 - izolat MB37, 8 - izolat MB38, 9 - izolat MB39, 10 - pozitivna kontrola, 11 - izolat MB40.



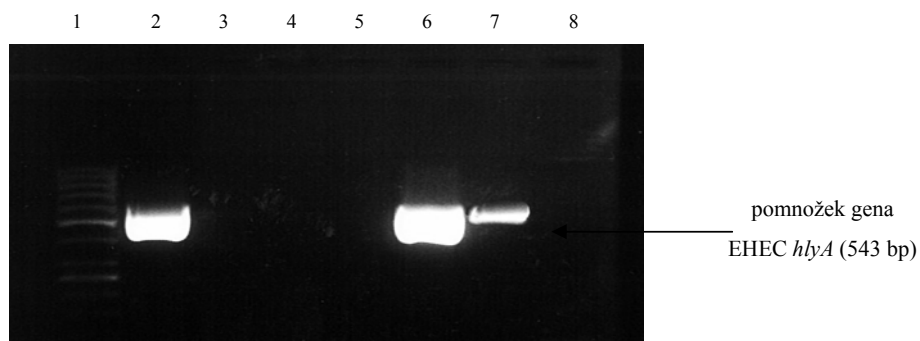
Slika 7: Gelska elektroforeza produktov PCR za določanje pomnožkov *fliC* H7

Legenda: 1 - standardna lestvica 50-bp, 2 - izolat MB7, 3 - izolat MB1, 4 - izolat MB2, 5 - izolat MB27, 6 - izolat MB38, 7 - izolat MB39, 8 - negativna kontrola.



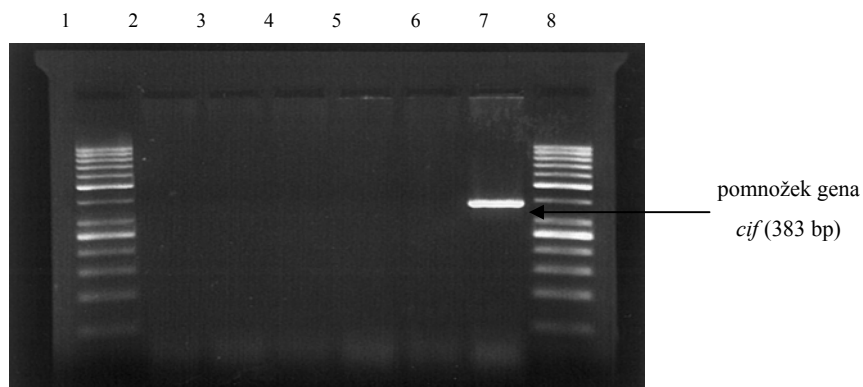
Slika 8: Gelska elektroforeza produktov PCR za določanje pomnožkov *eaeA*

Legenda: 1 - standardna lestvica 50-bp, 2 - izolat MB7, 3 - izolat MB11, 4 - izolat MB22, 5 - izolat MB27, 6 - izolat MB38, 7 - izolat MB39, 8 - negativna kontrola.



Slika 9: Gelska elektroforeza produktov PCR za določanje pomnožkov EHEC *hlyA*

Legenda: 1 - standardna lestvica 50-bp, 2 - izolat MB7, 3 - izolat MB4, 4 - izolat MB5, 5 - izolat MB27, 6 - izolat MB38, 7 - izolat MB39, 8 - negativna kontrola.



Slika 10: Gelska elektroforeza produktov PCR za določanje pomnožkov *cif*

Legenda: 1 - standardna lestvica 50-bp, 2 - izolat MB1, 3 - izolat MB2, 4 - izolat MB3, 5 - izolat MB4, 6 - izolat MB5, 7 - pozitivna kontrola, 8 - standardna lestvica 50-bp.

4.4 SINTEZA KOLICINOV

Sintezo kolicinov smo preverjali pri vseh izolatih *E. coli* izoliranih iz blata goveda in konj. Odkrili smo, da 16 izolatov, kar znaša 47 % vseh izolatov, sintetizira vsaj enega izmed kolicinov. Pri vseh 4 izolatih, ki so bili pozitivni za *stx2*, smo odkrili tudi sintezo kolicinov.

4.5 PRISOTNOST LIZOGENIH FAGOV

Prisotnost lizogenih bakteriofagov smo preverjali pri vseh izolatih. Preverjali smo jih s pomočjo indukcije z UV svetlobo. Bakteriofage smo opazili pri 6 izolatih, kar znaša slabih 18 % vseh izoliranih izolatov *E. coli*. Pri treh izolatih, ki so bili pozitivni za *stx2* so bili prisotni tudi lizogeni bakteriofagi.

4.6 STATISTIČNA ANALIZA

Preglednica 10: Porazdelitev virulentnih dejavnikov, kolicinogenost in prisotnost fagov glede na filogenetske skupine

	PREVALENCA IZOLATOV N (%), VREDNOST p FISHERJEVEGA EKSAKTNEGA TESTA							
	FILOGENETSKE SKUPINE							
	A	p	B1	p	B2	p	D	p
<i>fyuA</i>	0 (0)	0,3058	3 (50)	0,641	3 (50)	0,0033	0 (0)	0,0691
<i>stx2</i>	1 (25)	1	2 (50)	0,6015	0 (0)	1	1 (25)	1
COL +	4 (25)	0,6815	4 (25)	0,2966	0 (0)	0,2299	8 (50)	0,0407
fagi +	0 (0)	0,3058	3 (50)	0,641	0 (0)	1	3 (50)	0,641

Preglednica 10 prikazuje rezultate statistične analize povezanosti virulentnih dejavnikov, kolicinogenosti in prisotnosti fagov glede na filogenetske skupine. Iz preglednice je razvidno, da je *stx2* približno enakomerno razdeljen med filogenetske skupine A, B1 in D. Zapis *fyuA* je statistično značilno povezan s filogenetsko skupino B2. Kolicinogenost je bila statično značilno povezana s filogenetsko skupino D. Prisotnost fagov je bila ugotovljena le pri skupinah B1 in D, medtem ko kolicinogenosti nismo odkrili le pri skupini B2.

Preglednica 11: Porazdelitev *fyuA* in *stx2* glede na kolicinogenost in prisotnost fagov

	PREVALENCA IZOLATOV N (%), VREDNOST p FISHERJEVEGA EKSAKTNEGA TESTA			
	COL +	p	fagi +	p
<i>fyuA</i>	1 (17)	0,1801	1 (17)	1
<i>stx2</i>	4 (100)	0,0392	3 (75)	0,0124
fagi +	6 (100)	0,0059		

Kot je iz preglednice 11 razvidno je *stx2* tesno povezan s tvorbo kolicinov in prisotnostjo lizogenih fagov. Podobno velja tudi za povezavo med tvorbo kolicinov in prisotnostjo lizogenih fagov, saj so vsi sevi, pri katerih smo ugotovili prisotnost fagov, tvorili kolicine.

5 RAZPRAVA

V literaturi so pogoste raziskave, v katerih avtorji uvrščajo seve *E. coli*, ki povzročijo različne okužbe, v filogenetske skupine, ter ugotavljajo povezavo med virulentnostjo sevov in filogenetskimi skupinami. V številnih študijah so ugotovili, da sevi *E. coli*, ki veljajo za virulentne zunajčrevesne seve, v večini spadajo v filogenetsko skupino B2, v nekaterih primerih tudi v skupino D, medtem ko večina komenzalnih sevov pripada filogenetski skupini A in skupini B1, ki lahko povzročajo tudi hudo diarejo (Clermont in sod., 2000; Escobar-Paramo in sod., 2004; Girardeau in sod., 2005). Zadnje raziskave kažejo na to, da večina sevov STEC in EHEC spada v filogenetske skupine A, B1 in D (Escobar-Paramo in sod., 2004). Pri našem delu smo podatke o vseh izolatih *E. coli* združili in ugotavljali uvrščenost v posamezne filogenetske skupine, ter njihovo povezanost z virulentnimi dejavniki. Med 34 izolati iz naše zbirke jih je bilo 7 (20 %) iz skupine A, 12 (35 %) iz skupine B1, 3 (9 %) iz skupine B2 in 12 (35 %) iz skupine D. Izolati iz skupine B2 in D predstavljajo 44 % izolatov iz naše zbirke. Tako lahko sklepamo, da lahko 56 % vseh naših izolatov predstavlja komenzalne seve. Med skoraj vsemi izolati 31 (91 %), ki jih uvrščamo v filogenetske skupine A, B1 in D, lahko najdemo tudi seve EHEC.

Z biološki testi in z verižno reakcijo s polimerazo smo določili nabor virulentnih dejavnikov značilnih za seve EHEC, citotoksični nekrotizirajoči dejavnik CNF1 ter sistemi prevzema železa. Tako smo ugotovili kolikšen delež izolatov *E. coli* ima zapis za sintezo poglavitnih virulentnih dejavnikov sevov EHEC.

Od virulentnih dejavnikov smo preverjali pogostost *fyuA*, ki kodira sistem za privzemanje železa, predvsem pri *Yersinia* spp, vendar so Schubert in sod. (1998) gen našli tudi pri EAggEC sevih, redko tudi pri sevih EPEC in EIEC, medtem ko naj ne bi bili prisotni pri sevih EHEC. Zapis za *fyuA* smo v našem diplomskem delu ugotovili pri 6 (18 %) izolatih naše zbirke, kar ne predstavlja velikega števila, vendar je pomemben dejavnik, tako pri privzemu železa, kot pri sami patogenosti. Zapis je bil ugotovljen tudi pri izolatu MB39, ki je bil pozitiven tudi za *stx2*, kar ni v skladu z raziskavami, ki so jih opravili Schubert in

sod. (1998), vendar njihovi sevi niso bili izolirani iz blata goveda. Kasneje so Karch in sod. (1999) ugotovili, da so tudi nekateri sevi STEC pozitivni za *fyuA*.

Preverjali smo tudi pogostost gena *cif*, ki so prisotni predvsem pri sevih EPEC in EHEC in ki vpliva na ureditev aktinskega citoskeleta, kar povzroči zaustavitev celičnega cikla faze G₂/M, tako da inaktivira fosforiliran Cdk1. Loukiadis in sod. (2008) so odkrili *cif* pri skoraj 3 % (115/5049) njihovih sevov *E. coli* živalskega in humanega izvora. Kot zanimivost so odkrili tudi, da so vsi *cif* pozitivnih sevi bili pozitivnih tudi za *eae*, kar je nakazalo tesno povezanost med dvema genoma znotraj otoka patogenosti LEE (Loukiadis in sod., 2008). V našem diplomskem delu smo prišli do rahlo drugačnih rezultatov, saj noben izmed preučevanih izolatov ni bil pozitiven za *cif*. Verjetno je k temu pripomogel manjši nabor izolatov in tudi dejstvo, da se *cif* nahaja na profagu in da je prisoten predvsem pri sevih EPEC, ki so manj pogosti pri govedu.

Tako kot za *cif*, tudi za *cnfI* ni bil pozitiven noben od izolatov *E. coli* naše zbirke. Rezultat je bil pričakovan, saj je sinteza CNF1 bolj pogosta pri kliničnih izolati, kot pri bakterijah izoliranih iz blata živali (Bahrani-Mougeot in sod., 2002). Vendar so tudi nekateri znanstveniki preiskovali *cnfI* v blatu goveda. V manjšem številu (4 %) je bil *cnfI* prisoten tako pri zdravem, kot pri bolnem govedu (Burns in sod., 1995).

Izmed vseh 34 izolatov naše zbirke so bili 4 (12 %) pozitivni za *stx2*, medtem ko noben izolat ni bil pozitiven za *stx1*. Čeprav nismo analizirali sinteze toksinov, je tako visoka prevalenca *stx2* gena v zdravem govedu zaskrbljujoč podatek. Predhodne raziskave so razkrile, da so sevi *E. coli*, ki tvorijo samo toksin Stx2, bolj virulentni kot sevi, ki tvorijo samo Stx1 ali oba toksina (Serna in Boedeker, 2008). Podatki o prevalenci sevov, ki tvorijo Šigove toksine so zelo različni in segajo vse do 71 % (Cerqueria in sod., 1999). Neposredna primerjava z našimi podatki je zelo težka, saj gre za različno velike vzorce in različne metode dokazovanja. Vendar vsi ti rezultati kažejo, da je prevalenca Šigovih toksinov v zdravem govedu zelo visoka, kar je razvidno tudi iz naše naloge. Podatek je pomemben, saj so Šigovi toksini tipa 2 najpogosteje povezani s hudi infekcijami, ki vodijo do težkih obolenj.

Če primerjamo prevalenco gena *stx2* z uvrščanjem v filogenetsko skupino, sta 2 (50 %) *stx2*-pozitivna izolata uvrščena v filogenetsko skupino B1, kot je bilo opažano tudi s strani drugih raziskovalcev (Girardeau in sod., 2005), ki so ugotovili, da večina *stx2*-pozitivnih sevov spada v skupino B1. Pri našem delu smo druga dva *stx2*-pozitivna izolata uvrstili tudi v filogenetski skupini A (25 %) in D (25 %), kar je pričakovano, saj so *stx2*-pozitivni sevi ponavadi v teh dveh skupinah predstavljeni v manjšem številu. Medtem ko sevi, ki jih uvrščamo v filogenetsko skupino B2, zelo redko tvorijo Šigove toksine (Girardeau in sod., 2005). Za bolj natančno določanje bi potrebovali večje število vzorcev v naši zbirki.

Izolate, ki so bili pozitivni za *stx2*, smo nadaljnje preverjali tudi za *eaeA*, *fliC* H7 in EHEC *hlyA*. Vsi trije geni so zelo pomembni pri patogenosti EHEC in jih uporabljajo za določanje posameznih serotipov *E. coli*. Gen za intimin je v 100 % prisoten pri serotipu O157:H7 in 17 % v "non-O157:H7" (Blanco in sod., 2004). Pri našem diplomskem delu smo *eaeA* odkrili pri enem izolatu, ki je bil že pozitiven za *stx 2*. Glede na to, da v naši zbirki naj ne bi bilo serotipa O157:H7 je bil rezultat pričakovan.

Tudi EHEC *hlyA* je zelo pomemben pokazatelj patogenosti in ga velikokrat preverjajo v multiplih PCR reakcijah skupaj z zgoraj naštetimi geni za odkrivanje *E. coli*, ki sintetizirajo Šigove toksine (Paton in Paton, 1998). Pri našem diplomskem delu smo EHEC *hlyA* ugotovili pri treh izolatih, ki so že bili pozitivni za *stx2*. Tako smo tudi mi potrdili močno povezanost teh dveh virulentnih dejavnikov in lahko te izolate označimo za potencialno zelo patogene seve EHEC.

Pri identifikaciji *E. coli*, ki sintetizirajo Šigove toksine se velikokrat znanstveniki zanašajo tudi na *fliC*, ki kodira flagelin, ki je zelo pomemben pri patogenosti. S pomočjo flagelina seve *E. coli* delimo na posamezne serotipe (determinanta H) (Ratiner in sod., 2003). Tudi sami *fliC* se med seboj razlikujejo, glede na to kateri sev *E. coli* raziskujejo. Gre za zelo ohranjene zapise, ki jih lahko najdemo pri skoraj vsakem sevu *E. coli* (Schoenahls in Whitfield, 1993). Tudi pri našem diplomskem delu smo prišli do podobnih rezultatov, saj so bili vsi izolati, kateri so bili pozitivni za *stx2* pozitivni tudi za *fliC* H7, kar kaže, da bi lahko naši izolati spadali v skupino H7. Hkrati lahko sklepamo, da je kolonizacija s pomočjo flagelov, zelo pomembna stopnja patogenosti, vendar so *fliC* H7 našli tudi pri negibljivih sevih *E. coli* in velikokrat tudi pri drugih skupinah H (Wang in sod., 2002).

Prisotnost lizogenih fagov je bila dokazana pri 6 (18 %) izolatih *E. coli* v naši zbirki. Če primerjamo prisotnost lizogenih bakteriofagov s *stx2*-pozitivnimi izolati, smo ugotovili, da je bila prisotnost lizogenih fagov dokazana le pri treh (75 %) *stx2*-pozitivnih izolatih. Rezultat je pričakovan, saj je bilo v več raziskavah dokazano, da so geni za Šigove toksine kodirani na lizogenih bakteriofagih, vendar pa so lahko kodirani tudi na kromosomu (Nataro in Kaper, 1998).

Kolicinogenost smo preverjali pri vseh 34 izolatih *E. coli* v naši zbirki. Kolicini so bili prisotni pri 16 izolatih, kar predstavlja 47 % celotne zbirke. Raziskave v preteklosti so pokazale, da je v blatu goveda in drugih domačih živalih prisotnih približno tretjina sevov *E. coli*, sposobnih sinteze kolicinov (Dhillon in Elvera, 1981). To kaže na pomembnost kolicinov, s katerimi bakterija brani svojo ekološko nišo in uravnava mikrobnost raznolikost. Vsi izolati v naši zbirki, ki so bili *stx2*-pozitivni so bili sposobni tudi sinteze kolicinov.

6 SKLEPI

- Od vseh 34 proučenih izolatov *E. coli* smo 7 (20 %) uvrstili v skupino A, 12 (35 %) v skupino B1, 3 (9 %) v skupino B2 in 12 (35 %) v skupino D.
- Gen za Šigov toksin *stx2* je bil prisoten v 4 izolatih naše zbirke, kar predstavlja skoraj 12 % vseh proučevanih izolatov *E. coli*, kar pomeni visok odstotek med zdravo populacijo.
- Vsi izolati, ki so bili pozitivni za *stx2*, so bili pozitivni tudi za *fliC* H7. Trije (75 %) so bili pozitivni za EHEC *hlyA* in 1 (25 %) za *eaeA*. Vsi navedeni virulentni dejavniki so zelo pomembni pri patogenosti *E. coli*, kar potrjuje, da gre za seve EHEC.
- Šest (18 %) izolatov je bilo pozitivnih za *fyuA*, ki je potreben za privzem železa. Le en *stx2* izolat je bil pozitiven tudi za *fyuA*, kar je primerno, saj skupek teh genov naj ne bi bil prisoten pri sevih EHEC.
- Izmed 34 izolatov v naši zbirki je 16 (47 %) izolatov sintetiziralo kolicine. Vsi štirje izolati, ki so bili pozitivni za *stx2*, so hkrati bili zmožni sinteze kolicinov.
- Prisotnost lizogenih fagov je bila dokazana pri 6 (18 %) izolatih *E. coli* naše zbirke. Vendar je bila prisotnost lizogenih fagov dokazana le pri treh izolatih iz naše zbirke, ki so bili tudi pozitivni za *stx2*.

7 POVZETEK

Bakterije *E. coli* so del mikrobiote živali s stalno telesno temperaturo in ljudi ter večinoma ne povzročajo okužb. Nekateri sevi so patogeni in povzročajo črevesne in zunajčrevesne okužbe.

V svetovnem merilu so patogeni sevi *E. coli* med poglavitnimi povzročitelji črevesnih okužb. Sevi skupine EHEC povzročajo hemoragični kolitis in hemolitični uremični sindrom z akutno odpovedjo ledvic. Poglavitni rezervoar sevov EHEC so zdravi prežvekovalci. Do okužbe pri ljudeh običajno pride ob zaužitju okužene hrane, vode ali pri telesnem stiku z okuženo osebo. Za okužbo je značilna majhna infektivna mera (manj kot 100 bakterijskih celic).

Sposobnost, da sevi vrste *E. coli* povzročijo bolezen, je odvisna od genskih zapisov za različne virulentne dejavnike, ki bakterijam omogočajo kolonizacijo gostiteljskih celic, vdor, preživetje in izločanje toksinov.

V tem diplomskem delu smo preučevali zbirko 34 izolatov, ki so bili izolirani iz blata zdravega goveda na kmetijah v okolici Ljubljane. Z metodo verižne reakcije s polimerazo smo vse izolate uvrstili v filogenetske skupine, preverili smo tudi gene za virulentne dejavnike, ki so značilni za seve EHEC in tudi nekatere druge virulentne dejavnike, ki so značilni za druge patotipe *E. coli*. Ugotavljali smo genetske zapise za Šigove toksine *stx1* in *stx2*, jersinijabaktin *fyuA*, citotoksični nekrotizirajoči dejavnik *cnf1*, intimin *eaeA*, enterohemolizin EHEC *hlyA*, flagelin serotipa O157:H7 *fliC* H7 in inhibitorni faktor celičnega cikla *cif-int*. Pomemben del naloge je bil tudi ugotavljanje lizogenih fagov in kolicinov.

Med vsemi 39 izolati smo jih 7 (20 %) uvrstili v skupino A, 12 (35 %) v skupino B1, 3 (9 %) v skupino B2 in 12 (35 %) v skupino D.

Gen za Šigove toksine *stx2* je bil prisoten v 4 izolatih naše zbirke, kar predstavlja skoraj 12 % vseh izoliranih izolatov *E. coli*, kar pomeni visok odstotek med zdravo populacijo. Podatek je v neki meri kar zaskrbljujoč in daje še posebno pozornost sami pripravi prehrane in rokovanju z mesom.

Prisotnost lizogenih fagov je bila dokazana pri 6 (18 %) izolatih *E. coli* naše zbirke. Vendar so bili lizogeni fagi dokazani le pri 3 izolatih iz naše zbirke, ki so bili tudi pozitivni za *stx2*.

8 VIRI

- Andlovic A. 2002. *Escherichia coli* V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikrobiologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 185-188
- Bahrani-Mougeot F., Gunther IV N. W., Sonnenberg S. M., Mobley H. L. T. 2002. Uropathogenic *Escherichia coli*. V: *Escherichia coli*: Virulence mechanisms of a versatile pathogen. Sonnenberg S. M. (ed.). Amsterdam, Academic Press: 239-259
- Bauer M.E., Welch R.A. 1996. Characterization of an RTX toxin from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity*, 64, 1: 167-175
- Bekal S., Brousseau R., Masson L., Prefontaine G., Fairbrother J., Harel J. 2003. Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 5: 2113-2125
- Bingen E., Picard B., Brahimi N., Mathy S., Desjardins P., Elion J., Denamur E. 1998. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *Journal of Infectious Disease*, 177: 642-650
- Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Dahbi G., Alonso M.P., Gonzalez E.A., Bernardez M.I., Blanco J. 2004. Serotypes virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ξ*). *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 645-651
- Blattner F.R., Plunkett G.III, Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides N., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Dawis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277:1453-1462
- Braun V., Hantke K., Kösten W. 1998. Bacterial iron transport: Mechanisms, genetics and regulation. V: Metal ions in biological systems. Vol. 35. Sigel A., Sigel D. (eds.). Basel, Marcell Dekker Inc.: 67-145
- Braun V., Patzer S.I., Hantke P. 2002. Ton-dependent colicins and microcins: Modulat design and evolution. *Biochimie*, 84: 365-380

- Burns A. L., Ball H. J., Finlay D. A. 1995. CNF producing *Escherichia coli* isolated from cattle in Northern Ireland. *Veterinary Microbiology*, 49: 235-241
- Caprioli A., Morabito S., Brugere H., Oswald E. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: Emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research*, 36: 289-311
- Cerqueria A.M.F., Guth B.E.C, Joaquim R.M., Andrade J.R.C. 1999. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Veterinary Microbiology*, 70: 111-121
- Clermont O., Bonacorsi S., Bingen A. 2000. Rapid and simple determination of the phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 10: 4555-4558
- Delahay R.M., Frankel G., Knutton S. 2001. Intimate interaction of enteropathogenic *Escherichia coli* at the host cell surface. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 14: 559-565
- Dhillon T.S., Elvera K.S. 1981. Incidence of lysogeny, colicinogeny, and drug resistance in enterobacteria isolated from sewage and from rectum of humans and some domesticated species. *Applied and Environmental Microbiology*, 41:894-902
- Erdem A.L., Avelino F., Xicohtencatl-Cortes J., Giron J.A. 2007. Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 189, 20: 7426-7435
- Escobar-Páramo 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
- Girardeau J.P., Dalmaso A., Bertin Y., Ducrot C., Bord S., Livrelli V., Vernozy-Rozand C., Martin C. 2005. Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 12: 6098-6107
- Griffin P.M., Tauxe A.V. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiologic Reviews*, 13: 60-98
- Johnson J.R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 4, 1: 80-128

- Johnson J.R., 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
- Karch H., Böhm H., Schmidt H., Gunzer F., Aleksic S., Heesemann J. 1993. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H. *Journal of Clinical Microbiology*, 31:1200–1205
- Karch H., Schubert S., Zhang D., Zhang W., Schmidt H., Ölschläger T., Hacker J. 1999. A genomic island, termed high-pathogenicity island is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infection and Immunity*, 67, 11: 5994-6001
- Kelly W.L. 2006 Lex marks the spot: The virulent side of SOS and closer look of LexA regulon. *Molecular Microbiology*, 62, 5: 1228-1238
- Kuhar I., Grabnar M., Žgur-Bertok D. 1998. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli* in fecal strains from intestinal infections and healthy individuals. *FEMS Microbiology Letters*, 164: 243-248
- Langsrud Ø. 2004. Fisher's exact test. Oslo, Statistics Norway, Division for Statistics Methods and Standards): 1 str.
<http://www.langsrud.com/fisher.htm> (Januar, 2011)
- Loukiadis E., Nobe R., Herold S., Tramuta C., Ogura Y., Ooka T., Morabito S., Kerouredan M., Brugere H., Schmidt H., Hayashi T., Oswald E. 2008. Distribution, functional expression, and genetic organization of Cif, a phage-encoded type III secreted effector from enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190, 1: 275-285
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th ed. Upper Saddle River, Pearson Education, Inc: 1019 str.
- Marches O., Ledger T.N., Boury M., Ohara M., Tu X., Goffaux F., Mainil J., Resenshine I., Sugai M., De Ricke J., Oswald E. 2003. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, wich blocks cell cycle G₂/M transition. *Molecular Microbiology*, 50, 5: 1553-1567
- McGrath S., van Sinderen D. 2007. Bacteriophage: Genetics and molecular biology. Norfolk, Caister Academic Press: 335 str.

- Nataro J.P., Kaper J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 1: 142-201
- Oswald E., Schmidt H., Morabito S., Karch H., Marches O., Caprioli A. 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infection and Immunity*, 68: 64-71
- Paton A.W., Paton J. C. 1998. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, EHEC *hlyA*, *rfb*_{O111}, and *rfb*_{O157}. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 598-602
- Raghubeer E.V., Matches J.R. 1990. Temperature range for growth of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 803-805
- Ratiner Y.A., Salmenlinna S., Eklund M., Keskimäki M., Siitonen A. 2003. Serology and genetics of the flagellar antigen of *Escherichia coli* O157:H7, 7c. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 3:1033-1040
- Reid S.D., Herbelin C.J., Whitman T.S. 2000. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*, 406: 64-67
- Riley M.A. 1993. Molecular mechanism of colicin evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 6: 1380-1395
- Riley M.A., Wertz J.E. 2002. Bacteriocins: Evolution, ecology and application. *Annual Review of Microbiology*, 56: 117-137
- Schmidt H., Beutin L., Karch H. 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of O157:H7 strain EDL 933. *Infection and Immunity*, 63, 3: 1055-1061
- Schoenhals G., Whitfield C. 1993. Comparative analysis of flagelin sequences from *Escherichia coli* strains possessing serologically distinct flagellar filaments with a shared complex surface pattern. *Journal of Bacteriology*, 175, 17: 5395-5402
- Schubert S., Rakin H., 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
- Serna A., Boedeker E.C. 2008. Pathogenesis and treatment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Current Opinion in Gastroenterology*, 24: 38-47

- Taieb F., Nougayrede JP., Watrin C., Samba-Louka A., Oswald E. 2006. *Escherichia coli* cyclomodulin Cif induces G2 arrest of the host cell-cycle without activation of the DNA-damage checkpoint-signalling pathway. *Cell Microbiology*, 8: 1910-1921
- Wagner P.L., Waldor M.K. 2002. Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infection and Immunity*, 70:3985-3993
- Wang G., Clark G. C., Rodgers F. 2002. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 3613-3619

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem prof. dr. Darji Žgur-Bertok in somentorici doc. dr. Marjanci Starčič Erjavec za mentorstvo in strokovno pomoč pri izvedbi diplomske naloge ter doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja za hitro recenzijo.

Za vso pomoč in nasvete pri praktičnem delu diplomske naloge se zahvaljujem dr. Zdravku Podlesku in Živi Petkovšek.

Hvala pa tudi vsem, ki ste kakorkoli pomagali pri izvedbi naloge in mi stali ob strani, še posebej družini in prijateljem.

