

Biokemijska i molekularna analiza izolata bakterije *Escherichia coli* izdvojenih iz hrane životinjskog podrijetla i obrisaka klaoničkih trupova

Stojević, Dora

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:395914>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)





Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Dora Stojević

**Biokemijska i molekularna analiza
izolata bakterije *Escherichia coli*
izdvojenih iz hrane životinjskog
podrijetla i obrisaka klaoničkih trupova**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Dora Stojević

**Biochemical and molecular analysis of
Escherichia coli strains isolated from
food of animal origin and carcass swabs**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Dora Stojević

**Biokemijska i molekularna analiza
izolata bakterije *Escherichia coli*
izdvojenih iz hrane životinjskog
podrijetla i obrisaka klaoničkih trupova**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Doc. dr. sc. Andrea Humski
Izv. prof. dr. sc. Vesna Dobranić

Zagreb, 2017.



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Dora Stojević

**Biochemical and molecular analysis of
Escherichia coli strains isolated from
food of animal origin and carcass swabs**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Doc. dr. sc. Andrea Humski
Izv. prof. dr. sc. Vesna Dobranić

Zagreb, 2017

Zahvaljujem se mentoricama doc. dr. sc. Andrei Humski i izv. prof. dr. sc. Vesni Dobranić na vodstvu i pomoći prilikom izrade doktorskog rada te savjetima i strpljenju.

Zahvaljujem se Hrvatskom veterinarskom institutu i akademiku Željku Cvetniću na ukazanoj prilici prilikom izbora znanstvenih novaka na projektu „Molekularna epizootiologija važnih bakterijskih zoonoza“.

Zahvaljujem se kolegicama dr. sc. Sanji Duvnjak i Ireni Reil, dr. med. vet. iz Laboratorija za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti i dr. sc. Relji Beku iz Laboratorija za parazitologiju na pomoći i savjetima prilikom izvođenja molekularnih pretraga, a prije svega na prijateljstvu i susretljivosti.

Zahvaljujem se dr. sc. Miroslavu Beniću na pomoći prilikom statističke obrade podataka.

Zahvaljujem se djelatnicima Laboratorija za mikrobiologiju hrane na podršci i pomoći.

Također se zahvaljujem svim drugim kolegama Hrvatskog veterinarskog instituta koji su mi svojim savjetima pomogli u izradi doktorskog rada.

Veliko hvala svim mojim prijateljima na podršci i razumijevanju.

Najveća hvala mojoj obitelji na svakodnevnoj pomoći i strpljenju. Ovaj doktorat posvećujem vama.

SAŽETAK

Hrana životinjskog podrijetla predstavlja mogući izvor patogenih sojeva *Escherichia coli* opasnih za ljude. Iako su većina sojeva crijevni komenzali, pojedini mogu uzrokovati crijevne (intestinalne) i izvancrijevne (ekstraintestinalne) infekcije. Njihova patogenost povezana je s prisutnošću gena za čimbenike virulencije, pripadnošću filogrubi te s biokemijskim svojstvima kod pojedinih serovarova.

U ovom istraživanju pretraženo je 100 izolata bakterije *E. coli* izdvojenih iz uzoraka mesa i obrisaka trupova različitih vrsta životinja. Izolatima su određene biokemijske karakteristike VITEK2 sustavom, a molekularnim metodama određena je prisutnost gena za čimbenike virulencije i pripadnost filogrubi.

U izolatima je dokazana prisutnost patogrupa: EAEC (*EAST1*), ETEC (*STII*), EPEC (*eae*), ExPEC (*cnf1*, *cnf2*) i EHEC/VTEC (*vtx1*, *vtx2*). Najučestalija patogrupa je EAEC (20%), dokazana u izolatima podrijetlom od mesa peradi, divljači, svinja i goveda. Patogrupe EPEC (9%) i ExPEC (6%) također su dokazane u potonjima, dok su patogrupe ETEC (5%) i VTEC (2%) dokazane u izolatima podrijetlom od divljači i svinja. Najviše gena za čimbenike virulencije ustanovljeno je u izolatima podrijetlom od divljači.

Biokemijskom karakterizacijom izolata ustanovljena je povezanost između prisustva *eae* gena i aktivnosti alkalinizacije sukcinata. Osim toga, također je primjetna povezanost između prisustva *cnf1* gena i aktivnosti enzima arilamidaze prema tirozinu.

Pomoću lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction* – PCR) izolati su svrstani u filogrupe. Najučestalije filogrupe bile su A (38%) i B1 (36%) u koje je svrstana većina pretraživanih izolata. Od ostalih filogruba, s manjom učestalošću, bile su zastupljene filogrupe B2 (4%), C (3%), D (9%), E (4%) i F (6%). Rezultati statističke analize prikazuju povezanost između podrijetla izolata i pripadnosti filogrubi, što ukazuje na sklonost održavanja filogruba unutar određenih domaćina (životinjskih vrsta). Također, prikupljeni podaci prikazuju nova saznanja o filogenetskoj strukturi *E. coli* u domaćih i divljih životinja na području Republike Hrvatske.

Prikazani rezultati ukazuju kako hrana različitog životinjskog podrijetla predstavlja potencijalni izvor crijevnih i izvancrijevnih patogenih *E. coli*.

Ključne riječi: *Escherichia coli*, geni za čimbenike virulencije, filogrupa, biokemijske karakteristike

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Escherichia coli* (*E. coli*) is a Gram negative, aerobic and facultatively anaerobic, non-sporogenic, rod-shaped bacterium, member of the *Enterobacteriaceae* family. While most strains are intestinal commensal bacteria, some can cause intestinal and extraintestinal infections. Their pathogenicity is linked to the presence of virulence genes, phylo-group and in some strains to biochemical characteristics.

Pathogenic and commensal (nonpathogenic) *E. coli* can be differentiated in several ways. According to virulence genes and clinical symptoms pathogenic *E. coli* are divided in seven pathogenic groups: enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), enteroadherent *E. coli* (EAEC) or enteroaggregative *E. coli* (EaggEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), diffusely adherent *E. coli* (DAEC) and extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC).

Pathogenic and nonpathogenic *E. coli* are divided in four main phylo-groups (A, B1, B2 and D), but according to the latest research there are now eight phylo-groups (A, B1, B2, C, D, E, F and I). Commensal and strains that cause intestinal disease mainly belong to A and B1 phylo-group, while extraintestinal strains mostly belong to B2 phylo-group and D in lower incidence.

Food of animal origin presents a possible source of pathogenic *Escherichia coli* that pose a danger for human health. Aim of this study is to determine biochemical properties, presence of virulence genes and phylo-group affiliation of *E. coli* strains isolated from foods of different animal origin and carcass swabs from the area of the Republic of Croatia. The properties of the strains will be compared and will provide an insight to the presence of potentially pathogenic strains and their characteristics.

MATERIAL AND METHODS: A total of 100 *E. coli* isolates were analysed in this study. The strains were isolated from meat (poultry, game, pigs and cattle) and carcass swabs (pigs and cattle). Biochemical characteristics of the strains were determined using VITEK2 system. Using molecular methods, the strains were tested for the presence of virulence genes and assigned to a phylogroup. A group of 17 specific virulence genes (*ipaH*, *aggR*, *aaiC*, *lt*, *stp*, *sth*, *STI*, *STII*, *bfp*, *vtx1*, *vtx2*, *eae*, *saa*, *hlyA*, *EAST1*, *cnf1*, *cnf2*) was tested for determination of pathogroups in foods of different animal origin.

RESULTS: Using specific virulence genes the presence of pathogroups EAEC (*EAST1*), ETEC (*STII*), EPEC (*eae*), ExPEC (*cnf1*, *cnf2*) and EHEC/VTEC (*vtx1*, *vtx2*) was confirmed. Pathogroup EAEC was detected in strains isolated from samples of different animal origin (poultry, game, pigs and cattle) with the highest prevalence (20%). Pathogroups EPEC (9%) and ExPEC (6%) were also detected in strains isolated from the latter, while ETEC (5%) and VTEC (2%) were detected in strains isolated from game and pigs. Some strains isolated from poultry, game and pigs had more than one virulence gene detected in one strain, which shows that a lot of virulence genes are located on mobile genetic elements and that assigning a strain of *E. coli* to a specific pathogroup is very complicated.

Most of the virulence genes (*EAST1*, *STII*, *eae*, *cnf1*, *cnf2*, *stx1*, *hlyA*) were detected in strains isolated from game and a connection between the source of the isolate and the presence of virulence genes was confirmed statistically ($p=0.004$). Contamination of the meat and the high percentage of virulence genes could be explained with inadequate shot placement, evisceration of the animal on the field and improper storage of the meat.

Biochemical characteristics of the strains were very similar. Comparing them with the presence of virulence genes, this study determined a link between the presence of *eae* virulence gene and succinate alkalization which was confirmed statistically. Except from the above, a link between the presence of *cnf1* virulence gene and the enzyme tyrosine arylamidase was also confirmed.

This study analyzed the occurrence and distribution of phylo-groups in 100 *E. coli* strains isolated from poultry, game, pigs and cattle. Using polymerase chain reaction (PCR) the isolates were assigned to a phylo-group. Most of the strains were assigned to A (38%) and B1 (36%) phylo-group and other strains were represented in a lower incidence: B2 (4%), C (3%), D (9%), E (4%) and F (6%). Results of statistical analysis demonstrate that phylo-groups are associated with the source of the strain ($p=0.039$) and the results provide a knowledge in phylogenetic structure of *E. coli* isolated from domestic animals in the Republic of Croatia.

CONCLUSIONS: In this study the most prevalent pathogenic group of *E. coli* was EAST (20%). The following are EPEC (9%), ExPEC (6%), ETEC (5%) and VTEC (2%). Listed data shows a distribution and presence of pathogenic groups in food of different animal origin. Most virulence genes were present in meat from game which confirms that game is a significant source of pathogenic *E. coli*.

Most strains were assigned to A and B1 phylo-groups, which confirms that most commensal and intestinal pathogenic *E. coli* belong in these phylo-groups.

Statistical analysis shows a link between the origin of the sample and phylo-group affiliation, which confirms that phylo-groups have a tendency towards specific hosts.

For most strains researched in this study, biochemical characteristics were very similar and had no relevance. Their comparison with the presence of virulence genes shows a link between the presence of *eae* virulence gene and succinate alkalization and *cnf1* and tyrosine arylamidase, but for further conclusions more strains of this virulence characteristics have to be tested.

Results presented in this research indicate that foods of different animal origin represents a source of intestinal and extraintestinal pathogenic *E. coli*.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA | 2 |
| 2.1. Biokemijske karakteristike i izdvajanje izolata <i>E. coli</i> | 2 |
| 2.2. Vrste patogenih <i>E. coli</i> | 7 |
| 2.2.1. Enterotoksigena <i>E. coli</i> (ETEC) | 10 |
| 2.2.2. Enteropatogena <i>E. coli</i> (EPEC) | 13 |
| 2.2.3. Enterohemoragična <i>E. coli</i> (EHEC) | 16 |
| 2.2.4. Enteroinvazivna <i>E. coli</i> (EIEC) | 19 |
| 2.2.5. Enteroagregativna ili enteroadherentna <i>E. coli</i> (EAEC) | 21 |
| 2.2.6. Difuzno adherentna <i>E. coli</i> (DEAC) | 23 |
| 2.2.7. Ekstraintestinalna patogena <i>E. coli</i> (ExPEC) | 24 |
| 2.3. Filogrupe | 26 |
| 3. OBRAZLOŽENJE TEME | 30 |
| 4. MATERIJAL I METODE | 31 |
| 4.1. Materijal | 31 |
| 4.2. Metode | 31 |
| 4.2.1. Mikrobiološka pretraga | 31 |
| 4.2.2. Biokemijske pretrage | 32 |
| 4.2.3. Molekularne metode | 33 |
| 4.2.3.1. Dokazivanje prisutnosti čimbenika virulencije | 33 |
| 4.2.3.2. Određivanje pripadnosti filogrubi | 39 |
| 4.2.4. Verifikacija biokemijskih i molekularnih metoda | 40 |
| 4.2.5. Statistička obrada podataka | 41 |
| 5. REZULTATI | 42 |
| 5.1. Morfološke karakteristike bakterijskih izolata | 42 |
| 5.2. Biokemijske pretrage bakterijskih izolata | 44 |
| 5.3. Molekularne pretrage na gene za čimbenike virulencije | 47 |
| 5.4. Zastupljenost patogrupa u izolatima | 52 |
| 5.5. Molekularne pretrage na filogrupe | 53 |
| 5.6. Usporedba morfoloških i biokemijskih karakteristika s prisutnošću gena koji | 59 |

| | |
|--|-----|
| kodiraju čimbenike virulencije i pripadnosti filogrubi | |
| 5.7. Usporedba biokemijskih karakteristika, prisutnosti gena koji kodiraju čimbenike virulencije, pripadnosti filogrubi i vrsnog podrijetla uzorka | 64 |
| 5.8. Statistička obrada podataka | 69 |
| 6. RASPRAVA | 74 |
| 7. ZAKLJUČCI | 92 |
| 8. POPIS LITERATURE | 94 |
| 9. ŽIVOTOPIS | 118 |

1. UVOD

Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) je prema Gramu negativna, fakultativno anaerobna, štapićasta bakterija koja pripada rodu *Escherichia* i porodici *Enterobacteriaceae*, ubikvitarni je mikroorganizam te učestao komenzal u crijevima brojnih životinjskih vrsta i ljudi. Iako je crijevni komenzal, pojedini serovarovi mogu uzrokovati crijevne i izvancrijevne infekcije. Njihova patogenost povezana je s prisutnošću gena za čimbenike virulencije, pripadnošću filogrupo te, kod pojedinih serovarova, s biokemijskim svojstvima.

Patogene i komenzalne (nepatogene) *E. coli* mogu se razlikovati na više načina. One patogene su, prema kombinaciji gena za čimbenike virulencije i kliničkim simptomima koje uzrokuju, podijeljene na sedam patogrupo/patotipova: enterotoksigena *E. coli* (ETEC), enteropatogena *E. coli* (EPEC), enterohemoragična *E. coli* (EHEC), enteroadherentna *E. coli* (EAEC) ili enteroagregativna (EAggEC), enteroinvazivna *E. coli* (EIEC), difuzno adherentna *E. coli* (DAEC) i ekstraintestinalna patogena *E. coli* (ExPEC). Većina patogenih i nepatogenih *E. coli* svrstana je u četiri glavne filogenetske grupe: A, B1, B2 i D (ISHII i sur., 2007.). Komenzalni sojevi i oni patogeni koji uzrokuju crijevne infekcije većinom pripadaju grupama A i B1, dok izvancrijevni sojevi pretežno pripadaju filogrupo B2, ali i grupi D, no s manjom učestalosti. Istraživanja genoma bakterije omogućila su usavršavanje postojećih metoda za određivanje filogrupo, između ostalog i razvoj nove metode lančane reakcije polimerazom (*engl. polymerase chain reaction – PCR*) kojom se *E. coli* dijeli na osam filogrupo: A, B1, B2, C, D, E, F i I (CLERMONT i sur., 2013.).

Brojna istraživanja su proučavala povezanost između pato-i filogrupo, pa tako i ESCOBAR-PARAMO i sur. (2004.) koji su ustanovili učestalost pojavljivanja EPEC sojeva unutar B1 i B2 grupe, sklonost EHEC sojeva prema A i B1 grupama te ETEC sojeva A, B1 i C grupama. Prisutnost EAEC i DAEC sojeva dokazana je u svim grupama osim grupe E, a ExPEC sojevi pripadali su uglavnom grupi B2, te s manjom učestalošću grupi D.

Hipoteza ovog istraživanja jest postojanje povezanosti između biokemijskih karakteristika, gena za čimbenike virulencije, filogrupo i podrijetla izolata *E. coli*.

Cilj rada je odrediti biokemijska svojstva, prisutnost gena za čimbenike virulencije i pripadnost filogrupo za sojeve podrijetlom od različitih vrsta životinja u svrhu njihove usporedbe i pružanja uvida u prisutnost potencijalno patogenih sojeva u uzorcima iz različitih područja Republike Hrvatske.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Biokemijske karakteristike i izdvajanje izolata *E. coli*

Za razlikovanje bakterijske vrste *E. coli* od ostalih pripadnika porodice *Enterobacteriaceae* koriste se pojedinačni biokemijski testovi ili gotovi biokemijski nizovi s većim brojem biokemijskih svojstava, kao što su primjerice BBL, API 20E, API 32 i VITEK2 (HABRUN, 2014.). Bakterija *E. coli* koristi jednostavne izvore dušika i ugljika za svoje metaboličke i energetske potrebe. Fermentacija glukoze uz proizvodnju kiseline i plina osnovna je karakteristika *E. coli*, a fermentacija ostalih ugljikohidrata ovisi o njihovoj mogućnosti pretvaranja u glukozu ili njezine derivate. *E. coli* pripada grupi mikroorganizama koji proizvode kiseline (poput octene, mravlje, mliječne i jantarne) te etanol, čime spuštaju pH te mijenjaju boju indikatora metilnog crvenila (metil-crveno pozitivna). Negativnom reakcijom na *Voges-Proskauer* (VP) testu ustanovljeno je da *E. coli* ne proizvodi 2,3-butandiol i acetoin. Također, jedna od osnovnih karakteristika *E. coli* je mogućnost fermentacije laktoze, što je omogućeno prisutnošću enzima β -galaktozidaze, a od ostalih biokemijskih osobitosti treba navesti proizvodnju indola te nemogućnost iskorištavanja citrata i ureje. Primjena navedenih pojedinačnih biokemijskih testova razvojem novih tehnologija uglavnom je napuštena, a za dokazivanje bakterijskih vrsta pretežno se upotrebljavaju već spomenuti komercijalno dostupni nizovi biokemijskih testova, zbog jednostavne primjene, specifičnosti i točnosti rezultata (BETTELHEIM, 1994.; QUIN i sur., 1994.).

U Tablici 1. navedene su biokemijske reakcije karakteristične za *E.coli*.

Tablica 1. Biokemijske karakteristike *E. coli* (izvor: QUIN i sur., 1994.)

| Biokemijski test | Reakcija |
|---------------------------|-----------------|
| Proizvodnja indola | + |
| Metilno crvenilo | + |
| Vogel-Proskauer | - |
| Citrat | - |
| Urea | - |
| Fenilalanin deaminaza | - |
| Hidrogen sulfid | - |
| Lizin dekarboksilaza | (+) |
| Ornitin dekarboksilaza | d |
| Likvefakcija želatine | - |
| Porast u KCN bujonu | - |
| OPNG (beta-galaktozidaza) | + |
| Dulcitol | d |
| Inozitol | - |
| Laktoza | + |
| Maltoza | + |
| Manitol | + |
| Manoza | + |
| Ramnoza | (+) |
| Sorbitol | + |
| Saharoza | d |
| Ksilozna | + |
| Crveni pigment | - |

+ = 90 – 100% sojeva pozitivno, (+) = 76 – 89% sojeva pozitivno, d = 26 – 75% sojeva pozitivno, (-) = 11 – 25% sojeva pozitivno, - = 0 – 10% sojeva pozitivno

Kako bi izdvajanje i razlikovanje *E. coli* od drugih bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* bilo jednostavnije, koriste se selektivne kromogene hranjive podloge na kojima se porast pojedinih mikroorganizama može razlikovati na temelju iskorištavanja ugljikohidrata ili drugih spojeva. Među najznačajnijim karakteristikama većine *E. coli* je sposobnost stvaranja β -glukuronidaze, što je i dokazano u približno 97% sojeva (KILIAN i BÜLOW, 1976.; RICE i sur., 1990.). Ova osobina omogućila je razvoj čvrste hranjive podloge Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) za pouzdano, jednostavno i brzo izdvajanje i razlikovanje β -glukuronidaza pozitivne *E. coli* od preostalih 3–4% β -glukuronidaza negativnih pripadnika. Potrebno je naglasiti da pojedine *E. coli*, koje pripadaju patogrupi enterohemoragičnih *E. coli* (EHEC), nemaju sposobnost stvaranja β -glukuronidaze. Također, pojedine *E. coli* patogrupe EHEC proizvode verotoksine (verotoksigene *E. coli* – VTEC). Najznačajniji predstavnik VTEC je serotip O157:H7, koji uz navedeno svojstvo karakterizira nedostatak sposobnosti fermentacije sorbitola, a što je karakteristika približno 75–94% svih ostalih sojeva *E. coli*. Potonja biokemijska karakteristika doprinijela je razvoju selektivnih medija, kao što je Sorbitol-MacConkeyeva hranjiva podloga (SMAC). S obzirom na činjenicu da sojevi *E. coli* serogrupe O157, pored navedenih fenotipskih karakteristika ne fermentiraju ramnozu te su većinom rezistentni na cefixim i telurit, što nije slučaj kod ne-O157 *E. coli*, ove biokemijske karakteristike, odnosno njihove kombinacije iskorištene su za unapređenje specifičnosti selektivnih hranjivih podloga i poboljšanje izdvajanja serogrupe O157, kao primjerice CT-SMAC hranjive podloge dodatkom sorbitola, cefixima i telurita. Potonja hranjiva podloga nije zadovoljavajuća u izdvajanju ostalih VTEC te nije pouzdana u izdvajanju svih O157, jer su pojedini sojevi sorbitol pozitivni, β -glukuronidaza pozitivni ili ne rastu na CT-SMAC hranjivoj podlozi (THOMSON-CARTER, 2001.). Također je moguće izdvajanje sorbitol negativnih kolonija koje ne pripadaju skupini enterohemoragičnih *E. coli* (EHEC), već enteropatogenim *E. coli* (EPEC), enterotoksigenim *E. coli* (ETEC) ili enteroinvazivnim *E. coli* (EIEC) (OJEDA i sur., 1995.).

Za razliku od serogrupe O157, drugi VTEC sojevi vrlo su različiti po genotipu, serotipu i ostalim fenotipskim karakteristikama. Prema biokemijskim svojstvima i porastu na uobičajenim hranjivim podlogama imaju svojstva slična netoksigenim sojevima, a njihova je identifikacija iz izmeta, hrane ili drugih izvora vrlo složena. Primjer biokemijske raznolikosti VTEC sojeva prikazuju SOUZA i sur. (2010.) koji su analizom 38 sojeva s 28 biokemijskih testova sojeve svrstali u 14 biotipova. Time su uputili na veliku raznolikost metaboličkih

osobitosti VTEC sojeva, koji se prema biokemijskim i fenotipskim obilježjima ne razlikuju od nepatogenih *E. coli*.

Atipične biokemijske reakcije prikazali su ARYA i sur. (2008.) istraživanjem VTEC sojeva izdvojenih iz izmeta teladi s proljevom. Ustanovili su sposobnost tvorbe ureaze za 11 izolata (26,82%) i negativnu reakciju pri fermentaciji ramnoze za njih 28 (68,29%). Tijekom razvojnih istraživanja selektivnih kromogenih hranjivih podloga za dokazivanje VTEC serogrupa, ustanovljeno je da su svi od 45 istraženih sojeva β -glukuronidaza pozitivni (VERHAEGEN i sur., 2015.).

Istraživanje LECLERCQ i sur. (2001.) uključivalo je 180 *E. coli* sojeva, od kojih je 55 pripadalo O157:H7, njih 19 O157:H(-) i 106 sojeva ne-O157 koji posjeduju (76) ili ne posjeduju (30) *vtx* gene. Istraženi izolati izdvojeni su iz izmeta ljudi, životinja i uzoraka hrane. Rezultati prikazuju biokemijsku različitost *E. coli* O157:H7 od ostalih istraženih sojeva za pozitivne reakcije ornitin dekarboksilaze i ureaze te negativne reakcije arginin dihidrolaze, 5-ketoglukonata, β -glukuronidaze i sorbitola.

Od ostalih patogrupa važno je navesti osobitosti EIEC sojeva koji se često biokemijski razlikuju od ostalih *E. coli*. Tako je primjerice 70% EIEC sojeva laktoza negativno. Sojevi ove patogrupe su biokemijski, genetski i patogenetski usko vezani uz bakterije roda *Shigella*, te poput njih, osim što ne fermentiraju laktozu, pretežno su lizin dekarboksilaza negativni te nisu pokretni. Od ostalih karakteristika navodi se nemogućnost korištenja natrijevog acetata (53% sojeva) i fermentacije muktata (59% sojeva) (DOYLE i PADHYE, 1989.).

Navedeno potvrđuje istraživanje SILVA i sur. (1980.) provedeno na 97 izolata EIEC, većinom izdvojenih iz izmeta pacijenata s proljevom, koji su bili lizin dekarboksilaza negativni, dok je među 12 izolata, pripadnika serogrupe O124, njih pet (41,67%) bilo nepokretno.

HARNETT i GYLES (1984.) provodili su istraživanja na ETEC sojevima izdvojenim iz goveda i svinja te ne-ETEC sojevima izdvojenim iz svinja s ciljem dokazivanja povezanosti serogrupa i biokemijskih reakcija. Od biokemijskih karakteristika navedena je fermentacija adonitola uglavnom zamijećena u izolata serogrupe O101, unutar koje je od ukupno 19 analiziranih sojeva pozitivnu reakciju imalo deset ETEC sojeva i šest ne-ETEC sojeva.

Nemogućnost razlikovanja ETEC sojeva od ostalih *E. coli* opisali su BRAATEN i MYERS (1977.) biokemijskom analizom 18 ETEC i 15 ne-ETEC sojeva izdvojenih iz izmeta teladi s proljevom. Niti jednom od 64 korištene biokemijske reakcije nije ustanovljena razlika između patogenih i nepatogenih sojeva.

Biokemijska raznolikost ekstraintestinalnih patogenih *E. coli* (ExPEC) opisana je istraživanjem DAVIES (1976.) koji je, analizirajući biotipove *E. coli* izdvojene iz uzoraka pacijenata s mokraćnim infekcijama, pomoću API 20 E sustava, ustanovio da testovi proizvodnje lizin i ornitin dekarboksilaze (69% i 71% sojeva) i fermentacije saharoze (41% sojeva) pomažu u razlikovanju biotipova. Na osnovi dobivenih rezultata, 574 izolata podijeljeno je u biotipove, od kojih je 42% svrstano u njih dva, a preostalih 332 izolata u 53 različita biotipa. Slične rezultate dobili su GARGAN i sur. (1982.) pretraživanjem 514 sojeva izdvojenih iz pacijenata s mokraćnim infekcijama koristeći API 20 E sustav. Analizirani sojevi također su pripadali u dva dominantna biotipa, identična onima zabilježenim prethodnim istraživanjem. Uz navedeno, prikazani su rezultati pojedinačnih biokemijskih reakcija u kojima je većina pretraženih sojeva bila pokretljiva (66%) i pokazivala pozitivnu reakciju na dulcitol (72%) i sorbozu (66%), dok je nešto manje od pola sojeva imalo pozitivnu reakciju na rafinozu (46%) i 5-ketoglukonat (49%).

GODBOUT-DeLASALLE i HIGGINS (1986.) istraživali su biotipove *E. coli* pretražujući 506 izolata iz uzoraka mlijeka, mokraće, izmeta i tkiva različitih vrsta životinja. Rezultati istraživanja prikazuju 54 različita biokemijska profila od kojih 65% pripada u tri dominantna biotipa prisutna u svim životinjskim vrstama. Usporedbom ostvarenih rezultata s istraživanjem DAVIES (1976.), ustanovili su dva od tri biotipa već prijavljena kao dominantna.

Biokemijska karakterizacija bakterijskih vrsta uključuje reakcije izolata na raznolik niz biokemijskih testova, od fermentacije šećera do određivanja aktivnosti enzima. Premda bakterijska vrsta *E. coli* posjeduje karakteristična biokemijska svojstva, izolati su učestalo biokemijski varijabilni. Prema navedenim istraživanjima, primjetno je da biokemijska karakterizacija nije dovoljna za određivanje patogenosti soja.

2.2.Vrste patogenih *E. coli*

Bakterija *E. coli* prisutna je u crijevima kao komenzalna bakterija, ali pojedini sojevi mogu uzrokovati infekcije u ljudi i životinja. Od onih koje mogu prouzročiti infekcije navode se crijevne ili intestinalne patogene i izvancrijevne ili ekstraintestinalne patogene *E. coli* (ExPEC). Crijevne patogene *E. coli* su s obzirom na kombinaciju gena za čimbenike virulencije i kliničkih simptoma podijeljene na sedam patogrupa/patotipova: enterotoksigena *E. coli* (ETEC), enteropatogena *E. coli* (EPEC), enterohemoragična *E. coli* (EHEC), enteroadherentna *E. coli* (EAEC) ili enteroagregativna (EAggEC), enteroinvazivna *E. coli* (EIEC) i difuzno adherentna *E. coli* (DAEC).

Zbog velike mogućnosti izmjene genetskog materijala, podjela *E. coli* u patogrupe je otežana i složena, što su potvrdili CLEMENTS i sur. (2012.) navodeći dvije novoustanovljene patogrupe. Prva je adherentno invazivna *E. coli* (AIEC) koja ne uzrokuje alimentarne intoksikacije, ali se smatra da je povezana s Chronovom bolesti, iako nije razjašnjena prisutnost AIEC kao simptoma ili uzroka bolesti, a druga je patogrupa Shiga toksin producirajuće enteroagregativne *E. coli* (STEAEC) odgovorne za epidemiju 2011. godine u Njemačkoj.

Infekcije i intoksikacije ljudi patogenim intestinalnim *E. coli* nastaju konzumacijom kontaminirane hrane, vode ili izravnim kontaktom s ljudima i životinjama. U zemljama u razvoju ETEC, EPEC i EAEC glavni su uzrok proljeva s mogućim fatalnim posljedicama u djece, prvenstveno zbog loših higijenskih uvjeta, nemogućnosti laboratorijske dijagnostike i adekvatnog liječenja (QUADRI i sur., 2005a.; QUADRI i sur., 2005b; GONZALES i sur., 2013.). Istraživanje GONZALES i sur. (2013.) navodi prevalenciju *E. coli* koje uzrokuju proljev kod djece u Boliviji. U njihovu istraživanju izdvojeni su izolati iz uzoraka izmeta djece s proljevom ili bez njega. Prema rezultatima, najviše izolata pripadalo je patogrupama EAEC (11,2% izdvojeno iz izmeta djece s proljevom i 7,4% izdvojeno iz izmeta djece bez proljeva), EPEC (5,8% izdvojeno iz izmeta djece s proljevom i 4,0% izdvojeno iz izmeta djece bez proljeva) i ETEC (6,6% izdvojeno iz izmeta djece s proljevom i 4,8% izdvojeno iz izmeta djece bez proljeva). U razvijenim zemljama infekcije navedenim patogrupama su blage, dok su EHEC, te sve češće EAEC i STEAEC, glavne patogrupe povezane s alimentarnim infekcijama i intoksikacijama.

SHAH i sur. (2009.) prikazuju podatke istraživanja prema kojima su ETEC najčešće dokazani uzročnici „putničkog proljeva“ u Južnoj Americi (33,6%), Africi (31,2%), južnoj

(30,6%) i jugoistočnoj Aziji (7,2%). EAEC su sljedeći najčešći uzročnici proljeva u Južnoj Americi (24,1%), Africi (1,8%) i južnoj Aziji (16%). Od ostalih uzročnika „putničkog proljeva“ autori navode EPEC u Južnoj Americi (14,3%), Africi (7,7%) i jugoistočnoj Aziji (18%), te DAEC u Južnoj Americi (6,2%) i južnoj Aziji (2,91%).

Pregled patogrupa i njihovih osobitosti prikazan je u Tablici 2.

Tablica 2. Kliničke, patološke i epidemiološke karakteristike patogrupa *E. coli*

| Patogrupa | Klinička slika | Patologija | Podložnost | Ahezini/invazija | Toksini |
|-----------|--|--|---|--|---|
| EPEC | Akutni/kronični proljev, povraćanje, blaga temperatura | Prianjajuće i brišuće lezije na tankom crijevu | Mlađa djeca u zemljama u razvoju, putnici | <i>bfp</i> , intimin, <i>Paa</i> , <i>LPF</i> , <i>Iha</i> , <i>EhaA</i> | -- |
| ETEC | Vodenasti proljev, dehidracija | Prianjanje na mukozu tankog crijeva pomoću faktora kolonizacije, lučenje toksina | Djeca u zemljama u razvoju, putnici | Kolonizacijski faktori, <i>Paa</i> | <i>lt</i> , <i>st</i> , <i>ClyA</i> |
| EIEC | Bacilarna dizenterija | Upala i narušavanje stabilnosti mukozne membrane; uglavnom debelo crijevo | Ljudi svih dobi, češće djeca u zemljama u razvoju | <i>Ipa</i> | <i>Shigella</i> enterotoxin 1 i 2 (<i>ShET1</i> i <i>ShET2</i>), <i>stx</i> |
| EHEC | Krvavi proljev, hemolitičko-uremički sindrom | Hemolitičko-uremički sindrom, hemoragični kolitis, prianjajuće i brišuće lezije na debelom crijevu | Djeca i starije osobe u razvijenim zemljama | Intimin, <i>Paa</i> , <i>ToxB</i> , (<i>Efa</i>)-1, <i>LPF</i> , <i>saa</i> , <i>EibG</i> , <i>EhaA</i> , <i>OmpA</i> , <i>Iha</i> | <i>vtx</i> (<i>stx</i>) |
| EAEC | Vodenasti proljev, blaga temperatura, iscrpljenost | Formiranje biofilma, hemoragična nekroza mikrovila | Djeca u zemljama u razvoju, putnici | <i>AAF</i> , <i>Tia</i> | <i>EAST1</i> , <i>ShET1</i> , <i>HlyE</i> |
| DEAEC | Akutni proljev | | | <i>Afa/Dr</i> adhezini | -- |
| ExPEC | Mokraćne infekcije, neonatalni meningitis, sepsa, pneumonija | Izvancrijevne infekcije | | <i>papA</i> , <i>sfa</i> , <i>foc</i> , <i>afa</i> , <i>fimA</i> , <i>fimH</i> , <i>iroN</i> , <i>Iha</i> , <i>kpsMT</i> , <i>ompT</i> | <i>hlyD</i> , <i>cnf1</i> , <i>cnf2</i> , <i>cdt</i> |

**bfp* – fimbrije koje oblikuju snopove (engl. *bundle forming pili*); *Paa* – svinjski protein prianjanja i brisanja; *LPF* – dugačke polarne fimbrije; *Iha* – IrgA homologni adhezini; *lt* – termolabilni enterotoksin; *st* – termostabilni enterotoksin; *ClyA* – Citolizin A; *Ipa* – Invazijski plazimidski antigen; *stx* – shiga toksin, *ToxB* – Toksin B; (*Efa*)-1 – *E. coli* faktor za adherenciju; *saa* – STEC autoaglutinirajući adhezini; *EibG* – *E. coli* imunoglobulin vežući protein; *EhaA* – autotransportni protein; *OmpA* – protein vanjske membrane A; *vtx* – verotoksini; *AAF* – agregativne adherentne fimbrije; *Tia* – toksigeni invazijski lokusi A; *east1* – EAEC termostabilni enterotoksin 1; *ShET1* – *Shigella* enterotoksin 1; *HlyE* – helolizin E; *Afa/Dr* – fimbrijski/nefimbrijski adhezini; *papA* – P fimbrije; *sta* – S fimbrije; *foc* – F1C fimbrije; *fimA/fimH* – tip 1 fimbrije; *iroN* – receptor za siderofore; *kpsMT* – kapsule II grupe; *ompT* – proteaza vanjske membrane; *hlyD* – citolitički proteinski toksin; *cnf1* i *cnf2* – citotoksični nektotizirajući faktor 1 i 2; *cdt* – citoletalni toksin (engl. *cytolethal distending toxin*)

2.2.1. Enterotoksigena *E. coli* (ETEC)

Sojevi ETEC najčešći su uzročnici proljeva u djece iz nerazvijenih zemalja, a također su poznati kao uzročnici „putničkog proljeva“ u turista koji posjećuju takve zemlje. Proljev uzrokovan enterotoksigenim sojevima je vodenast i uzrokuje tešku dehidraciju ako se ne uspostavi ravnoteža između iona i gubitka vode u crijevu. Infekcija je rezultat konzumacije kontaminirane hrane i vode. Površinske vode glavni su izvor infekcije u nerazvijenim zemljama, a ljudi dolaze u kontakt s mikroorganizmom prilikom kupanja i/ili korištenja vode za piće te pripremu hrane (BEGUM i sur., 2005.).

Osim navedenog, sojevi ETEC patogrupe najčešći su uzročnici kolibaciloze u mladim životinja, prvenstveno prasadi i teladi (NAGY i FEKETE, 2005.). Enterotoksigena kolibaciloza uzrokuje značajne gubitke u dvije starosne grupe prasadi: sisajuće i odbijene. Osim u teladi i prasadi, ETEC je dokazan kao uzročnik proljeva u janjadi, ždrebadi i pilića (NAGY i FEKETE, 1999.).

Dokumentirani su brojni slučajevi infekcija/intoksikacija i izdvajanja ETEC sojeva iz hrane životinjskog podrijetla u zemljama diljem svijeta. Kao primjer navodi se istraživanje SACK i sur. (1977.) koji su od 240 sojeva izdvojenih iz uzoraka hrane životinjskog podrijetla u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), u njih 8% potvrdili prisustvo ETEC, iako niti jedan proizvod nije povezan s izbijanjem epidemije. Istraživanje REIS i sur. (1980.) navodi da je pretragom hamburgera i kobasica u Brazilu kao ETEC potvrđeno 1,5% od 1200 pretraženih izolata. Primjer intoksikacije većeg broja ljudi opisan je slučajem zabilježenim u švedskom restoranu gdje je 60 osoba od njih 106, koje su konzumirale salatu od škampa i gljiva, primljeno u bolnicu s abdominalnim bolovima i proljevom, a daljnjim istraživanjem izvora potvrđeno je prisustvo termolabilnih enterotoksina *E. coli* u hrani (DANIELSSON i sur., 1979.).

Sojevi ETEC fermentiraju laktozu, pripadaju brojnim somatskim (O) serogrupama, proizvode enterotoksine i posjeduju brojne kolonizacijske faktore koji im omogućuju kolonizaciju tankog crijeva (QUADRI i sur., 2005b.). Specifični virulentni faktori kao što su enterotoksini i brojni kolonizacijski faktori, razlikuju sojeve ETEC od ostalih patogenih *E. coli* koje uzrokuju proljev.

Infekcija bakterijama patogrupe ETEC započinje kolonizacijom tankog crijeva te njihovim vezanjem za enterocite. ETEC ne prodiru i ne oštećuju stanicu već izlučuju toksine uzrokujući neupalni vodeni proljev. Sojevi ETEC proizvode dvije vrste enterotoksina:

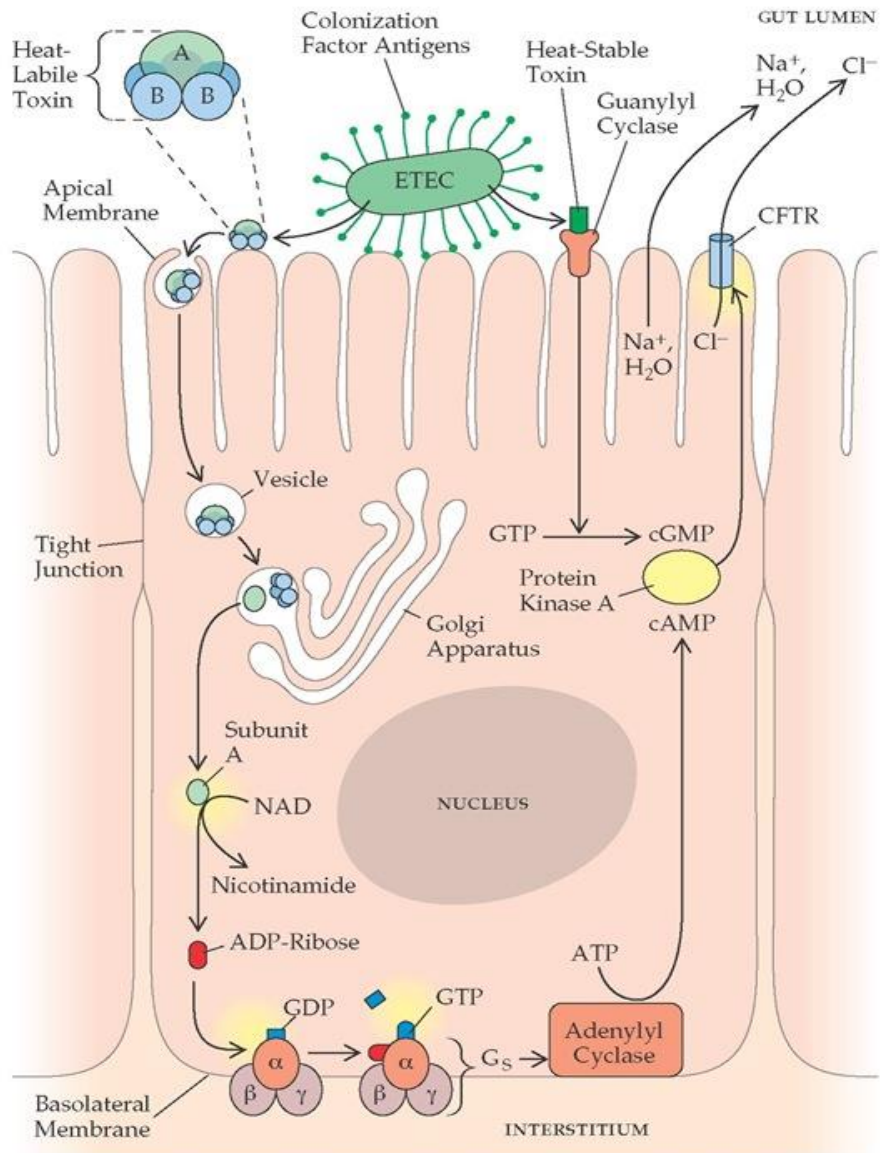
termolabilni (LT) i termostabilni (ST). Oba toksina ulaze u stanicu preko vanjske membrane. LT je fiziološki, strukturalno i antigeno sličan toksinu uzročnika kolere (GILL i RICHARDSON, 1980.), a ST se dijeli na dva glavna genotipa: STa (ST-I) i STb (ST-II). Sojevi ljudskog podrijetla proizvode STa, dok je STb pretežno životinjskog podrijetla. Također postoje dva podtipa STa toksina, a to su termostabilni toksin ljudskog podrijetla STh (STIb) i termostabilni toksin svinjskog podrijetla STp (STIa). Potonje oznake u uporabi su zbog prijašnjih istraživanja prema kojima se smatralo da je STh ljudskog podrijetla („h“ od engl. *human*), a STp svinjskog podrijetla („p“ od engl. *porcine*), no ustanovljena je prisutnost obaju gena koji kodiraju toksine u ETEC izolata izdvojenih iz izmeta ljudi (MOSELY i sur., 1983.; BÖLIN i sur., 2006.)

Termolabilni i termostabilni toksini stimuliraju aktivnost adenil-ciklaze, odnosno guanil-ciklaze, što dovodi do konstantnog stvaranja cikličkog adenozin-monofosfata (cAMP) i cikličkog gvanozin-monofosfata (cGMP), a time i do niza reakcija čiji je konačni rezultat smanjena resorpcija iona Na⁺ i Cl⁻, te gubitak iona i vode u crijevu (PAVANKUMAR i SANKARAN, 2008.). Vidi Sliku 1.

Pričvršćivanje ETEC na stijenku crijeva posredovano je antigenim kolonizacijskim faktorima – fimbrijskim strukturama prisutnim na površini bakterije koje imaju sklonost prema receptorima na površini epitelnih stanica. Prvi identificirani je kolonizacijski antigeni faktor CFAI, koji se najčešće povezuje s ETEC infekcijama (JANSSON i sur., 2006.).

Važno je napomenuti da se kolonizacijski faktori i toksini nalaze na plazmidu zbog čega je velika mogućnost horizontalnog prijenosa gena na druge mikroorganizme (PAVANKUMAR i SANKARAN, 2008.).

Za karakterizaciju ETEC, uz dokazivanje toksina i kolonizacijskih faktora, koristi se također serotipizacija (ORSKOV i sur., 1976.). Iako je opisana velika raznolikost somatskih (O) antigena unutar patogrupe ETEC, istraživanjem opširne baze temeljene na podacima iz različitih zemalja, WOLF (1997.) je zaključio kako najveći broj sojeva pripada sljedećim O grupama: O6, O78, O8, O128 i O153.



Slika 1: Patogeneza infekcije sojevima ETEC (izvor: Anon.1)

2.2.2. Enteropatogena *E. coli* (EPEC)

Enteropatogena *E. coli* primarno uzrokuje proljev u novorođenčadi i djece mlađe od dvije godine u nerazvijenim zemljama, kojima najčešće uzrokuje akutni vodenasti proljev, iako su prijavljeni brojni slučajevi kroničnog proljeva. Osim obilnog vodenog proljeva, često su prisutni simptomi poput povraćanja i blago povišene temperature (NATARO i KAPER, 1998.).

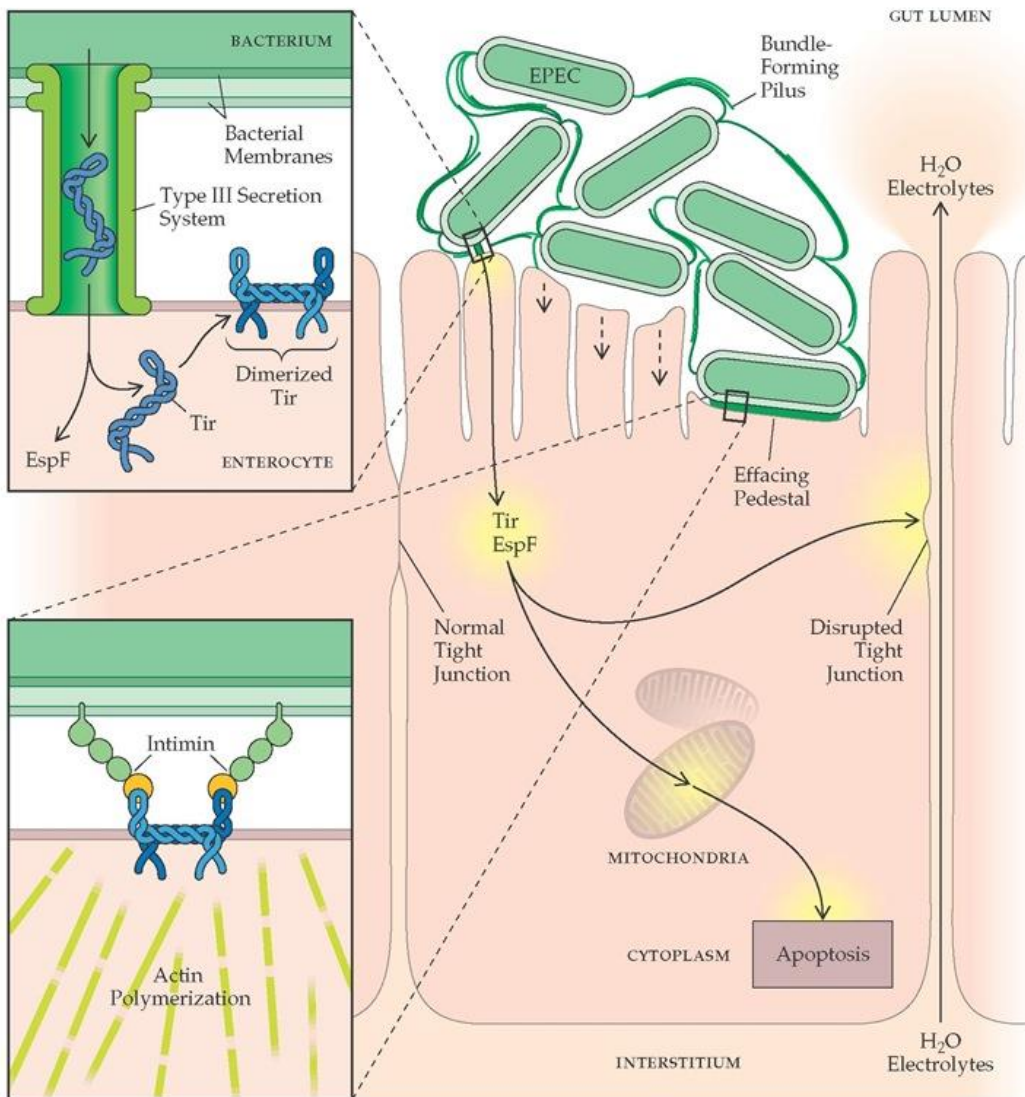
Patogeneza infekcije EPEC u ljudi može se podijeliti u tri faze. Prva faza uključuje adherenciju i kolonizaciju crijeva, nakon koje slijedi prenošenje efektnih proteina u eukariotsku stanicu putem sekrecijskog sustava tipa III (T3SS) te blisko prianjanje bakterijskog mikroorganizma na eukariotsku stanicu posredstvom specifičnog proteina intimina, kodiranog *eae* genom. Sekrecijski sustav tip III složena je bakterijska struktura koja omogućuje Gram-negativnim bakterijama prenošenje efektnih proteina, čimbenika virulencije koji utječu na promjene u stanici domaćina, izravno u citoplazmu domaćina. Kako bi se pričvrstili za enterocite, EPEC koriste T3SS kojim u stanicu domaćina prenose translokacijski receptor za intimin (engl. *Translocated intimin receptor – Tir*). Nakon ulaska u stanicu, *Tir* se veže za intimin, protein bakterijske vanjske membrane (COBURN i sur., 2007.). Navedeno uzrokuje formiranje karakterističnih „prianjajućih i brišućih“ lezija koje uključuju prisno prianjanje bakterijskog mikroorganizma na crijevnu mukozu uz formiranje karakterističnih morfoloških promjena koje nalikuju čašama (engl. „*cupping*“) i pijedestalu formaciju, čija je krajnja posljedica gubitak mikrovila (TENNANT i sur., 2009.), prikazano na Slici 2. Nastajanje karakterističnih prianjajućih i brišućih lezija kodirano je genima na patogenom otočiću kromosoma zvanom „lokusom brisanja enterocita“ (engl. *locus of enterocyte effacement – LEE*) koji kodira protein vanjske membrane intimin, efektorne proteine, translokacijski intimin receptor (*Tir*) te sekrecijski sustav tip III (T3SS).

Sojevi EPEC patogrupe mogu se podijeliti na tipične (tEPEC) i atipične (aEPEC). Tipični EPEC sojevi posjeduju EAF plazmid (EPEC adherentni faktor) koji kodira lokaliziranu adherenciju na epitelnim stanicama posredstvom *bfp* (engl. *bundle forming pilus*) gena, dok atipični ne posjeduju taj plazmid, zbog čega se sojeve *E. coli* koji su *eae+bfp+* klasificira kao tipične, a one koji su *eae+bfp-* kao atipične (OCHOA i CONTRERAS, 2011.). Istraživanje TRABULSI i sur. (2002.) prikazuje razlike između tipične i atipične EPEC. Pripadnici tipične EPEC među vodećim su uzročnicima proljeva djece u zemljama u razvoju te među rjeđima u industrijski razvijenim zemljama, u kojima su atipične EPEC od

značajnijih uzročnika proljeva. Također, jedini rezervoar tipične EPEC su ljudi, dok rezervoar atipične mogu biti i ljudi i životinje. Osim navedenog, razlikuju se u genetskim karakteristikama, serotipovima, virulentnim karakteristikama i činjenici da je atipična EPEC blisko vezana uz Shiga toksin producirajuću *E. coli* (STEC).

Analizom većeg broja EPEC sojeva, tipičnih i atipičnih, *World Health Organisation* (WHO) 1987. prihvaća 12 serogrupa: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 i O158, dok daljnja istraživanja provedena na atipičnim i tipičnim EPEC sojevima izdvojenim u Ujedinjenom Kraljevstvu, Brazilu i Italiji, prikazuju podatke o često izdvojenim serotipovima tipičnog EPEC među kojima prevladavaju: O55:H6, O86:H34, O111:[H2], O114:H2, O119:[H6], O127:H6, O142:H6, O142:H34, te atipičnog EPEC među kojima prevladavaju: O26:H[11], O55:[H7], O55:H34, O86:H8, O111ac:[H8], O111:H9, O111:H25, O119:H2, O125ac:H6, O128:H2.

MOURA i sur. (2009.) proučavali su vezu između tipičnih i atipičnih EPEC sojeva životinjskog i ljudskog podrijetla. Istraživanje su proveli na 42 atipična i sedam tipičnih EPEC sojeva izdvojenih iz ljudi i životinja (kućni ljubimci – mačke i psi, farmske životinje – goveda, ovce, kunići i divlje životinje – majmuni) pretraživanjem karakterističnih gena za čimbenike virulencije te klonalne sličnosti koristeći gel elektroforezu u pulsirajućem polju (engl. *pulsed-field gel electrophoresis* – PFGE) i tipizaciju sojeva sekvenciranjem više lokusa (engl. *multilocus sequence typing* – MLST). Analize gena za čimbenike virulencije atipičnih EPEC sojeva izdvojenih iz životinjskih uzoraka pokazale su da mogu uzrokovati proljev u ljudi, a rezultati PFGE-a i MLST-a su ukazali na klonalnu povezanost između ljudskih i životinjskih izolata. Prema ostvarenim rezultatima, MOURA i sur. (2009.) zaključili su da životinje kao rezervoar atipičnih EPEC mogu imati ulogu izvora infekcije za čovjeka, te ljudi, koji su također rezervoar atipičnog EPEC, mogu predstavljati izvor infekcije za životinje, stoga mogućnost nastajanja ciklusa međusobnih infekcija ljudi i životinja ne smije biti zanemarena.



Slika 2: Patogeneza infekcije sojevima EPEC (izvor: Anon. 1)

2.2.3. Enterohemoragična *E. coli* (EHEC)

EHEC je patogrupa *E. coli* koje uzrokuju pojavu proljeva ili krvavog proljeva (hemoragični kolitis) u ljudi. Osim navedenog, mogu uzrokovati hemolitičko-uremički sindrom (HUS) čiji je krajnji rezultat zatajenje bubrega (Anon. 2, 2016.). Goveda su prirodni rezervoar EHEC te je približno 75% izbijanja bolesti povezano s konzumacijom govedih proizvoda (NGUYEN i SPERANDIO, 2012.). Osim u goveda, ustanovljena je također u drugih preživača (koze i ovce), ali i drugih životinjskih vrsta koje mogu biti izvori infekcije, poput svinja, kućnih ljubimaca, peradi te životinja u zoološkim vrtovima (GYLES, 2007.). Infekcije najčešće nastaju konzumacijom sirovog ili nedovoljno toplinski obrađenog mesa i mlijeka, konzumacijom kontaminiranog voća, povrća, vode za piće, nepasteriziranog soka od jabuke i ostale neprerađene hrane.

Najvažniji čimbenik virulencije EHEC su shiga toksini (*stx*), uobičajenog naziva verotoksini (*vtx*), koji su kodirani bakteriofagom. EHEC koje posjeduju *stx/vtx* uobičajno se nazivaju Shiga toksin producirajuće *E. coli* (STEC) ili verotoksigene *E. coli* (VTEC). Verotoksini se sastoje od podjedinica A i B – dok podjedinica A inhibira sintezu proteina domaćina i potiče apoptozu, podjedinica B važna je zbog specifičnog vezanja za glikolipid globotriaosylceramid-3 (Gb3). U čovjeka, EHEC kolonizira debelo crijevo i otpušta verotoksine koji se vežu za endotelne stanice s Gb3 receptorima, čime toksini ulaze u krvotok i šire se organizmom. Tkiva i stanice u kojima je ustanovljen Gb3 razlikuju se među domaćinima. Ljudi, primjerice, imaju visoku razinu Gb3 u bubrežnom glomerularnom endotelu, koje je i osnovno mjesto stvaranja lezija povezanih s HUS-om (akutno zatajenje bubrega, trombocitopenija i hemolitična anemija). Goveda su glavni rezervoar EHEC, ali za razliku od ljudi, kolonizacija u odraslih goveda je asimptomatska, jer goveda nemaju izražen Gb3 na krvožilnom endotelu. Iako su Gb3 receptori ustanovljeni na endotelu krvnih žila bubrega i mozga goveda, verotoksini se ne mogu vezati za krvne žile u želučano-crijevnom traktu goveda (NGUYEN i SPERANDIO, 2012.). Patogeneza infekcije VTEC prikazana je na Slici 3.

Nadalje, verotoksini su podijeljeni u dvije grupe: *vtx1* i *vtx2*, a grupe u podtipove: *vtx1* (*vtxa*, *vtx1c* i *vtx1d*) i *vtx2* (*vtx2b*, *vtx2c*, *vtx2d*, *vtx2e*, *vtx2f* i *vtx2g*). Važno je napomenuti da sposobnost verotoksigenih *E. coli* za uzrokovanje bolesti u ljudi ovisi o podtipu verotoksina. Sojevi kojima je dokazano prisustvo *vtx2c* podtipa najčešće su izdvojeni iz pacijenata oboljelih od HUS-a, dok su sojevi kojima je dokazan podtip *vtx2d* ili *vtx2e* najčešće izdvojeni iz pacijenata s nekomplikiranim proljevom i u asimptomatskih nosioca

(ISHII i sur., 2007.). Prema navedenim spoznajama, istraživači su zaključili kako je subtipizacija gena za verotoksine koristan instrument za identifikaciju virulentnih sojeva i predviđanje potencijalnog rizika za zdravlje ljudi.

EPEC i EHEC su usko povezani i dijele mnoge osobitosti, između ostalog način kolonizacije crijeva putem prijanjajućih i brišućih lezija, koje nastaju kao posljedica djelovanja intimina kodiranog *eae* genom (HARTLAND i LEONG, 2013.). Osim intimina, BARDIAU i sur. (2010.) navode brojne druge faktore adherencije povezane s VTEC, primjerice F18 fimbrijske adhezine, kojima se bakterija pričvršćuje na F18 receptore enterocita u prasadi čime započinje kolonizacija, odnosno VTEC/EPEC infekcija. RIPPINGER i sur. (1995.) opisuju dva tipa F18 adhezina (F18ab i F18ac) povezanih s VTEC i EPEC sojevima izdvojenim iz odbijene prasadi s kolibacilozom i prasadi s edemskom bolesti. Prema istraživanju CHENG i sur. (2005.), F18ab je uglavnom povezan s VTEC sojevima, dok je F18ac uglavnom povezan s EPEC sojevima. Nadalje, PATON i sur. (2001.) opisuju izdvajanje *saa* gena (STEC autoaglutinirajući adhezina) dokazanog u *eae*-negativnom O113:H21 soju povezanom s izbijanjem epidemije HUS-a u Australiji. Od ostalih adhezina BARDIAU i sur. (2010.) opisuju *Efa1* koji posreduje bakterijskom prijanjanju na crijevnu stijenku te *ToxB* koji doprinosi adherenciji bakterije na crijevni epitel stimulacijom proizvodnje *EspA* i *EspB* (dva translokacijska proteina) i intiminskog receptora (*Tir*). Oba gena prisutna su u EHEC i EPEC sojevima te mogu biti važni za njihovu adherenciju. Gen za adherenciju koji se također povezuje s EHEC i EPEC je *paa* (svinjski protein prijanjanja i brisanja), dokazan u EHEC O157:H7 i O26 te EPEC sojevima izdvojenim u pasa, kunića i svinja.

VTEC može biti prisutan u crijevima brojnih životinjskih vrsta, ali glavni rezervoar i izvor sojeva virulentnih za ljude su preživači, osobito sojeva O157 serogrupe. Pojedini sojevi, koji ne pripadaju O157, dokazani su kao uzročnici proljeva u teladi. Sojevi patogeni za telad posjeduju LEE, proizvode *vtx1* i pripadaju serogrupama: O26, O111, O118, O5. U Njemačkoj, soj pripadnik EHEC O118 učestalo je izdvojen iz teladi s proljevom. Osim što uzrokuje oboljenja u teladi, također je dokazan njegov zoonotski potencijal. Uz potonje, istraživanja provedena u Brazilu također navode sve učestalije izdvajanje sojeva VTEC u teladi s proljevom nego u onoj zdravoj (CAPRIOLI i sur., 2005.).

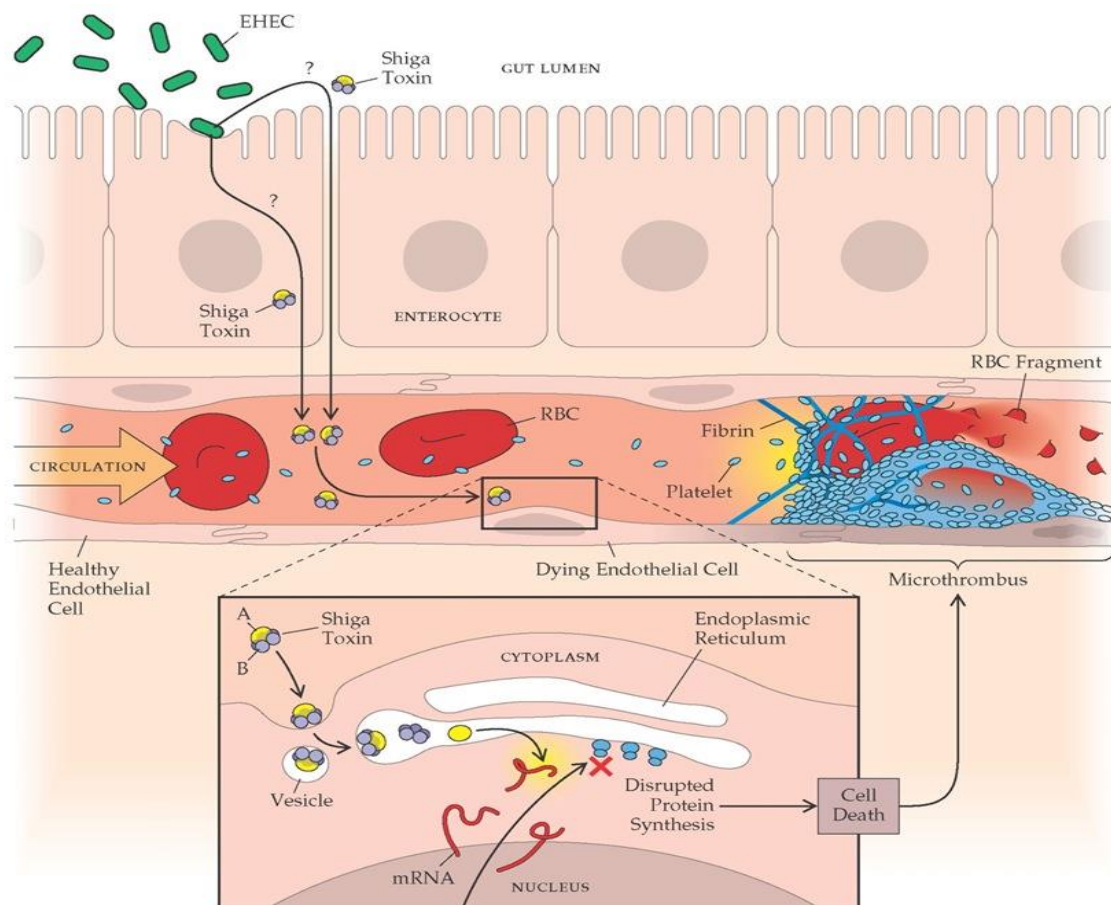
U malih preživača opisan je slučaj izbijanja epidemije meningoencefalitisa i septikemije kod jednomjesečne jaradi uzrokovan EHEC/VTEC O157:H7. U uzrokovanju bolesti kod kunića i

presadi, EHEC O157:H7 navodi se kao nevažan, uz iznimku soja EHEC O153:H- povezanog s izbijanjem krvavog proljeva i bolesti sličnoj HUS-u u domaćih kunića (Anon. 2, 2016.).

Sojevi VTEC mogu uzrokovati proljev u prasadi nakon odbića i edemsku bolest. Iz svinja s edemskom bolesti najčešće su izdvojeni sojevi antigenih formula O141:K85, O138:K84 i O139:K82 koji se normalno nalaze u debelom crijevu, ali se u uvjetima stresa naglo razmnože i prošire u tanko crijevo uz proizvodnju *vtx2e* toksina (NAGLIĆ i sur., 2005.).

Smatra se da svinje nisu važan izvor EHEC O157 kao ni drugih VTEC sojeva povezanih s infekcijama u ljudi. Europske zemlje, SAD i Japan prijavljuju učestalost pojave sojeva EHEC O157 u izmetu svinja s rasponom od 0,2% do 2% (CAPRIOLI i sur., 2005.).

Iako se serogrupa O157 najčešće povezuje s VTEC infekcijama u ljudi, epidemiološka istraživanja navode kako je njih 20–50% uzrokovano sojevima koji pripadaju drugim serogrupama (SCALLAN i sur., 2011.). Istraživanje SON i sur. (2014.) ukazuje na deset klinički najznačajnijih serogrupa povezanih s VTEC infekcijama: O26, O103, O111, O145, O157, O91, O113, O128, O45, O104:H4 i O121.



Slika 3: Patogeneza infekcije sojevima EHEC (VTEC) (izvor: Anon. 1)

2.2.4. Enteroinvazivna *E. coli* (EIEC)

Enteroinvazivne *E. coli* su biokemijski, genetski i patogeno slične bakterijama iz roda *Shigella*. Klinički su simptomi oboljenja slični jer je ciljano mjesto infekcije debelo crijevo na kojem uzrokuju upalu i ulceraciju mukoze te pacijenti često razviju simptome bacilarne dizenterije, zbog čega se proljev uzrokovan EIEC klinički ne razlikuje od one uzrokovane bakterijama roda *Shigella* (PRATS i LLOVET, 1995.). Rezervoar EIEC bakterija su inficirani ljudi zbog čega bilo koja hrana ili voda kontaminirana izmetom može postati direktan izvor infekcije (Anon. 3, 2012.).

Osim bacilarne dizenterije u ljudi, također uzrokuju keratokonjuktivitis u pokusnih zamorčica (SILVA i sur., 1980.).

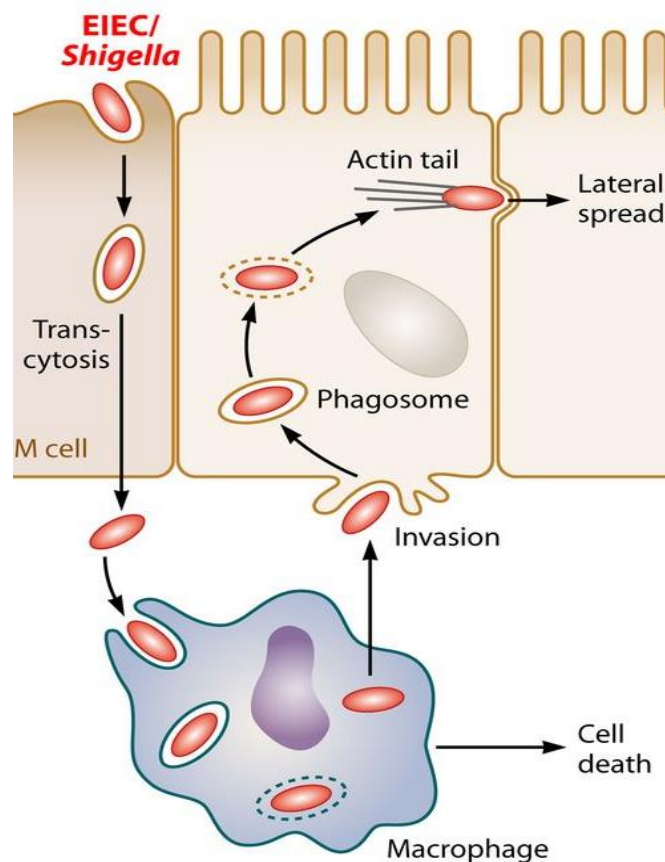
Infekcija EIEC je složen proces u kojem sudjeluju čimbenici virulencije kodirani kromosomom i plazmidom. Kolonizacija i preživljavanje bakterija u želučano-crijevnom sustavu ovisna je o prisutnosti velikog plazmida (*pInv*). Bakterije kojima nije ustanovljen navedeni plazmid ne uzrokuju keratokonjuktivitis u zamorčica te se smatraju avirulentnim. Većina funkcija za preživljavanje i kolonizaciju povezane su s proteinima kodiranim na fragmentu *pInv* plazmida. Fragment sadrži gene odgovorne za invaziju, izlazak te širenje bakterije na okolne stanice, inhibiciju autofagije, regulaciju imunogenog odgovora domaćina i kodiranje sekrecijskog sustava tipa III (T3SS) (GOMES i sur., 2016.).

U ljudi, EIEC i bakterije roda *Shigella* prodiru kroz epitelne stanice, razmnožavaju se unutar njih i kreću kroz citoplazmu šireći se na okolne stanice (Slika 4.). Sojevi EIEC ulaze u stanicu domaćina putem M stanica (limfatično tkivo) prisutnih u crijevnoj mukozni. Dolaskom u laminu, bakterijski mikroorganizam je fagoliziran makrofagom i dendritičkim stanicama (GOMES i sur., 2016.). Nakon izlaska iz makrofaga bakterije pomoću T3SS prenose efektivne proteine u epitelne stanice uzrokujući razmjestaj citoskeleta u domaćina i mikropinocitozu čime olakšavaju invaziju. U sljedećoj fazi bakterija potiče stvaranje aktinskih repova koje koristi za kretanje unutar stanice (PAVANKUMAR i SANKARAN, 2008.), a stečena pokretljivost pomaže bakterijskom mikroorganizmu širenje u okolne stanice (CROXEN i sur., 2013.).

Čimbenici virulencije koji također sudjeluju u infekciji EIEC/*Shigella* su *Shigella* enterotoksin 1 i 2 (ShET1 i ShET2), odgovorni za pojavu vodenog proljeva. Od ostalih su opisani *Pic* i *SepA*, odgovorni za crijevnu sekreciju u modelu mišjeg tkiva te *stx* koji je prisutan samo u *Shigella dysenteriae* 1 i gotovo identičan *stx1* kojeg stvaraju STEC sojevi (CROXEN i sur., 2013.).

EIEC se najčešće povezuje sa somatskim grupama O28ac, O29, O112ac, O124, O135, O136, O143, O144, O152, O159, O164 i O167, a u posljednje vrijeme i s O121 i O173 (BEUTIN i sur., 1997.). Istraživanje FAUNDEZ i sur. (1988.) na izolatima EIEC izdvojenim iz izmeta djece s proljevom i bez njega utvrđuje pripadnost serogrupama O28ac, O124, O143 i O144. Također treba napomenuti da većina EIEC sojeva izražava somatske antigene koji su povezani ili identični kao oni u bakterija roda *Shigella*.

Prijavljeni su brojni slučajevi izbijanja bolesti povezanih s EIEC, a poneki se povezuju s hranom – tako YAMAMURA i sur. (1992.) opisuju slučaj alimentarne intoksikacije uzrokovane „godofuom“ (vrstom tofua). Nakon konzumacije navedene namirnice, 670 (73%) od ukupno 918 osoba prijavilo je simptome poput proljeva, vrućice, bolova u trbuhu i povraćanja. Daljnjim analizama izdvojen je soj enteroinvazivne *E. coli* O164:H- iz 22 od ukupno 32 pretražena uzorka izmeta prikupljena od oboljelih osoba, u pet od ukupno deset uzoraka prikupljenih od radnika koji su radili tofu te jedan izolat izdvojen iz uzorka hrane (preostali tofu).



Slika. 4: Patogeneza infekcije sojevima EIEC (izvor: CROXEN i sur., 2013.)

2.2.5. Enteroagregativna ili Enteroadherentna *E. coli* (EAEC)

Enteroagregativna *E. coli* se u ranijim istraživanjima smatrala oportunističkim patogenom povezanim s proljevom u imunokompromitiranih ljudi (primjerice onih oboljelih od HIV-a) i neuhranjene djece u zemljama u razvoju. Simptomi koji se povezuju s EAEC su vodenasti proljev, slaba vrućica i iscrpljenost. Novija istraživanja povezuju EAEC s „putničkim proljevom“, proljevom u industrijski razvijenim zemljama te izbijanjima bolesti uzrokovanih hranom u Europi i Aziji, poput slučaja izbijanja epidemije hemolitičko-uremičkog sindroma (HUS) i hemoragičnog kolitisa u Njemačkoj 2011. godine, gdje je soj EAEC O104:H4 uzrokovao smrt 54-ero ljudi i 855 slučajeva HUS-a. Ovaj soj je, osim agregativnih fimbrija koje ga povezuju s EAEC, posjedovao i verotoksin (JENSEN i sur., 2014.).

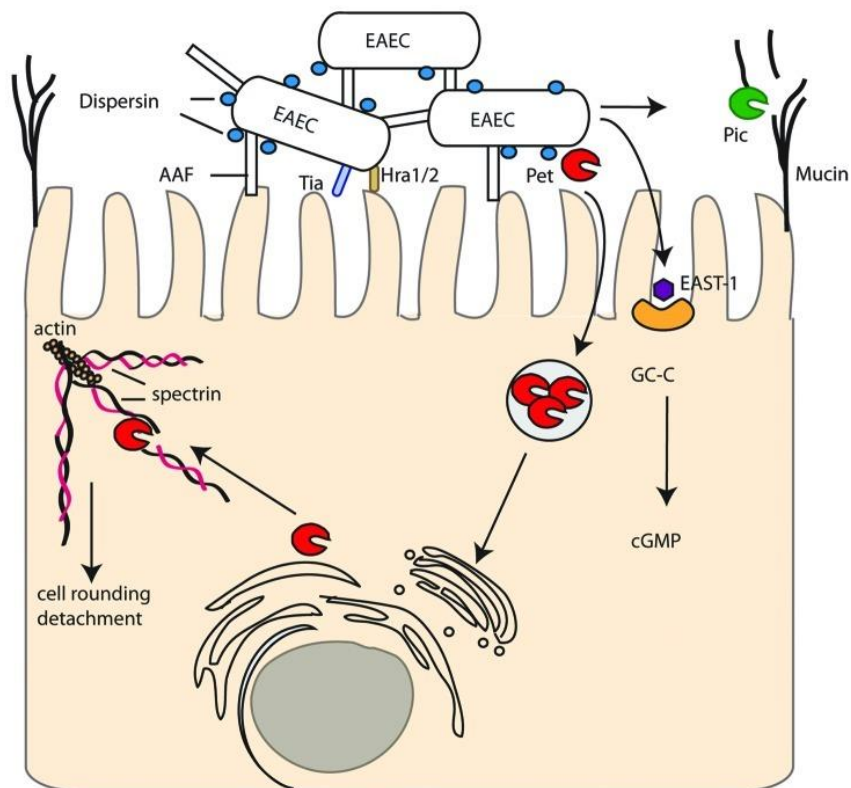
Rezervoar EAEC još nije određen, ali smatra se da su to ljudi. Infekcije se često opisuju kao alimentarne prvenstveno putem kontaminirane vode (JENSEN i sur., 2014.). Kako bi istražili životinje kao mogući rezervoar EAEC, CASSAR i sur. (2004.) su pretražili 1227 izolata *E. coli* izdvojenih iz izmeta krava, ovaca i svinja, koristeći *pAA* gen, ali nisu dokazali prisustvo EAEC sojeva. Istraživanjem PUÑO-SARMIENTO i sur. (2013.) dokazano je prisustvo *aggR* gena u izolatima izdvojenih iz izmeta kućnih ljubimaca (7,4% pasa s proljevom, 3,9% pasa bez proljeva te jedna mačka bez proljeva). BIBBAL i sur. (2014.) istraživali su klaonički otpad kao mogući izvor kontaminacije za rijeke, ali nisu dokazali prisustvo EAEC u otpadnim vodama. Prema dosadašnjim spoznajama, sojevi EAEC rijetko su izdvojeni iz životinja, ali ih se ne može isključiti kao potencijalni izvor zaraze za čovjeka (JENSEN i sur., 2014.). Sumnje da su životinje mogući izvor infekcije za ljude opisali su SCAVIA i sur. (2008.) navodeći preživače kao mogući izvor EAEC, prema slučaju izbijanja epidemije u Italiji povezanog s konzumacijom ovčjeg sira napravljenog od nepasteriziranog mlijeka.

Od čimbenika virulencije, WEINTRAUB (2007.) i JENSEN i sur. (2014.) navode da pojedini sojevi posjeduju plazmid na kojem se nalazi veliki broj gena koji kodiraju čimbenike virulencije kao što su EAST1 i agregativne adherentne fimbrije (AAF/I i AAF/II). Pojedini sojevi mogu posjedovati patogene otočiće, kao primjerice genomski otočić koji kodira *aaIC* gen povezan sa sekrecijskim sustavom tip VI, *Shigella* patogeni otočić koji kodira enterotoksine i mucinolitične gene, *Yersinia* patogeni otočić koji kodira gen za jersinijabaktin (*Ybt*) siderofore i *hly* patogeni otočić koji kodira hemolizin i P fimbrije (WEINTRAUB, 2007.; JENSEN i sur., 2014.). Veliki udio čimbenika virulencije je pod kontrolom gena

zvanog *aggR*, koji kontrolira ekspresiju faktora adhezije, disperzin proteina i velik broj gena kodiranih na kromosomu (KAUR i sur., 2010.).

Infekcija EAEC u ljudi odvija se u tri faze. Prva faza započinje adhezijom na crijevne stanice posredstvom EAEC fimbrija, koje se također nazivaju agregativne adherentne fimbrije (engl. *aggregative adherence fimbriae* – AAF/I i AAF/II), nakon čega bakterija proizvodi velike količine sluzi čime započinje stvaranje biofilma na crijevnoj mukози. Stvaranje biofilma glavna je karakteristika ove patogrupe uz karakterističnu adheziju na crijevnoj mukози koja izgledom podsjeća na naslagane cigle (engl. „*stacked-brick*“) (KAUR i sur., 2010.) (Slika 5.). Nakon stvaranja biofilma, daljnje oštećenje crijevnog epitela uzrokuju toksini, među kojima su plazmidom kodirani toksin (*pet*), termostabilni toksin (EAST1) koji je, premda karakterističan za ovu patogrupu, također dokazan u patogrupama EPEC, ETEC i EHEC, *Shigella* enterotoksin 1 (*Shet1*) te serin-proteaza transporter i upalni medijatori.

Serotipizacija EAEC sojeva pokazala se neprikladnom za identifikaciju zbog velike raznolikosti između sojeva i velikog broja takozvanih „hrpavih“ (engl. *rough*) sojeva, u kojih izostaje ekspresija somatskog antigena.



Slika 5.: Patogeneza sojevima EAEC (izvor: CLEMENS i sur., 2012.)

2.2.6. Difuzno adherentna *E. coli* (DAEC)

Difuzno adherentne *E. coli* karakteristične su po difuzno adherentnoj kolonizaciji stanica u crijevima, kojom bakterija ravnomjerno prekrije cijelu površinu stanice. Istraživanja su pokazala prisutnost bakterija ove patogrupe u crijevima djece s proljevom i bez njega, zbog čega je DAEC kao uzročnik proljeva upitan. SCALETSKY i sur. (2002.) prikazali su rezultate ispitivanja izolata izdvojenih iz izmeta djece s proljevom i bez njega te ustanovili prisutnost DAEC u obje kategorije ispitanika. Prema navedenom, zaključili su da prisustvo DAEC nije nužno povezano s pojavom proljeva, osim u djece starije od 12 mjeseci. Slične rezultate dobili su MANSAN-ALMEIDA i sur. (2013.) istraživanjem DEAC sojeva izdvojenih iz izmeta djece i odraslih s proljevom i bez njega. Rezultati istraživanja prikazuju jednaku učestalost DAEC sojeva u djece s proljevom i bez njega te češću prisutnost patogrupe u odraslih s proljevom nego u onih koji nisu imali simptome. Zaključili su da DEAC sojevi izdvojeni iz djece i odraslih s *Afa/Dr* genima za čimbenike virulencije predstavljaju dvije različite bakterijske populacije, te da u crijevima djece DEAC sojevi s čimbenicima virulencije mogu biti normalni stanovnici crijevne mikroflore.

Patogrupe DAEC i EAEC su sve češće odgovorne za pojavu akutnog i kroničnog proljeva u ljudi, no njihov rezervoar je i dalje nepoznat. Mogu li životinje biti rezervoar navedenog patogena, istraživali su WANI i sur. (2013.) na izolatima *E. coli* iz izmeta teladi i janjadi s proljevom i bez njega. Budući da ni u jednom od 728 uzoraka nisu ustanovljeni geni povezani s DAEC, zaključili su da janjad i telad nisu rezervoar ove patogrupe.

DAEC su karakteristični zbog svoje difuzne adherencije koja je zamijećena na kulturama epitelnih Hep-2 stanica, te ih se može podijeliti u dvije grupe. Prvu grupu DAEC uključuju sojevi koji posjeduju *Afa/Dr* adhezine, te su povezani s infekcijama mokraćnog sustava (pijelonefritis, cistitis, asimptomatska bakteriurija) i crijevnim infekcijama, dok drugu uključuju sojevi *E. coli* koje sudjeluju u difuznoj adherenciji (ADA-I) i mogu uzrokovati proljev kod novorođenčadi (SERVIN, 2005.).

2.2.7. Ekstraintestinalna patogena *E. coli* (ExPEC)

Ekstraintestinalna patogena *E. coli* (ExPEC) posjeduje virulentne osobitosti koje joj omogućavaju invadiranje, kolonizaciju i uzrokovanje infekcija izvan želučano-crijevnog sustava. Najučestalija oboljenja ljudi uzrokovana sojevima ExPEC uključuju infekcije mokraćnog sustava, meningitis novorođenčadi i sepsu. JOHNSON i sur. (1991.) opisuju ExPEC kao grupu *E. coli* s virulentnim čimbenicima poput adhezina, sustava za odvajanje željeza, toksina i polisaharidnih ovojnica. Rezultati analiza JOHNSON i sur. (2003a.) prikazuju ExPEC kao *E. coli* izolate koji sadrže dva ili više čimbenika virulencije: *papA* i/ili *papC* (P fimbrije), *sta/foc* (S i F1C fimbrije), *afa/dra* (Dr antigen vežući adhezini), *kpsMT II* (kapsula II grupe) i *iutA* (aerobaktin receptor).

Osim u čovjeka, ExPEC sojevi mogu uzrokovati izvancrijevne infekcije u farmских životinja i kućnih ljubimaca. Rezultati brojnih istraživanja prikazuju povezanost čimbenika virulencije ExPEC izdvojenih iz ljudi i životinja, što ukazuje na zoonotski potencijal patogrupe. Istraživanje DEZFULIAN i sur. (2003.) provedeno na 18 sojeva izdvojenih iz prasadi i teladi sa septikemijom prikazuje velik broj virulentnih faktora koji su inače prisutni u ExPEC sojeva podrijetlom od ljudi. GIRARDEAU i sur. (2003.) su, uspoređujući 18 ExPEC sojeva povezanih s upalama mokraćnog sustava u ljudi, 14 sojeva povezanih s bakterijemijom i 19 sojeva povezanih s bakterijemijom u teladi i prasadi, ustanovili veliku sličnost u čimbenicima virulencije između ljudskih i životinjskih izolata.

ExPEC sojevi mogu biti izdvojeni iz hrane, prvenstveno mesa peradi, ali i goveda i svinja u manjoj učestalosti. Uzimajući u obzir navedeno, postoji mogućnost da je ExPEC patogrupa „novi“ patogen koji se prenosi hranom (SMITH i sur., 2007.).

JOHNSON i sur. (2003b.) prikazuju rezultate prisutnosti i pripadnosti serogrubi za sojeve ExPEC izdvojene iz 21 od 55 pretraženih uzoraka piletine. Izolati su svrstani u 16 serogrupa i u većini je dokazana serogrupa O7 (pet izolata), O78 (tri izolata) i O120 (tri izolata). BLANCO i sur. (1996.) analizirali su sojeve izdvojene iz mokraće ljudi s infekcijom mokraćnog sustava na prisutnost gena za čimbenike virulencije i serogrupe. Njihovi rezultati prikazuju prisutnost većine čimbenika virulencije u sojeva svrstanih u 10 serogrupa (O1, O2, O4, O6, O7, O14, O18, O22, O75 i O83). JAKOBSEN i sur. (2010.) dokazali su prisutnost ExPEC u mesu peradi i svinja, te daljnjom grupnom analizom (engl. *cluster analysis*) i analizom gena za čimbenike virulencije ustanovili sličnost između izolata izdvojenih iz mesa peradi, svinja i mokraće ljudi oboljelih od infekcija mokraćnog sustava.

Istraživanjem 346 uzoraka hrane (222 uzoraka povrća, 74 uzoraka voća i 50 uzorka sirovog mesa) prikupljenih na tržnici, JOHNSON i sur. (2005.) dokazali su ExPEC jedino u purećem mesu, pri čemu je 12 izolata izdvojeno iz 10 pretraženih uzoraka. Prema rezultatima istraživanja, JOHNSON i sur. (2003b.) i JOHNSON i sur. (2005.) navode kako je dokaz ExPEC čest u mesu peradi.

De RYCKE i sur. (1997.) opisuju CNF kao grupu toksina prisutnih u ljudi i životinja, koji uzrokuju citopatski učinak na HeLa stanicama te *in vivo* nastajanje nekrotoksičnih lezija prilikom intradermalne inokulacije kunića. Navedeni čimbenik virulencije imenovan je citotoksičnim nekrotizirajućim faktorom (CNF) te je *E. coli* koja posjeduje CNF prozvana nekrotoksigenom *E. coli* (NTEC). CNF se dijeli na *cnf1* i *cnf2*, među kojima postoje mnoge različitosti. Tako je *cnf1* kodiran kromosomom te uzrokuje crijevne i izvancrijevne infekcije ljudi i životinja, dok je *cnf2* kodiran plazmidom te uzrokuje septikemiju i enterokolitis u preživača. DUFFY (2011.) potvrđuje prijašnje istraživanje navodeći prisustvo *cnf1* gena u ljudi, goveda, prasadi, pasa i konja s proljevom, septikemijom, infekcijama mokraćnog sustava i unutarnjih organa, dok je *cnf2* gen izdvojen iz goveda i ovaca s proljevom i septikemijom. Također, navode kako uloga navedenih gena u uzrokovanju bolesti u ljudi putem hrane kao izvora infekcije nije razjašnjena.

2.3. Filogrupe

Patogene i nepatogene (komezalne) *E. coli* podijeljene su u četiri glavne filogenetske grupe (A, B1, B2 i D). Ova podjela temeljena je na metodi prema CLERMONT i sur. (2000.), koji su razvili jednostavnu višestruku PCR metodu s tri para početnica (engl. *Triplex PCR*) u svrhu jednostavnijeg svrstavanja sojeva u navedene filogrupe. Daljnja istraživanja genoma bakterije omogućila su CLERMONT i sur. (2013.) usavršavanje navedene i razvoj nove metode višestrukog PCR-a koji koristi četiri para početnica (engl. *Quadruplex PCR*). Ovom se metodom *E. coli* mogu podijeliti u osam filogrupa (A, B1, B2, C, D, E, F i I).

Komezalni sojevi i sojevi koji uzrokuju crijevne infekcije većinom pripadaju grupama A i B1, dok oni ekstraintestinalni pripadaju pretežno filogrupi B2 te u manjoj mjeri grupi D.

Rezultati analiza prikazuju kako sojevi nisu nasumično raspoređeni unutar filogrupa te da svrstavanje *E. coli* u filogrupe može imati klinički značaj (CLERMONT i sur., 2013.).

Provedena su brojna istraživanja kako bi se odredila povezanost između čimbenika virulencije i pripadnosti filogrupi. Tako su ESCOBAR-PARAMO i sur. (2004.) proučavali povezanost genetske pozadine s ekspresijom čimbenika virulencije i ustanovili da EPEC sojevi pripadaju uglavnom grupama B1 i B2, EHEC sojevi grupama A i B1, iako serotip O157:H7 uglavnom pripada grupi E. ETEC sojevi pripadaju grupama A, B1 i C, dok je prisutnost EAEC i DAEC sojeva dokazana u svim grupama osim grupe E. ExPEC sojevi pripadaju uglavnom grupi B2, te s manjom učestalošću grupi D. Također, autori navode kako se patogrupe EHEC, ETEC i EIEC, koje su odgovorne za akutni i teški proljev te povezane s proizvodnjom toksina i/ili invazijom na eukariotsku stanicu, nalaze samo u grupama A, B1, C i E, dok su patogrupe EPEC, EAEC i DAEC povezane s uzrokovanjem kroničnog i blagog proljeva prisutne u svim filogrupama (Tablica 3.).

Među čimbenicima virulencije najčešće su istraživani *vtx* (verotoksin) geni odgovorni za proizvodnju enterotoksina i *eae* gen odgovoran za prijanjanje bakterije uz crijevnu stijenku te njihova raspodjela u filogrupe. Iako je *eae* gen većinom prisutan u VTEC, istraživanjem ISHII i sur. (2007.) nije dokazano njegovo prisustvo. Prema rezultatima njihova istraživanja, većina VTEC sojeva svrstana je u filogrupu B1 (njih 97%), a sojevi su izdvojeni iz izmeta preživača (koza, ovca i jelen) i svinja. Osim *vtx*, sojevi su posjedovali gen adherentnog faktora *saa* (njih 87%) i čimbenik virulencije enterohemolizin (kodiran *ehxA* genom). Sojevi kojima je dokazano prisustvo *eae* gena (EPEC) bili su prisutni kod većine životinja i

ravnomjerno raspoređeni unutar svih četiriju filogrupa zbog čega su autori zaključili da EPEC sojevi ne zahtijevaju specifičnu filogenetsku pozadinu.

Istraživanje GIRARDEAU i sur. (2005.) potvrđuje sklonost VTEC sojeva prema filogrupi B1, što su dokazali istražujući VTEC sojeve izdvojene iz uzoraka hrane, izmeta goveda, mliječnih krava i oboljelih ljudi te ustanovili da je 70% sojeva pripadalo filogrupi B1, a 19% filogrupi A.

Pretpostavku održavanja patogenih sojeva unutar određenih filogrupa potvrdili su i HYON-JI i sur. (2012.) ispitivanjem 162 *E. coli* izdvojene iz različitih matriksa hrane. Od izdvojenih sojeva njih 90% pripadalo je grupama A i B1, dok su tri izolata (izolat iz govedine, ribe i svinjetine) potvrđeni kao patogeni (VTEC, ETEC i EPEC) te im je određena pripadnost filogrupi B1. AFSET i sur. (2008.) su istraživanjem atipičnih EPEC (*eae+*, *bfp-*) sojeva izdvojenih iz izmeta djece oboljele od proljeva i izmeta zdrave djece ustanovili kako su sojevi zastupljeni u svim filogrupama, ali je većina pripadala filogrupi B2 te potom B1. Rezultati istraživanja ROLLAND i sur. (1998.) prikazuju 13 EIEC sojeva koji su metodom enzimske elektroforeze na više lokusa (engl. *multilocus enzyme electrophoresis* – MLEE) svrstani u filogrupu B1 (osam sojeva), A (četiri soja) i B2 (jedan soj).

BALDY-CHUDZIK i sur. (2008.) istraživali su prisutnost čimbenika virulencije odgovornih za adherenciju i proizvodnju toksina te pripadnost filogrupi u komenzalnih *E. coli* sojeva izdvojenih iz izmeta različitih vrsta životinja iz zoološkog vrta. Rezultati prikazuju da svi izolati izdvojeni iz biljoždera s dokazanim genima za čimbenike virulencije (*eae*, *eastI*, *ehxA*, *stx1* i *stx2*) pripadaju filogrupi B1. Izolati mesoždera i sveždera s dokazanim genima za čimbenike virulencije (*estI*, *estII*, *eastI*, *stx1*) češće su pripadali grupi A, uz iznimku jednog izolata s dokazanim *eae* i *stx1* genima te svrstanim u filogrupu B1, kao i tri izolata s dokazanim *cnf2* genom svrstanim u filogrupu B2. Rezultati usporedne analize ukazuju na to da su komenzalne *E. coli* iz filogrupe B1 izdvojene iz biljoždera najbolje prilagođene domaćinu, dok se za izolate mesoždera i sveždera to odnosi na grupu A.

Njihovu pretpostavku potvrdili su CARLOS i sur. (2010.) istraživanjem sojeva izdvojenih iz izmeta podrijetlom od ljudi i životinja te ustanovili prisutnost filogrupa A i B1 u svim izolata, uz većinsku pripadnost filogrupi A za one izdvojene iz ljudi, svinja (svežderi) i pilića, dok su izolati iz krava, koza i ovaca (biljoždera) pretežno svrstani u filogrupu B1.

Drugačije rezultate prikazuje istraživanje GORDON i COWLING (2003.) koji su postavili hipotezu da populacija *E. coli* ovisi o klimatskim faktorima, prehrani i tjelesnoj masi domaćina. Rezultati analize izolata izdvojenih iz izmeta različitih domaćina

(nedomesticirani kralješnjaci koji žive na području Australije) prikazuju dominaciju filogrupe B2 u biljoždera i sveždera, a kod ptica i mesoždera B1. S obzirom na njihovu hipotezu, navode primjer filogrupe B2 koja prevladava kod biljoždera koji imaju manje od 6 kilograma, ali s povećanjem tjelesne mase, filogrupa B2 postaje manje učestala te se povećava učestalost filogrupe B1. Jednako je zapaženo kod sveždera kod kojih je učestalost filogrupe A proporcionalna povećanju tjelesne mase domaćina.

Jedne od najčešćih izvancrijevnih bakterijskih infekcija u ljudi i životinja su one mokraćnog sustava, primarno uzrokovane ekstraintestinalnim patogenim *E. coli* (ExPEC). Analizom filogrupa ustanovljeno je da ExPEC najčešće pripadaju filogrupama B2 i D. Pored izolata ljudskog podrijetla, brojna istraživanja navode hranu životinjskog podrijetla kao izvor infekcije za ljude. Tako su, primjerice, JAKOBSEN i sur. (2010.) izolate *E. coli* bolesnika s upalama mokraćnog sustava, zdravih ljudi, mesa brojlera i svinja pretražili na prisutnost gena virulencije povezanih s ExPEC. Dokazali su prisutnost gena (*papA*, *papC*, *sfaS* i dr.) povezanih s upalama mokraćnog sustava ljudi u mesu brojlera i svinja i tako ukazali na njihov mogući utjecaj na zdravlje ljudi. Analizom filogrupa većina istraživanih sojeva podrijetlom od ljudi svrstana je u filogrupu B2 te potom D. Izolati životinjskog podrijetla većim dijelom svrstani su u filogrupe A i B1, ali su posjedovali manje virulentnih gena za razliku od sojeva pripadnika grupa B2 i D. Daljnje grupne analize (engl. *cluster analysis*) čimbenika virulencije pokazala su sličnosti izolata ljudskog i životinjskog podrijetla i time ukazala na mogući zoonotski potencijal mesa brojlera i svinja.

Slične rezultate prikazali su JOHNSON i sur. (2005.) analizirajući filogrupe za 12 sojeva ExPEC izdvojenih iz deset uzoraka purećeg mesa među kojima je osam sojeva svrstano u filogrupu B2 i njih tri u filogrupu D.

Istraživanje IRANPOUR i sur. (2015.) ukazuje na slične rezultate analize filogrupa prema kojima su *E. coli* izdvojene iz mokraće ljudi oboljelih od infekcija mokraćnog sustava najvećim dijelom svrstane u filogrupu B2, dok su ostale bile zastupljene u manjem postotku.

Važno je istaknuti da svaka filogrupa ima sklonost prema određenom domaćinu i održavanju određenih čimbenika virulencije, premda klonovi svih filogrupa horizontalnom izmjenom mogu preuzeti bilo koji gen. Mogućnost horizontalne izmjene gena povećava raznolikost unutar pato- i filogrupa, što bakterijskom mikroorganizmu omogućava preživljavanje i širenje putem klonova najbolje prilagođenih nositelju koje koristi kao rezervoar. Pojedine patogrupe i filogrupe *E.coli* prisutne su u svim vrstama životinja, dok su

pojedine vezane uz vrstu, što je najbolje vidljivo u sojeva VTEC čiji su rezervoar preživači, posebice goveda, a najzastupljeniji su unutar filogrupe B1.

Tablica 3.: Raspodjela patogrupa unutar filogrupa (prema: ESCOBAR-PARAMO i sur., 2004.)

| Filogrupa | Patogrupa |
|------------------|--|
| A | EHEC, EAEC, DAEC, ETEC, EIEC, EPEC |
| B1 | EPEC, EHEC, EAEC, DAEC, ETEC, EIEC |
| B2 | EPEC, EAEC, DAEC, ExPEC |
| C | EHEC, EAEC, DAEC, ETEC, EIEC, EPEC |
| D | EAEC, DAEC, ExPEC, EPEC |
| E | EHEC, ETEC, EIEC, EPEC, EAEC, DEAEC |
| F | EAEC, DAEC, EPEC |

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Dosadašnja istraživanja *E. coli* izdvojenih iz različitih vrsta uzoraka (hrana životinjskog podrijetla, izmet, mokraća) ukazuju na rasprostranjenost patogenih sojeva u ljudi i životinja i njihovu potencijalnu opasnost za ljudsko zdravlje. Prikupljanje podataka o *E. coli* bitno je za javno zdravstvo u svrhu proučavanja postojećih i onih novih patogrupa (primjerice STEAEC), njihovih rezervoara, izvora infekcije, načina širenja, mehanizama djelovanja, koji su specifični za svaku patogrupu te drugih osobitosti. Kako bi se lakše izdvojili i karakterizirali patogeni sojevi, koriste se brojne fenotipske i genotipske metode, što podrazumijeva primjenu raznih hranjivih podloga, serotipizaciju sojeva, određivanje molekularnih karakteristika izolata – prvenstveno prisutnost gena za čimbenike virulencije koji su jedini objektivni dokaz patogenosti – određivanje pripadnosti filogrubi te sekvencioniranje.

Zastupljenost podataka dobivenih istraživanjima s ciljem karakterizacije i usporedbe svojstava *E. coli* izdvojenih iz hrane u Hrvatskoj je mala. Dosadašnja istraživanja uzoraka hrane životinjskog podrijetla provedena u našoj zemlji bila su pretežno usmjerena na dokazivanje prisutnosti VTEC, prvenstveno serogrupe *E. coli* O157 te određivanju prisutnosti gena za čimbenike virulencije i filogrubi u sojeva *E. coli* koji uzrokuju uginuće životinja. Ovim istraživanjem ispitani su izolati *E. coli* izdvojeni iz mesa i obrisaka trupova podrijetlom od različitih životinjskih vrsta u svrhu određivanja njihova zoonotskog potencijala.

Cilj ovog istraživanja je:

- Odrediti biokemijske karakteristike izolata
- Molekularnim metodama ustanoviti prisutnost određenih virulentnih faktora i, na temelju ostvarenih rezultata, najučestalije patogrupe
- Na temelju kombinacije gena odrediti najzastupljenije filogrupe
- Usporediti biokemijske karakteristike, prisutnost virulentnih gena i pripadnost filogrubi te ustanoviti moguću povezanost izolata
- Na osnovi dobivenih rezultata izvesti zaključke o specifičnim karakteristikama *E. coli* u navedenim uzorcima

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Materijal

U svrhu istraživanja pretraženo je 100 sojeva *E. coli* izdvojenih iz uzoraka podrijetlom od peradi, goveda, svinja i divljači zaprimljenih u svrhu redovitog mikrobiološkog ispitivanja u razdoblju od 2013. do 2015. godine.

Pretraženo je ukupno 27 sojeva izdvojenih iz pilećeg mesa, koji uključuju trupove brojlera, strojno otkoštено meso (SOM) i mesne pripravke. Nadalje, izdvojeno je i ispitano ukupno 14 bakterijskih sojeva iz dostavljenih uzoraka mesa divljači (meso jelena običnog, jelena lopatara, muflona, srne i divlje svinje). Istraživanjem je obuhvaćeno i 30 sojeva izdvojenih iz uzoraka podrijetlom od svinja, koji su uključivali obriske trupova, svježe meso i mljeveno meso, dok je preostalih 29 sojeva korištenih u istraživanju izdvojeno iz uzoraka goveđeg podrijetla, a koji su uključili obriske trupova, svježe meso, mljeveno meso i mesne pripravke.

4.2. Metode

4.2.1. Mikrobiološka pretraga

Za izdvajanje bakterijskih sojeva korištene su sljedeće metode:

- HRN ISO 16649-2:2011: Mikrobiologija hrane i stočne hrane – Metoda brojenja beta-glucuronidasa pozitivne *Escherichia coli* - 2. dio: Brojenje kolonija pri 44 °C uporabom 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide (ISO 16649-2:2001) – kao rutinska metoda pretraživanja uzoraka;

- Postupak neselektivnog namnažanja mikroorganizama pri 37 °C tijekom 18–24 sata u puferiranoj peptonskoj vodi – BPW (engl. *Buffered Peptone Water*, Merck, Darmstadt, Njemačka), odabran prema preporuci Europskog referentnog laboratorija za Verotoksigene *Escherichia coli* (EU-RL VTEC) za dokaz gena *aggR*, *aaIC*, *ipaH*, *lt*, *sth* i *stp*;

- HRN CEN ISO/TC 13136:2013: Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Metoda temeljena na lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu (PCR) za dokazivanje prisutnosti patogena koji se prenose hranom – Horizontalna metoda za dokazivanje Shiga toksin producirajuće bakterije *Escherichia coli* (STEC) i određivanje O157, O111, O26, O103

i O145 serotipova (ISO/TS 13136:2012; CEN ISO/TS 13136:2012), koja između ostalog nudi upotrebu BPW kao bujona za neselektivno namnažanje.

HRN ISO 16649-2:2011 je metoda određivanja broja β -glukuronidaza pozitivne *E. coli* u kojoj nakon inokulacije 1 mililitra uzorka i zalijevanja s Tryptone Bile X-glucuronide - TBX (Merck, Darmstadt, Njemačka) hranjivom podlogom slijedi inkubacija pri 44 °C tijekom 18 do 24 sata. Kao bujon za namnažanje, odabrana je BPW jer omogućuje mikroorganizmu namnažanje u mediju bez inhibitornih faktora. Nakon inkubacije u BPW pri 37 °C tijekom 18–24 sata, uslijedilo je naciyepljivanje na dvije selektivne kromogene hranjive podloge, Sorbitol-MacConkey – SMAC (Merck, Darmstadt, Njemačka) i TBX, koje se inkubiraju pri 37 °C tijekom 18–24 sata. Karakteristične bakterijske kolonije porasle na TBX hranjivoj podlozi su zeleno-plave boje (β -glukuronidaza pozitivne), a one nekarakteristične su bijele boje (β -glukuronidaza negativne). Na SMAC hranjivoj podlozi karakteristične bakterijske kolonije su crveno-ružičaste. Karakteristične i nekarakteristične bakterijske kolonije precijepljene su na krvni agar s dodanom ovčjom krvi te eskulinom – EKA (Merck, Darmstadt, Njemačka; Biognost, Zagreb, Hrvatska) postupkom naciyepljivanja i iscrpljivanja materijala i inkubirane pri 37 °C tijekom 18–24 sata u svrhu porasta čistih bakterijskih kultura s jasno izdvojenim kolonijama. Karakteristične bakterijske kolonije *E. coli* koje su na krvnom agaru sivkaste, glatke, konveksne, s β -hemolizom ili bez nje, precijepljene su na BH bujon (engl. *Brain heart broth*, Merck, Darmstadt, Njemačka) s dodatkom 50% glicerola i pohranjene na -80°C do daljnjih pretraživanja.

4.2.2. Biokemijske pretrage

Biokemijske karakteristike izolata određene su VITEK2 sustavom (Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Francuska). U svrhu određivanja biokemijskih svojstava, bakterijski izolat je naciyepljen na EKA te je nakon inkubacije pri 37 °C tijekom 18 do 24 sata na karakterističnim bakterijskim kulturama provedena biokemijska identifikacija uporabom automatiziranog sustava na način da je bakterijska kultura razmućena u 3 mililitra fiziološke otopine kako bi se dobila gustoća 0,5 do 0,63 prema McFarlandovoj ljestvici. U svrhu određivanja bakterijske vrste i biokemijskog profila za tako pripremljenu suspenziju izdvojenog mikroorganizma korištene su VITEK2 GN kartice, koje raspoložu s 47 biokemijskih reakcija.

Uz VITEK2 sustav, kao dokaz aktivnosti β -glukuronidaze korištena je TBX hranjiva podloga.

4.2.3. Molekularne metode

Pohranjeni izolati korišteni su u molekularnim pretragama kako bi se dokazala prisutnost čimbenika virulencije i pripadnost filogrupi. U svrhu izdvajanja DNA, bakterijski sojevi su nakon odmrzavanja nacijepljeni na EKA te inkubirani pri 37 °C tijekom 18–24 sata. Iz poraslih bakterijskih kultura izdvojena je DNA na način da je ušica eze (10 µl) porasle bakterijske kulture razmućena u 100 µl destilirane vode bez enzima koji razgrađuju DNA i RNA (LONZA, Basel, Švicarska), suspenzija kuhana 20 minuta na 95 °C te potom centrifugirana 1 minutu na 14000 g. Za sve molekularne pretrage korišten je PCR, a uspješnost umnažanja provjerena je kapilarnom elektroforezom koristeći QIAexcel (Qiagen, Hilden, Njemačka).

4.2.3.1. Dokazivanje prisutnosti čimbenika virulencije

Izdvojeni sojevi *E. coli* pretraženi su na prisutnost gena *vtx1*, *vtx2*, *eae*, *hlyA*, *aggR*, *aaiC*, *ipaH*, *bfpA*, *saa*, *east1*, *stp*, *sth*, *ltp*, *STI* (*STa*) i *STII* (*STb*), *cnf1* i *cnf2* višestrukim i konvencionalnim PCR-om. Istraživanje prisutnosti EAEC patogrupe provedeno je dokazom *aggR*, *aaiC* i *EAST1* gena. Kako bi se dokazala prisutnost navedenih gena, korišten je konvencionalni PCR, pri čemu su za dokaz *aggR* i *aaiC* gena odabrane početnice i uvjeti umnažanja prema metodi EU-RL Method 5 „Detection of Enteroaggregative *Escherichia coli* in Food by Real Time PCR Amplification of the *aggR* and *aaiC* genes“, a određivanje prisutnosti *EAST1* gena (koji kodira EAST1) istraženo je metodom prema YAMAMOTO i ECHEVERRIA (1996.).

Određivanje prisutnosti EIEC provedeno je dokazom *ipaH* gena konvencionalnim PCR-om, a početnice i uvjeti umnažanja odabrani su prema metodi EU-RL Method 07 „Detection of Enteroinvasive *Escherichia coli* in food by Real Time PCR amplification of the *ipaH* gene“. Određivanje prisustva tipičnih EPEC provedeno je pretraživanjem izolata na *bfp* gen konvencionalnim PCR-om prema GUNZBURG i sur. (1995.), dok je za određivanje prisutnosti EHEC (VTEC) i atipične EPEC dokazom *stx1*, *stx2*, *eae*, *hlyA* i *saa* gena korištena metoda višestrukog PCR-a prema PATON i PATON (2002.).

Određivanje prisutnosti ETEC i ExPEC patogrupa provedeno je dokazom *STI*, *STII*, *cnf1* i *cnf2* gena korištenjem višestrukog i konvencionalnog PCR-a prema PASS i sur.

(2000.), dok je za određivanje prisutnosti *lt*, *stp* i *sth* gena korišten konvencionalni PCR, a početnice i uvjeti umnažanja odabrani su prema metodi EU-RL Method 8 „Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in food by Real Time PCR Amplification of the *lt*, *sth* and *stp* genes, encoding the heat-labile and heat-stable enterotoxins“.

Za jednostruki PCR korišten je HotStarTaq MasterMix kit (Qiagen, Hilden, Njemačka), dok je za višestruki PCR korišten Multiplex PCR kit (Qiagen, Hilden, Njemačka). Za svaku PCR reakciju korištene su 10 µM radne otopine početnica te su reakcije slagane tako da koncentracija svake od početnica u smjesi bude jednaka. Reakcijska mješavina ukupnog volumena 20 µl za gene *aggR*, *aaiC*, *ipaH*, *bfpA*, *stp*, *sth*, *lt*, *cnf1*, *cnf2* i *EAST1* sadržavala je 10 µl PCR Master Mix-a, 7 µl RNase-Free/DNase-Free vode, 1 µl smjese početnica i 2 µl DNA. Reakcijska mješavina ukupnog volumena 20 µl za detekciju gena *vtx1*, *vtx2*, *eae*, *hlyA* i *saa* višestrukim PCR-om sadržavala je 10 µl Multiplex PCR Master Mix-a, 3 µl Q otopine, 5 µl smjese početnica i 2 µl DNA. Reakcijska mješavina ukupnog volumena 20 µl za gene *STI* i *STII* sadržavala je 10 µl Multiplex PCR Master Mix-a, 6 µl RNase-Free/Dnase-Free vode, 2 µl smjese početnica i 2 µl DNA.

Umnažanje pojedinih gena provedeno je prema sljedećim uvjetima:

- Umnažanje gena *aggR*, *aaiC*, *ipaH*, *stp*, *sth* i *lt* provedeno je pomoću uređaja Proflex (Applied Biosystems, Foster City, SAD) te GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, SAD) pod sljedećim uvjetima: početna denaturacija pri 95 °C 15 minuta, nakon koje je uslijedilo 40 ciklusa denaturacije pri 94 °C 30 sekundi, vezanja početnica pri 56 °C 30 sekundi, umnažanja pri 72 °C 30 sekundi i završno produljivanje lanaca pri 72 °C 7 minuta.
- Umnažanje gena *bfp* provedeno je pomoću uređaja Proflex (Applied Biosystems, Foster City, SAD) te GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, SAD) pod sljedećim uvjetima: početna denaturacija pri 95 °C 15 minuta, potom 29 ciklusa denaturacije pri 94 °C 30 sekundi, vezanja početnica pri 56 °C 1 minutu, umnažanja pri 72 °C 2 minute i završnog produljivanja lanaca pri 72 °C 10 minuta.
- Umnažanje gena *EAST1* provedeno je pomoću uređaja Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, SAD) pod sljedećim uvjetima: početna denaturacija pri 95 °C 15 minuta, nakon koje je uslijedilo 30 ciklusa denaturacije pri 95 °C 30 sekundi, vezanja početnica pri 55 °C 2 minute, umnažanja pri 72 °C 2 minute i završnog produljivanja lanaca pri 72 °C 10 minuta.

- Umnažanje gena *STI*, *STII*, *cnf1* i *cnf2* provedeno je pomoću uređaja Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, SAD) pod sljedećim uvjetima: početna denaturacija pri 95 °C 15 minuta, nakon koje je uslijedilo 35 ciklusa denaturacije pri 95 °C 30 sekundi, vezanja početnica pri 63 °C 30 sekundi, umnažanja pri 72 °C 30 sekundi i završno produljivanje lanaca pri 72 °C 5 minuta.
- Umnažanje gena *vtx1*, *vtx2*, *eae*, *hlyA* i *saa* provedeno je pomoću uređaja Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, SAD) pod sljedećim uvjetima: početna denaturacija pri 95 °C tijekom 15 minuta, nakon koje je uslijedilo 10 ciklusa denaturacije pri 95 °C u trajanju od 1 minute, vezanja početnica na 65 °C tijekom 2 minute i produljivanja lanaca 90 sekundi pri 72 °C, potom 5 ciklusa u kojima se temperatura vezanja početnica postupno smanjivala s 65 °C na 60 °C, 10 ciklusa nakon kojeg je uslijedila denaturacija pri 95 °C tijekom 1 minute, vezanje početnica pri 60 °C 2 minute i 90 sekundi produljivanja lanaca pri 72 °C, nakon kojeg je uslijedilo 10 ciklusa u kojima se vrijeme produljivanja lanaca postupno povećalo s 90 sekundi na 150 sekundi te posljednji korak produljivanja lanaca pri 72 °C kroz 10 minuta.

Patogrupe, pretraženi geni i čimbenici virulencije prikazani su u Tablici 4., a početnice korištene u PCR reakcijama, nukleotidni sljedovi i reference u Tablici 5.

Određivanje podtipa učinjeno je na izolatima kojima je dokazana prisutnost *vtx1* i *vtx2* gena, u svrhu kojeg je korištena EU-RL Method 006 „Identification of the subtypes of Verocytotoxin Encoding genes (*vtx*) of *Escherichia coli* by Conventional PCR“.

Određivanje podtipova *vtx1* zahtijeva upotrebu višestrukog PCR-a s tri para početnica. Za višestruki PCR korišten je Multiplex PCR kit (Qiagen, Hilden, Njemačka). Reakcijska mješavina višestrukog PCR-a ukupnog volumena 20 µl sadržavala je 12 µl Multiplex PCR Master Mix-a, 4 µl smjese početnica u količinama: *vtx1a* 2 µl, *vtx1c* 1 µl, *vtx1d* 1 µl i 2 µl DNA. Umnažanje podtipova *vtx1* gena (*vtx1a*, *vtx1d*, *vtx1c*) provedeno je pomoću uređaja Proflex (Applied Biosystems, Foster City, SAD) pod sljedećim uvjetima: početna denaturacija pri 95 °C tijekom 15 minuta, nakon koje je uslijedilo 35 ciklusa denaturacije u trajanju od 50 sekundi pri 94 °C, vezanja početnica pri 64 °C 40 sekundi, umnažanja pri 72 °C kroz 1 minutu i završnog produljivanja lanaca pri 72 °C kroz 3 minute.

Određivanje podtipova *vtx2* zahtijeva upotrebu konvencionalnog PCR-a za koji je korišten HotStarTaq MasterMix kit (Qiagen, Hilden, Njemačka). Reakcijska mješavina konvencionalnog PCR-a ukupnog volumena 20 µl za određivanje podtipova *vtx2a* i *vtx2d*

sadržavala je 10 µl PCR Master Mixa, 5 µl RNase-Free/DNase-Free vode, 3 µl smjese početnica i 2 µl DNA. Reakcijska mješavina konvencionalnog PCR-a ukupnog volumena 20 µl za određivanje podtipova *vtx2b*, *vtx2c*, *vtx2e*, *vtx2f* i *vtx2g* sadržavala je 10 µl PCR Master Mix-a, 6 µl RNase-Free/DNase-Free vode, 2 µl smjese početnica i 2 µl DNA. Umnažanje podtipova *vtx2* gena (*vtx2a*, *vtxbd*, *vtx2c*, *vtx2d*, *vtx2e*, *vtx2f*, *vtx2g*) provedeno je pomoću uređaja Proflex (Applied Biosystems, Foster City, SAD) pod sljedećim uvjetima: početna denaturacija pri 95 °C 15 minuta, nakon koje je uslijedilo 35 ciklusa denaturacije pri 94 °C tijekom 50 sekundi, vezanja početnica pri 62 °C 40 sekundi za grupe *vtx2a*, *vtxb* i *vtx2c* ili 64°C 40 sekundi za grupe *vtx2d*, *vtx2e*, *vtx2f* i *vtx2g*, umnažanja pri 72°C tijekom 1 minute i završnog produljivanja lanaca pri 72 °C kroz 3 minute. Početnice korištene u PCR reakcijama i nukleotidni sljedovi prikazani su u Tablici 6.

Tablica 4. Patogrupa, pretraženi geni i čimbenici virulencije

| Patogrupa | Čimbenik virulencije | Naziv | Gen |
|-------------|----------------------|---|-----------------------|
| VTEC (EHEC) | Toksin | Verotoksin 1 | <i>vtx1</i> |
| VTEC (EHEC) | Toksin | Verotoksin 2 | <i>vtx2</i> |
| EPEC | Adhezin | Intimin | <i>eae</i> |
| VTEC (EHEC) | Enterohemolizin | Enterohemolizin | <i>hlyA</i> |
| EAEC | Adhezin | Regulator agregativne adherencije | <i>aggR</i> |
| EAEC | Adhezin | <i>aggR</i> -aktivirani otočić C (<i>engl. aggR-activated island C</i>) | <i>aaiC</i> |
| EIEC | | Invazijski plazmidski antigen H | <i>ipaH</i> |
| EPEC | Adhezin | Fimbrije koje oblikuju snopove (<i>engl. bundle forming pili</i>) | <i>bfp</i> |
| VTEC (EHEC) | Adhezin | STEC autoaglutinirajući adhezin | <i>saa</i> |
| EAEC | Toksin | Termostabilni enterotoksin I | <i>EAST1</i> |
| ETEC | Toksin | Termostabilni toksin | <i>STI (stp, sth)</i> |
| ETEC | Toksin | Termolabilni toksin | <i>ltp</i> |
| ETEC | Toksin | Termostabilni toksin | <i>STII</i> |
| EXPEC | Citotoksin | Citotoksični nekrotizirajući faktor | <i>cnf1</i> |
| ExPEC | Citotoksin | Citotoksični nekrotizirajući faktor | <i>cnf2</i> |

Tablica 5. Početnice korištene u PCR reakcijama, nukleotidni sljedovi i reference za dokazivanje gena

| Gen | Korištene početnice | Veličina odsječka (parova baza) | Referenca |
|--------------|--|---------------------------------|--|
| <i>vtx1</i> | ATAAATCGCCATTCGTGACTAC AGAACGCCCACTGAGATCATC | 180 | Paton i Paton (2002.) |
| <i>vtx2</i> | GGCACTGTCTGAAACTGCTCC TCGCCAGTTATCTGACATTCTG | 255 | Paton i Paton (2002.) |
| <i>eae</i> | GACCCGGCACAAGCATAAGC CCACCTGCAGCAACAAGAGG | 384 | Paton i Paton (2002.) |
| <i>hlyA</i> | GCATCATCAAGCGTACGTTCC AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT | 534 | Paton i Paton (2002.) |
| <i>aggR</i> | GAATCGTCAGCATCAGTACA CCTAAAGGATGCCCTGATGA | 102 | Početnice i uvjeti umnažanja prema EU-RL Method 5 „Detection of Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> in food by Real Time PCR amplification of the <i>aggR</i> and <i>aaiC</i> genes“ |
| <i>aaiC</i> | CATTTACGCTTTTTCAGGAAT CCTGATTTAGTTGATTCCCTACG | 160 | Početnice i uvjeti umnažanja prema EU-RL Method 5 „Detection of Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> in food by Real Time PCR amplification of the <i>aggR</i> and <i>aaiC</i> genes“ |
| <i>ipaH</i> | CCTTTTCCGCGTTCCTTGA CGGAATCCGGAGGTATTGC | 63 | Početnice i uvjeti umnažanja prema EU-RL Method 07 „Detection of Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> in food by Real Time PCR amplification of the <i>ipaH</i> gene |
| <i>bfpA</i> | AATGGTGCTTGCCTTGCTG GCCGCTTTATCCAACCTGGTA | 326 | Grunzberg i sur. (1995.) |
| <i>saa</i> | CGTGATGAACAGGCTATTGC ATGGACATGCCTGTGGCAAC | 119 | Paton i Paton (2002.) |
| <i>EAST1</i> | CCATCAACACAGTATATCCGA GGTCGCGAGTGACGGCTTTG | 111 | Yamato i Echeverria (1996.) |
| <i>stp</i> | TGAATCACTTGACTTTCAAAA GGCAGGATTACAACAAAGTT | 136 | EU-RL Method 8 „Detection of Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> in food by Real Time PCR amplification of the <i>lt</i> , <i>sth</i> and <i>stp</i> genes, encoding the heat-labile and heat-stable enterotoxins“ |
| <i>sth</i> | GCTAAACCAGYAGRGTTCAAAA CCCGGTACARGCAGGATTACAACA | 147 | EU-RL Method 8 „Detection of Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> in food by Real Time PCR amplification of the <i>lt</i> , <i>sth</i> and <i>stp</i> genes, encoding the heat-labile and heat-stable enterotoxins“ |
| <i>ltp</i> | TTCCACCGGATCACCAA CAACCTTGTTGGTGCATGATGA | 62 | EU-RL Method 8 „Detection of Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> in food by Real Time PCR amplification of the <i>lt</i> , <i>sth</i> and <i>stp</i> genes, encoding the heat-labile and heat-stable enterotoxins“ |
| <i>STI</i> | TTCCCTCTTTTAGTCAGTCAACTG GGCAGGATTACAACAAAGTTACAG | 160 | Pass i sur. (2000.) |
| <i>STII</i> | CCCCCTCTCTTTGCACTTCTTTCC TGCTCCAGCAGTACCATCTCTAACC | 423 | Pass i sur. (2000.) |
| <i>cnf1</i> | GGCGACAAATGCAGTATTGCTTGG GACGTTGGTTGCGGTAATTTGGG | 552 | Pass i sur. (2000.) |
| <i>cnf2</i> | GTGAGGCTCAACGAGATTATGCACTG CCACGCTTCTTCTCAGTTGTTCTC | 839 | Pass i sur. (2000.) |

Tablica 6. Početnice korištene u PCR reakcijama i nukleotidni sljedovi za određivanje *vtx1* i *vtx2* podtipa

| Gen | Korištene početnice | Veličina odsječka (parova baza) |
|--------------|--------------------------------|---------------------------------|
| <i>vtx1a</i> | CCTTTCCAGGTACAACAGCGGT | 478 |
| | GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG | |
| <i>vtx1c</i> | CCTTTCCTGGTACAACAGCGGT | 252 |
| | CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA | |
| <i>vtx1d</i> | CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC | 203 |
| | CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA | |
| <i>vtx2a</i> | GCGATACTGRGBACTGTGGCC | 349 347 |
| | CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG | |
| | GGCCACCTTCACTGTGAATGTG | |
| <i>vtx2b</i> | AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC | 251 |
| | CAGCAAATCCTGAACCTGACG | |
| <i>vtx2c</i> | GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA | 177 |
| | CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA | |
| <i>vtx2d</i> | AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG | 179 280 |
| | TTYCCGGCCACTTTTACTGTG | |
| | GCCTGATGCACAGGTAAGGAC | |
| <i>vtx2e</i> | CGGAGTATCGGGGAGAGGC | 411 |
| | CTTCCTGACACCTTACAGTAAAGGT | |
| <i>vtx2f</i> | TGGGCGTCATTCACTGGTTG | 424 |
| | TAATGGCCGCCCTGTCTCC | |
| <i>vtx2g</i> | CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC | 573 |
| | GATGGCAATTCAGAATAACCGCT | |

4.2.3.2. Određivanje pripadnosti filogrupi

Izdvojeni sojevi pretraženi su na prisutnost gena povezanih s filogrupom višestrukim PCR-om prema CLERMONT i sur. (2013.) kojom se *E. coli* dijeli u osam filogrupa (A, B1, B2, C, D, E, F i D). Prvi korak je izvođenje višestrukog PCR-a na izolatima, kojim se na temelju prisutnosti ili odsutnosti četiriju gena (*chuA*, *yjaA*, TspE4.C2 i *arpA*) izolat svrstava u filogrupu. Budući da metoda zahtijeva dodatne analize prilikom svrstavanja izolata u filogrupe C i E, za pojedine izolate korišten je PCR specifičan za predmetne filogrupe.

Određivanje filogrupe provedeno je višestrukim PCR-om uz korištenje Multiplex PCR kita (Qiagen, Hilden, Njemačka). Reakcijska mješavina početnog PCR-a koji koristi četiri para početnica, ukupnog volumena 20 μ l, sastojala se od 10 μ l Multiplex Master mix, 3 μ l Q otopine, 5 μ l smjese početnica u količinama: *chuA* 1 μ l, *yjaA* 1 μ l, TspE4.C2 1 μ l, *arpA* 2 μ l i 2 μ l DNA. Za svrstavanje izolata u C ili E filogrupu korištena je reakcijska mješavina volumena 20 μ l koja se sastojala od 10 μ l Multiplex Master mixa, 5 μ l Q otopine, 3 μ l početnica u količinama: *trpBA* 1 μ l te *ArpAgpE* 2 μ l za filogrupu E ili *trpAgpC* 2 μ l za filogrupu C i 2 μ l DNA.

PRC umnažanje provedeno je u uređaju Veriti 96 Well Thermal Cyclor (Applied Biosystems, Foster City, SAD) pod sljedećim uvjetima: početna denaturacija pri 95 °C tijekom 15 minuta, nakon koje je uslijedilo 30 ciklusa denaturacije pri 94 °C u trajanju 5 sekundi, vezivanje početnica pri 57 °C (grupa E) ili 59 °C (višestruki PCR s četiri para početnica i grupa C) tijekom 20 sekundi, umnažanja pri 72 °C u trajanju 5 minuta te završnog produljivanja lanaca pri 72 °C tijekom 7 minuta.

Ciljani geni, nukleotidni sljedovi i početnice korištene u PCR reakciji prikazani su u Tablici 7.

Tablica 7. Ciljani geni, nukleotidni sljedovi i početnice korištene u PCR reakciji za određivanje pripadnosti filogrupi

| Gen | Korištene početnice | Veličina odsječka (parova baza) |
|-------------------|----------------------------|--|
| <i>chuA.1b</i> | ATGGTACCGGACGAACCAAC | 288 |
| <i>chuA.2</i> | TGCCGCCAGTACCAAAGACA | |
| <i>yjaA.1b</i> | CAAACGTGAAGTGTCAGGAG | 211 |
| <i>yjaA.2b</i> | AATGCGTTCCTCAACCTGTG | |
| <i>TspE4C2.1</i> | CACTATTCGTAAGGTCATCC | 152 |
| <i>TspE4C2.2b</i> | AGTTTATCGCTGCGGGTTCGC | |
| <i>AceK.f</i> | AACGCTATTCGCCAGCTTGC | 400 |
| <i>ArpA1.r</i> | TCTCCCCATACCGTACGCTA | |
| <i>ArpAgpE.f</i> | GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC | 301 |
| <i>ArpAgpE.r</i> | GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG | |
| <i>trpAgpC.1</i> | AGTTTTATGCCAGTGCGAG | 219 |
| <i>trpAgpC.2</i> | TCTGCGCCGGTCACGCC | |
| <i>trpBA.f</i> | CGGCGATAAAGACATCTTCAC | 489 |
| <i>trpBA.r</i> | GCAACGCGGCCTGGCGGAAG | |

4.2.4. Verifikacija biokemijskih i molekularnih metoda

Kao pozitivne kontrole prilikom izdvajanja i biokemijske identifikacije korišten je β -glukuronidaza pozitivan soj *Escherichia coli* ATCC 25922 i β -glukuronidaza negativan soj *Escherichia coli* O157 oznake CO7, dostavljen iz zbirke sojeva EU-RL VTEC (EU-RL VTEC, Rim, Italija) kao referentni soj za međulaboratorijska ispitivanja.

Za PCR, kao potvrda svakog ciklusa korištena je negativna kontrola – uzorak koji ne sadrži ciljane gene (DNK čista voda; engl. *DNA free water*) i pozitivna kontrola – uzorak s traženim genom ili skupinom gena koji služe kao pokazatelji uspješne reakcije.

Izolirane DNA koje su korištene kao pozitivne kontrole za gene za čimbenike virulencije *sth* (EA 22), *stp* i *lt* (EF 451), *cnf1* (EF 176), *cnf2* (EF 147), *bfp* (EF 133), *saa* (ED 99), *hlyA*, *eae*, *stx1* i *stx2* (ED 749) dostavljene su iz zbirke sojeva EU-RL VTEC (ljubaznošću, EU-RL VTEC, Rim, Italija). Bakterijske kulture korištene za određivanje *aggR* i *aaiC* te *vtx1* i *vtx2* podgrupa dostavljene su iz zbirke sojeva EU-RL VTEC kao referentni sojevi za međulaboratorijska ispitivanja pod sljedećim oznakama: *aggR* i *aaiC* (C679-12), *vtx1a*, *vtx2a* (D2435), *vtx1c*, *vtx2b* (D3602), *vtx1d* (D3522), *vtx2b*, *vtx2c* (D2587), *vtx2d* (D3435), *vtx2e* (D3648), *vtx2f* (D3546) i *vtx2g* (D3509). Potvrda umnažanja *STI*, *STII* i *EAST1* gena kontrolirana je umnažanjem izolirane bakterijske kulture oznake P25 dostavljenog iz zbirke sojeva Laboratorija za dijagnostiku, Veterinarskog zavoda Križevci (ljubaznošću dr. sc. Sukalić, VZK).

Kontrola umnažanja filogrupa provedena je primjenom pozitivnih kontrola A0 (H5), A1 (K-12), B1 (IA/1), B2 (ED1a), C(H218), D1 (UMN026), D2 (MO56), E (TA447), F (ROAR8) i Clade V (EIII8) dostavljenih iz zbirke sojeva ljubaznošću dr. Oliver Clermont, Inserum, Francuska.

4.2.5 Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka obavljena je programom Stata 13.1 (Stata Corp., SAD) i izražena binarnom varijablom 0/1 (da/ne). Povezanost učestalosti pojavljivanja pojedinih vrijednosti provjerene su hi-kvadrat i Fischer exact testom.

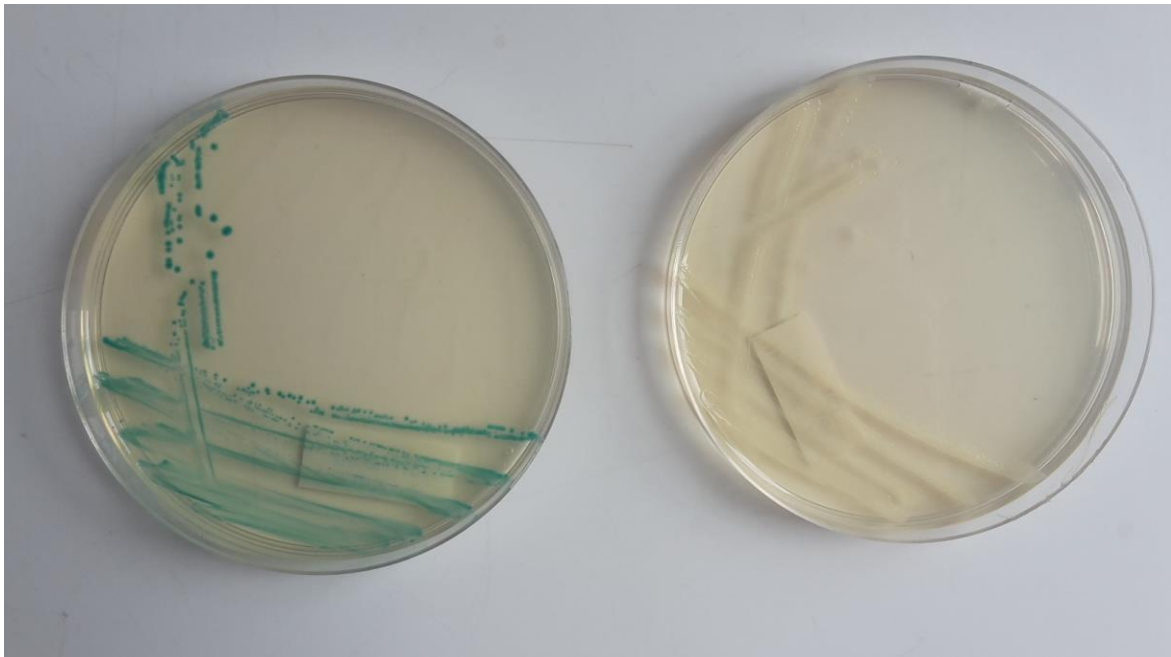
Multivarijantna statistička analiza provedena je primjenom modela logističke regresije, a u model su uvrštene varijable koje su statistički značajno povezane.

Rezultati s p vrijednostima manjim ili jednakim od 0,05 ($\leq 0,05$) smatrani su statistički značajnima.

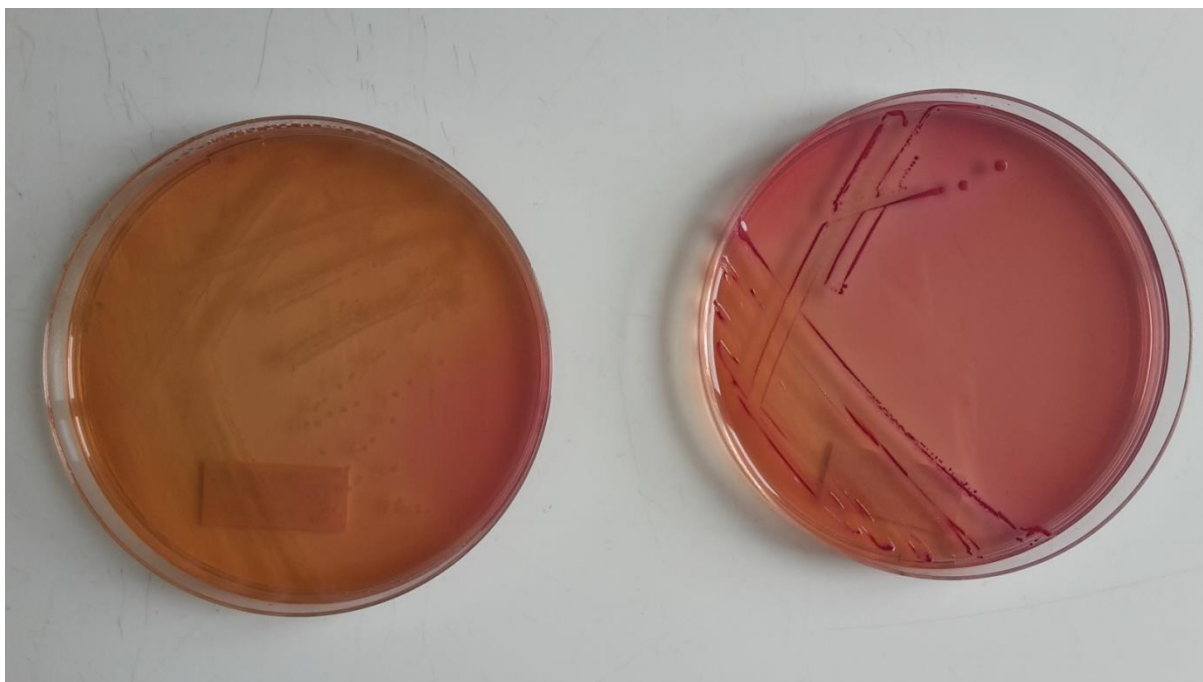
5. REZULTATI

5.1. Morfološke karakteristike bakterijskih izolata

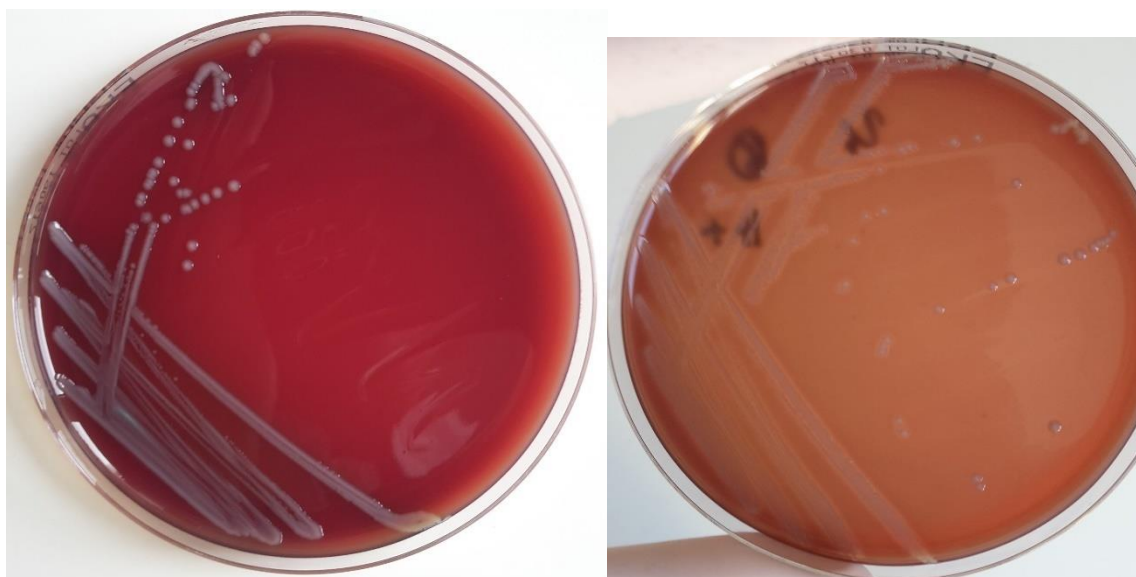
Za izdvajanje *E. coli* korištene su selektivne kromogene hranjive podloge TBX i SMAC. Karakteristični sojevi porasli na TBX hranjivoj podlozi su zeleno-plavi (β glukuronidaza pozitivni), a oni nekarakteristični su bijele boje (β -glukuronidaza negativni) (Slika 6.). Karakteristični bakterijski sojevi na SMAC hranjivoj podlozi su ružičasto-crveni, dok su oni nekarakteristični bijelo-žute boje (Slika 7.). Svi sojevi opisanih karakteristika precijepljeni su na krvni agar (EKA). Morfološki karakteristični sojevi *E. coli* na krvnom agaru su sivkasti, glatki, sjajni, konveksni, s hemolizom ili bez nje (v. Sliku 8.). Ukupno je pretraženo 15 β -glukuronidaza negativnih izolata, dok je njih 85 bilo β -glukuronidaza pozitivno.



Slika 6.: Prikaz porasta β -glukuronidaza pozitivnih (lijevo) i β -glukuronidaza negativnih izolata (desno) na TBX selektivnoj hranjivoj podlozi nakon inkubacije pri 37 °C tijekom 24 sata (izdvojeno u Laboratoriju za mikrobiologiju hrane, HVI Zagreb)



Slika 7.: Prikaz porasta ružičasto-crvenih (desno) i bijelo-žutih (lijevo) izolata na SMAC selektivnoj hranjivoj podlozi nakon inkubacije pri 37 °C tijekom 24 sata (izdvojeno u Laboratoriju za mikrobiologiju hrane, HVI Zagreb)



Slika 8.: Prikaz porasta nehemolitične (lijevo) i hemolitične (desno) *E. coli* na krvnom agaru (EKA) nakon inkubacije pri 37 °C tijekom 24 sata (izdvojeno u Laboratoriju za mikrobiologiju hrane, HVI Zagreb)

5.2. Biokemijske pretrage bakterijskih izolata

Biokemijska identifikacija izolata provedena je VITEK2 sustavom koji karakterizira izolate prema 47 reakcija (primjer izgleda izvješća, Slika 9.).

Rezultati prikazuju podjednake biokemijske karakteristike za pretražene izolate. Većina biokemijskih reakcija identična je za sve izolate, dok su pojedine bile varijabilne. U daljnjem tekstu opisane su biokemijske reakcije kojima su karakterizirani izolati.

Analzirani izolati imali su ista biokemijska svojstva prema reakcijama: Ala-Phe-Pro arilamidaza (APPA), adonitola (ADO), L-pirolidolin (PyrA), L-arabitol (IARL), D-celobioza (dCEL), beta galaktozidaza (BGAL), proizvodnja vodikovog sulfida (H₂S), beta-N-acetil-glukozaminidaza (BNAG), glutamil arilamidaza pNA (AGLTp), D-glukoza (dGLU), fermentacija glukoze (OFF), β-glukozidaza (BGLU), D-maltoza (dMAL), D-manitol (dMAN), D-manoza (dMNE), β-iksilozodaza (BXYL), β-alanin arilamidaza pNA (Balap), lipaza (LIP), palatinoza (PLE), ureaza (URE), D-sorbitol (dSOR), D-tagatoza (dTAG), D-trehaloza (dTRE), natrijev citrat (CIT), malonat (MNT), αglukozidaza (AGLU), β-N-acetil-galaktozaminidaza (NAGA), fosfataza (PHOS), glicin arilamidaza (GlyA), lizin dekarboksilaza (LDC), iskoristivost L-histidina (IHISa), kumarat (CMT), Glu-gli-arg arilamidaza (GGAA), iskoristivost L-malata (IMLTa), elmanov reagens (ELLM) i iskoristivost laktata (ILATa).

Izolati su pokazali varijabilne biokemijske reakcije prema: gama glutamil transferazi (GGT), L-prolin arilamidazi (ProA), tirozin arilamidazi (TyrA), saharozi (SAC), 5-keto-D-glukonatu (5KG), alkalizaciji L-laktata (ILATk), alkalizaciji sukcinata (SUCT), alfa galaktozidazi (AGAL), ornitin dekarboksilazi (ODC), beta glukuronidazi (BGUR) i otpornosti na O/129 (O129R).

Većina je izolata za reakcije GGT (90,16%) i ProA (93,44%) iskazivala negativnu reakciju bez obzira na podrijetlo. Rezultati analize prikazuju pozitivne biokemijske reakcije za TyrA (70,49%), SUCT (73,77%), AGAL (72,13%) i O129R (73,77%) kod većine izolata bez obzira na podrijetlo, dok je većina izolata iskazivala negativnu biokemijsku reakciju za 5KG (85,25%). Od ostalih varijabilnih svojstava, zamjetno je da svi izolati imaju podjednako pozitivne (49,18%) i negativne (50,81%) reakcije za SAC bez obzira na njihovo podrijetlo, dok su izolati podrijetlom od svinja (66,67%) i peradi (55%) imali pozitivnu reakciju na ILATk za razliku od goveda (68,75%) kojima je većina izolata iskazivala negativnu reakciju. Slično se može primijetiti pozitivnom reakcijom na ODC u izolata podrijetlom od divljači

(70%) i goveda (75%), za razliku od izolata podrijetlom od peradi (65%) s većinskom negativnom reakcijom izolata (Tablica 8.).

Od biokemijskih analiza izdvaja se reakcija alkalizacije L-laktata (ILATk) za izolate β-glukuronidaza negativne *E. coli* izdvojene iz mesa peradi naspram onih β-glukuronidaza pozitivnih. Rezultati prikazuju pozitivnu reakciju u deset izolata β-glukuronidaza negativne *E. coli* prema devet negativnih reakcija i jedne pozitivne u izolata β-glukuronidaza pozitivne *E. coli*.

Od atipičnih rezultata biokemijskih analiza izdvaja se proizvodnja vodikovog sulfida u izolata kojemu je ustanovljena prisutnost *vtx2* virulentnog gena.

HVI
Laboratory Report

bioMérieux Customer: Mo hrane
System #: Z-1-1

Printed May 26, 2017 09:28 CDT
Printed by: stojevic
Report Version: 2 of 2

Isolate Group: D.S. 15-1

Card Type: GN Testing Instrument: 00000EEA88C3 (2900)

Bionumber: 0405610540424611
Organism Quantity:

Comments:

| | | | |
|---|--|------------------------|---------------------------------|
| Identification Information | Card: GN | Lot Number: 2410085403 | Expires: Feb 19, 2018 12:00 CST |
| | Completed: 20:37 CDT | Status: Final | Analysis Time: 4.00 hours |
| Selected Organism | 99% Probability Bionumber: 0405610540424611 Escherichia coli | | |
| SRF Organism | Confidence: Excellent identification | | |
| Analysis Organisms and Tests to Separate: | | | |
| Analysis Messages: | | | |
| Contraindicating Typical Biopattern(s) | | | |

| Biochemical Details | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|-------|---|----|------|---|----|-------|---|----|-------|---|----|-------|---|----|-------|---|
| 2 | APPA | - | 3 | ADO | - | 4 | PvA | - | 5 | IARL | - | 7 | dCEL | - | 9 | BGAL | + |
| 10 | H2S | - | 11 | BNAG | - | 12 | AGLTp | - | 13 | dGLU | - | 14 | GGT | - | 15 | OFF | + |
| 17 | BGLU | - | 18 | dMAL | + | 19 | dMAN | + | 20 | dMNE | + | 21 | BXYL | - | 22 | BALap | - |
| 23 | ProA | - | 26 | LIP | - | 27 | PLE | - | 29 | TvA | + | 31 | URE | - | 32 | dSOR | + |
| 33 | SAC | - | 34 | dTAG | - | 35 | dTRE | + | 36 | CIT | - | 37 | MNT | - | 39 | 5KG | - |
| 40 | ILATk | - | 41 | AGLU | - | 42 | SUCT | + | 43 | NAGA | - | 44 | AGAL | + | 45 | PHOS | - |
| 46 | GlyA | - | 47 | ODC | - | 48 | LDC | + | 53 | IHISa | + | 56 | CMT | + | 57 | BGUR | + |
| 58 | O129R | + | 59 | GGAA | - | 61 | IMLTa | - | 62 | ELLM | + | 64 | ILATa | - | | | |

| Action | Reviewed by: | Name (User ID) | Date/Time | Comment |
|--------|--------------|----------------|------------------------|---------|
| | stojevic | (stojevic) | May 26, 2017 09:28 CDT | |

Installed VITEK 2 Systems Version: 07 01
 MIC Interpretation Guidelines:
 AES Parameter Set Name:
 Therapeutic Interpretation Guidelines
 AES Parameter Last Modified

Page 1 of 1

Slika 9: Primjer izgleda izvješća biokemijske pretrage VITEK2 sustavom

Tablica 8. Rezultati varijabilnih biokemijskih svojstava s obzirom na podrijetlo izolata

| Podrijetlo | GGT | | ProA | | TyrA | | SAC | | 5KG | | ILATk | | SUCT | | AGAL | | ODC | | BGUR | | O129R | |
|------------|-----|----|------|----|------|----|-----|----|-----|----|-------|----|------|----|------|----|-----|----|------|----|-------|----|
| | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Perad | 1 | 19 | 1 | 19 | 17 | 3 | 8 | 12 | 3 | 17 | 11 | 9 | 17 | 3 | 16 | 4 | 7 | 13 | 10 | 10 | 16 | 4 |
| Divljač | 0 | 10 | 0 | 10 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2 | 8 | 6 | 4 | 7 | 3 | 7 | 3 | 7 | 3 | 9 | 1 | 6 | 4 |
| Svinja | 2 | 13 | 2 | 13 | 12 | 3 | 8 | 7 | 3 | 12 | 10 | 5 | 12 | 3 | 10 | 5 | 7 | 8 | 13 | 2 | 12 | 3 |
| Govedo | 2 | 14 | 1 | 15 | 9 | 7 | 9 | 7 | 1 | 15 | 5 | 11 | 9 | 7 | 11 | 5 | 12 | 4 | 14 | 2 | 11 | 5 |
| Ukupno | 5 | 56 | 4 | 57 | 43 | 18 | 30 | 31 | 9 | 52 | 32 | 29 | 45 | 16 | 44 | 17 | 33 | 28 | 46 | 15 | 45 | 16 |

5.3. Molekularne pretrage na gene za čimbenike virulencije

Pretraženo je ukupno 100 izolata *E. coli* od kojih je u njih 36 (36%) dokazan barem jedan gen za čimbenike virulencije. Ukupno je ustanovljeno 48 gena virulencije, zbog činjenice da ih je više dokazano u:

- dvama izolatima izdvojenim iz peradi
- šest izolata izdvojena iz divljači
- trima izolatima izdvojenim iz svinja
- jednom izolatu izdvojenom iz goveda

Od 27 pretraženih izolata izdvojenih iz uzoraka podrijetlom od peradi, u njih deset (37,04%) dokazano je prisustvo gena za čimbenike virulencije. Gen *eae* dokazan je u pet (50%) izolata, gen *EAST1* dokazan je također u pet izolata (50%), među kojima je jedan izolat (10%) s dokazanim *eae* i *EAST1* genima te jedan (10%) s dokazanim *cnf1* i *cnf2* genima (Tablica 9.).

Od 14 pretraženih izolata izdvojenih iz uzoraka podrijetlom od divljači, u njih 11 (78,57%) dokazan je barem jedan gen za čimbenik virulencije. Gen *EAST1* dokazan je u osam izolata (72,73%), gen *STII* u četirima izolatima (36,36%), a u pojedinim izolatima su u jednakom omjeru (9,09%) dokazni *eae*, *hlyA*, *vtx1*, *cnf1* i *cnf2* geni. Među navedenim, u šest izolata dokazano je prisustvo dvaju gena. Od šest izolata, u četirima su dokazani geni *EAST1* i *STII*, u jednom izolatu dokazano je prisustvo *EAST1* i *hlyA* gena, dok je u posljednjem dokazano prisustvo *cnf1* i *cnf2* (Tablica 9.).

Od 30 pretraženih izolata izdvojenih iz uzoraka svinjskog podrijetla, u njih sedam (23,33%) dokazano je prisustvo gena za čimbenike virulencije. Gen *EAST1* dokazan je u trima izolatima (42,86%), gen *cnf1* dokazan je u dvama izolatima (28,57%) dok su geni za čimbenike virulencije *hlyA*, *cnf2*, *eae*, *STII* i *vtx2* dokazani u pojedinim izolatima u jednakom omjeru (14,29%). Među navednim, u trima izolatima dokazano je prisustvo dvaju gena. Jednom izlatu dokazani su *eae* i *hlyA* geni, drugom izolatu dokazni su *cnf1* i *cnf2* geni, dok su trećem dokazani *EAST1* i *STII* geni (Tablica 9.).

Od 29 pretraženih izolata izdvojenih iz uzoraka goveđeg podrijetla, u njih osam (27,59%) dokazano je prisustvo gena za čimbenike virulencije. Gen *EAST1* dokazan je u četirima izolatima (50%), gen *cnf2* dokazan je u jednom izolatu (12,5%), a geni *eae* (25%) i *cnf1* (25%) jednako su zastupljeni, pri čemu je svaki dokazan u dva izolata. Među navedenima, u jednom izolatu je dokazano prisustvo *cnf1* i *cnf2* gena (Tablica 9.).

Od ukupnog broja pretraženih izolata, u njih 20 (20%) dokazan je gen za čimbenike virulencije *EAST1*, čime je on najučestaliji. Navedeni gen dokazan je u osam izolata (40%) podrijetlom od divljači, pet izolata (25%) podrijetlom od peradi, četiri izolata (20%) podrijetlom od goveda i tri izolata (15%) podrijetlom od svinja (Dijagram 1.).

Gen *eae* dokazan je u devet izolata (9%), od kojih pet (55,56%) čine izolati podrijetlom od peradi, dva (22,22%) podrijetlom od goveda, jedan izolat podrijetlom od divljači (11,11%) i jedan (11,11%) izolat podrijetlom od svinja (Dijagram 1.).

Gen koji kodira termostabilni enterotoksin *STII* dokazan je u pet izolata (5%) od kojih je četiri (80%) dokazano u izolatima podrijetlom od mesa divljači i jedan (20%) u izolatu podrijetlom od svinje (Dijagram 1.).

Prisutnost gena koji kodiraju citotoksin nekrotizirajući faktor 1 *cnf1*, dokazana je u šest izolata (6%), od kojih su po dva bila (33,33%) podrijetlom od svinja, odnosno od goveda (33,33%), te po jedan izolat (16,67%) podrijetlom od divljači, odnosno od peradi (16,67%). Gen koji kodira citotoksin nekrotizirajući faktor 2 *cnf2*, dokazan je u četirima izolatima (4%) od kojih je jedan izolat (25%) podrijetlom od peradi, drugi (25%) podrijetlom od divljači, treći (25%) podrijetlom od svinje i posljednji (25%) podrijetlom od goveda (Dijagram 1.).

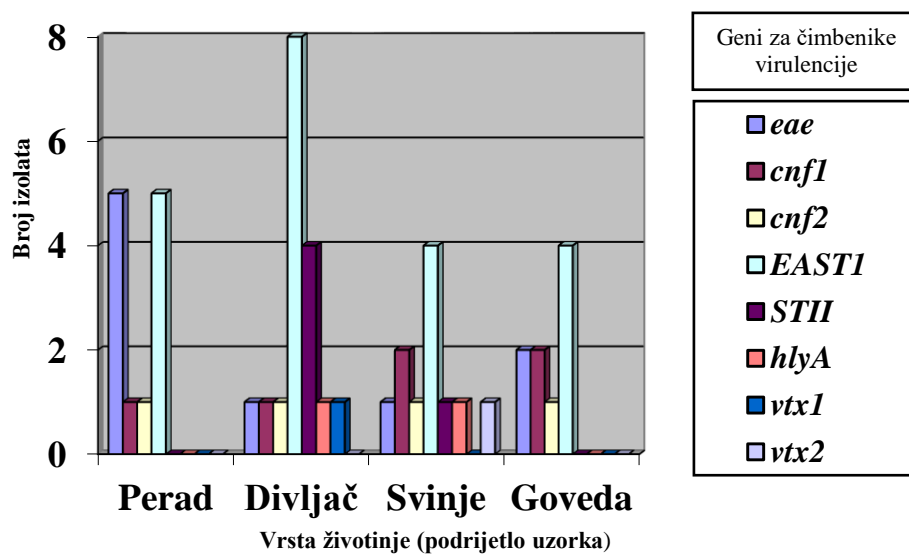
Prisutnost gena koji kodira čimbenik virulencije *hlyA* dokazan je u dvama izolatima (2%), u jednom izolatu (50%) podrijetlom od divljači i jednom (50%) podrijetlom od svinja (Dijagram 1.).

Prisutnost gena za verotoksine dokazana je u dvama izolatima (2%) od ukupnog broja pretraženih izolata. Gen *vtx1* ustanovljen je u izolatu izdvojenom iz divljači, dok je u izolatu izdvojenom iz svinje dokazan gen *vtx2* (Dijagram 1.). Izolatu kojem je dokazano prisustvo *vtx1* gena, ustanovljena je pripadnost podtipovima *vtx1c* i *vtx1d*, dok je izolatu kojem je dokazano prisustvo *vtx2* gena ustanovljena pripadnost podtipu *vtx2e*.

Tablica 9. Rezultati molekularnih pretraga izolata na gene koji kodiraju čimbenike virulencije

| Broj uzorka | Vrsta uzorka | Geni koji kodiraju čimbenike virulencije | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|----------------------|--|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|--------------|------------|-------------|-----------|-------------|-------------|
| | | <i>ipaH</i> | <i>aggR</i> | <i>aaiC</i> | <i>bfp</i> | <i>vtx1</i> | <i>vtx2</i> | <i>eae</i> | <i>saa</i> | <i>hlyA</i> | <i>EAST1</i> | <i>STI</i> | <i>STII</i> | <i>lt</i> | <i>cnf1</i> | <i>cnf2</i> |
| 1 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | SOM | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 5 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 8 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 9 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 12 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 13 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 14 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 15 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 16 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 17 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 18 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 19 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 20 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 21 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 22 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 23 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 24 | SOM | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 25 | Pileći trup | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 26 | Mesni pripravak | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 27 | Mesni pripravak | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 28 | Jelen obični | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 29 | Jelen lopatar | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 30 | Srna | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 31 | Jelen obični | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 32 | Jelen lopatar | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 33 | Srna | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 34 | Divlja svinja | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| 35 | Jelen obični | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - |
| 36 | Jelen lopatar | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - |
| 37 | Jelen lopatar | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - |
| 38 | Muflon | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - |
| 39 | Srna | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 40 | Divlja svinja | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 41 | Srna | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 42 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 43 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 44 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 45 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 46 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 47 | Mljeveno meso | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 48 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 49 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 50 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 51 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 52 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 53 | Mljeveno meso | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 54 | Svinjsko meso | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 55 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 56 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 57 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 58 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 59 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 60 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 61 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 62 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 63 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 64 | Mljeveno meso | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 65 | Mljeveno meso | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 66 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 67 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 68 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - |
| 69 | Mljeveno meso | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 70 | Mljeveno meso | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 71 | Obrisak trupa svinje | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 72 | Govede meso | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 73 | Obrisak trupa goveda | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 74 | Govede meso | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 75 | Obrisak trupa goveda | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 76 | Obrisak trupa goveda | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 77 | Obrisak trupa goveda | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 78 | Obrisak trupa goveda | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 79 | Govede meso | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 80 | Obrisak trupa goveda | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 81 | Obrisak trupa goveda | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 82 | Mljeveno meso | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 83 | Obrisak trupa goveda | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 84 | Mesni pripravak | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 85 | Mljeveno meso | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 86 | Obrisak trupa goveda | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 87 | Mesni pripravak | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 88 | Mesni pripravak | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 89 | Mljeveno meso | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 90 | Juneće meso | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 91 | Obrisak trupa goveda | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 92 | Govede meso | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 93 | Obrisak trupa goveda | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 94 | Obrisak trupa goveda | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 95 | Obrisak trupa goveda | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 96 | Mljeveno meso | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 97 | Mljeveno meso | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 98 | Obrisak trupa goveda | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 99 | Obrisak trupa goveda | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 100 | Mljeveno meso | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |



Dijagram 1: Grafički prikaz raspodjele gena koji kodiraju čimbenike virulencije prema podrijetlu uzorka

5.4. Zastupljenost patogrupa u izolatima

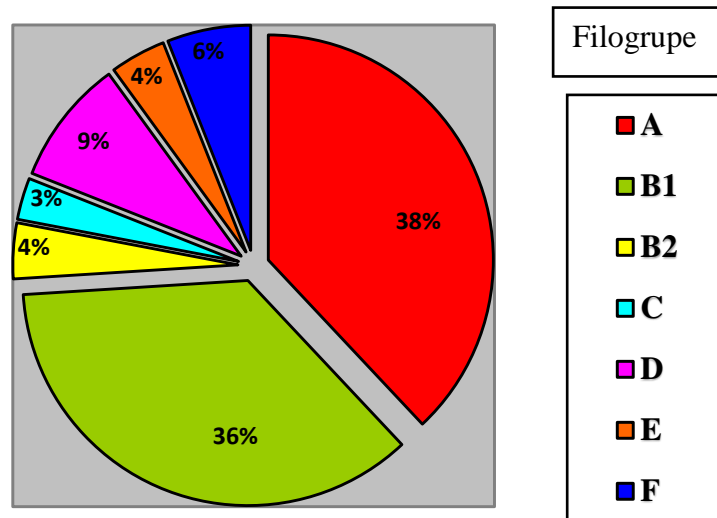
Provedenim istraživanjem ustanovljena je najučestalija patogrupa. S obzirom na dokazane gene koji kodiraju čimbenike virulencije, enteroagregativna *E. coli* (EAEC) s dokazanim *EAST1* (20%) genom najučestalija je patogrupa. Sljedeća po učestalosti je atipična enteropatogena *E. coli* (EPEC) s dokazanim *eae* genom koji kodira intimin (9%). Nakon EPEC slijedi ekstraintestinalna patogena *E. coli* (ExPEC) s dokazanim *cnf1* (6%) i *cnf2* (4%) genima te enterotoksigena *E. coli* (ETEC) s dokazanim *STII* genom (5%). Prisutnost VTEC s dokazanim *vtx1* i *vtx2* genima ustanovljena je za dva (2%) izolata.

U pojedinih izdvojenih sojeva dokazana je prisutnost više od jednog gena za čimbenike virulencije. S obzirom na to da se *E. coli* svrstavaju u patogrupe na osnovi gena specifičnih za patogrupu, prisustvo više gena u pojedinih sojeva znatno otežava podjelu. Primjer jednog takvog je izolat podrijetlom od peradi kojemu je dokazan *eae* gen karakterističan za EPEC i *EAST1* gen karakterističan za EAEC. Isti je slučaj s četirima izolatima podrijetlom od divljači i jednom izolatu podrijetlom od svinje s dokazom *EAST1* gena, karakterističnim za EAEC te *STII* gena, specifičnih za ETEC patogrupu. Prema navedenom, izolati se ne mogu svrstati u samo jednu patogrupu.

Pretraživanjem izolata na prisustvo gena koji kodiraju čimbenike virulencije specifične za patogrupu, prisustvo EIEC patogrupe nije dokazano. Također, nisu dokazani geni *aggR* i *aaiC* specifični za EAEC patogrupu, kao ni prisustvo tipičnog EPEC. Prisustvo ETEC patogrupe dokazano je *STII* genima, dok *STI* i *lt* geni nisu dokazani. Od gena karakterističnih za VTEC patogrupu, prisustvo *saa* gena nije dokazano.

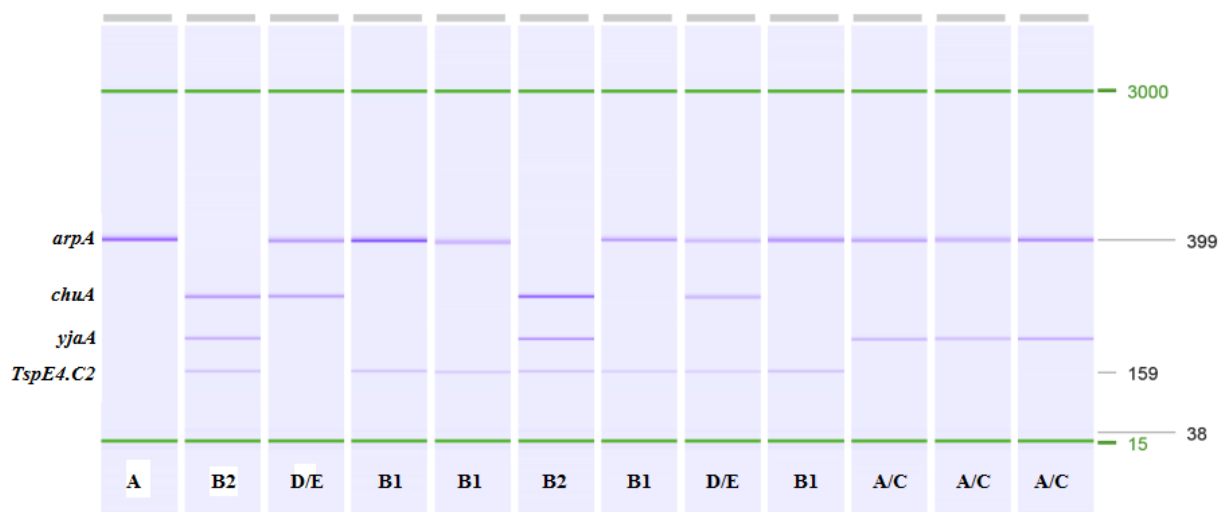
5.5. Molekularne pretrage izolata na filogrupe

Od 100 pretraženih izolata *E. coli*, 38 (38%) svrstano je u filogrupu A, dok je njih 36 (36%) svrstano u filogrupu B1, čime su A i B1 najzastupljenije filogrupe. Nadalje, četiri izolata (4%) svrstana su u filogrupu B2, tri izolata (3%) u filogrupu C, njih devet (9%) u filogrupu D, zatim četiri (4%) u filogrupu E, dok je šest izolata (6%) svrstano u filogrupu F (Dijagram 2.).

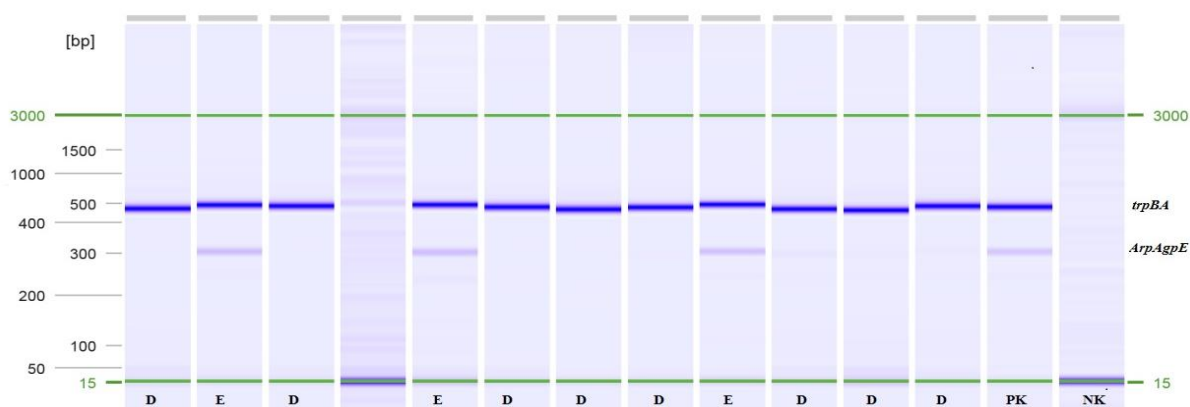


Dijagram 2.: Grafički prikaz raspodjele filogrupa unutar svih izolata

Određivanje pripadnosti filogrupi provedeno je višestrukim PCR-om koristeći četiri para početnica: *arpA*, *chuA*, *yjaA* i *TspE4.C2* (Slika 10.). Prema dobivenim rezultatima, izolat je svrstan u filogrupu ili su provedene dodatne analize kako bi se odredila pripadnost C ili E filogrupi (Slika11.).



Slika 10.: Određivanje pripadnosti izolata filogrupi



PK – pozitivna kontrola; NK – negativna kontrola

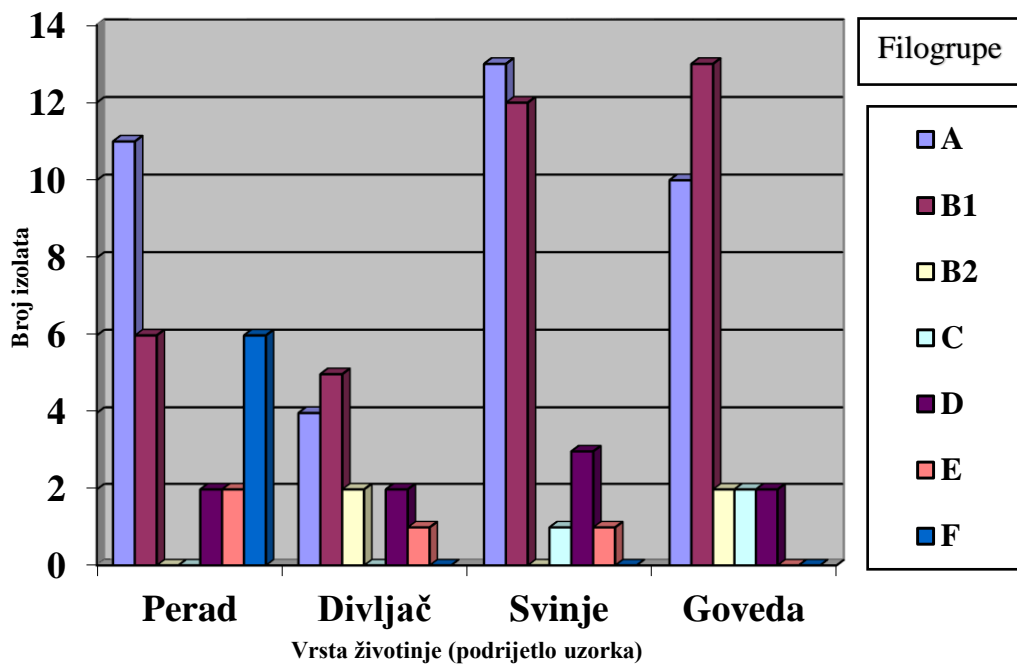
Slika 11.: Određivanje pripadnosti izolata E filogrupi

Pretraženo je 27 izolata podrijetlom od peradi, među kojima je 11 izolata (40,74%) svrstano u filogrupu A, čime je najučestalija u uzorcima podrijetlom od peradi. Nakon potonje, uslijedile su podjednako zastupljene filogrupe B1 (22,22%) i F (22,22%), pri čemu je svaka dokazana u šest izolata. Dva izolata (7,40%) svrstana su u filogrupu D, a preostala dva (7,40%) u filogrupu E. Molekularnim pretragama izdvojenih sojeva nije ustanovljena prisutnost B2, C i I filogrupe. Rezultati su prikazani u Dijagramu 3. i Tablici 10.

Od 14 pretraženih bakterijskih sojeva podrijetlom od divljači, A i B1 filogrupe bile su podjednako zastupljene. Četiri izolata (28,57%) svrstana su u filogrupu A, dok je njih pet (35,71%) svrstano u filogrupu B1. Nadalje, dva izolata (14,29%) pripadala su filogrupi D, dva filogrupi B2 (14,29%) i jedan izolat (7,14%) E filogrupi. Molekularnim pretragama izolata nije ustanovljena prisutnost F, C i I filogrupe. Rezultati su prikazani u Dijagramu 3. i Tablici 10.

Pretraženo je 30 izolata podrijetlom od svinja od kojih je 13 (43,33%) svrstano u filogrupu A i 12 (40%) svrstano u B1 filogrupu, čime su navedene podjednako zastupljene u istraženim izolatima. Od preostalih, tri izdvojena soja (10%) pripala su filogrupi D, a po jedan izolat (3,33%) filogrupi E, odnosno C (3,33%). Molekularnim pretragama izolata nije ustanovljena prisutnost F, B2 i I filogrupe. Rezultati su prikazani u Dijagramu 3. i Tablici 10.

Određivanjem filogrupe za 29 izolata podrijetlom od goveda, njih deset (34,49%) svrstano je u filogrupu A i 13 (44,83%) u filogrupu B1. Ostali rezultati prikazuju jednaku zastupljenost filogrupa B2 (6,90%), C (6,90%) i D (6,90%), čime su po dva izolata svrstana u svaku od navedenih filogrupa. Molekularnim pretraživanjem prisutnost F, E i I filogrupe nije ustanovljena. Rezultati su prikazani u Dijagramu 3. i Tablici 10.



Dijagram 3.: Grafički prikaz raspodjele filogrupa prema podrijetlu izolata

Tablica 10. Rezultati molekularnih pretraga izolata na filogrupe

| Broj uzorka | Vrsta uzoraka | Filogrupa |
|-------------|------------------------|-----------|
| 1 | Pileći trup | E |
| 2 | SOM | F |
| 3 | Pileći trup | B1 |
| 4 | Pileći trup | F |
| 5 | Pileći trup | A |
| 6 | Pileći trup | A |
| 7 | Pileći trup | B1 |
| 8 | Pileći trup | B1 |
| 9 | Pileći trup | A |
| 10 | Pileći trup | D |
| 11 | Pileći trup | A |
| 12 | Pileći trup | F |
| 13 | Pileći trup | A |
| 14 | Pileći trup | A |
| 15 | Pileći trup | D |
| 16 | Pileći trup | F |
| 17 | Pileći trup | A |
| 18 | Pileći trup | F |
| 19 | Pileći trup | A |
| 20 | Pileći trup | A |
| 21 | Pileći trup | B1 |
| 22 | Pileći trup | B1 |
| 23 | Pileći trup | B1 |
| 24 | Strojno otkoštено meso | F |
| 25 | Pileći trup | E |
| 26 | Mesni pripravak | A |
| 27 | Mesni pripravak | A |
| 28 | Jelen obični | B2 |
| 29 | Jelen lopatar | D |
| 30 | Srna | B1 |
| 31 | Jelen obični | B2 |
| 32 | Jelen lopatar | B1 |
| 33 | Srna | D |
| 34 | Divlja svinja | B1 |
| 35 | Jelen obični | A |
| 36 | Jelen lopatar | A |
| 37 | Jelen lopatar | A |
| 38 | Muflon | B1 |
| 39 | Srna | B1 |
| 40 | Divlja svinja | A |
| 41 | Srna | E |
| 42 | Obrisak trupa svinje | B1 |
| 43 | Obrisak trupa svinje | C |
| 44 | Obrisak trupa svinje | A |
| 45 | Obrisak trupa svinje | D |
| 46 | Obrisak trupa svinje | A |
| 47 | Mljeveno meso | B1 |
| 48 | Obrisak trupa svinje | A |
| 49 | Obrisak trupa svinje | D |
| 50 | Obrisak trupa svinje | A |

| | | |
|-----|----------------------|----|
| 51 | Obrisak trupa svinje | B1 |
| 52 | Obrisak trupa svinje | B1 |
| 53 | Mljeveno meso | A |
| 54 | Svinjsko meso | A |
| 55 | Obrisak trupa svinje | A |
| 56 | Obrisak trupa svinje | D |
| 57 | Obrisak trupa svinje | B1 |
| 58 | Obrisak trupa svinje | A |
| 59 | Obrisak trupa svinje | A |
| 60 | Obrisak trupa svinje | B1 |
| 61 | Obrisak trupa svinje | A |
| 62 | Obrisak trupa svinje | A |
| 63 | Obrisak trupa svinje | B1 |
| 64 | Mljeveno meso | E |
| 65 | Mljeveno meso | B1 |
| 66 | Obrisak trupa svinje | B1 |
| 67 | Obrisak trupa svinje | B1 |
| 68 | Obrisak trupa svinje | B1 |
| 69 | Mljeveno meso | A |
| 70 | Mljeveno meso | B1 |
| 71 | Obrisak trupa svinje | A |
| 72 | Govede meso | B1 |
| 73 | Obrisak trupa goveda | A |
| 74 | Govede meso | B2 |
| 75 | Obrisak trupa goveda | A |
| 76 | Obrisak trupa goveda | A |
| 77 | Obrisak trupa goveda | A |
| 78 | Obrisak trupa goveda | A |
| 79 | Govede meso | B1 |
| 80 | Obrisak trupa goveda | B1 |
| 81 | Obrisak trupa goveda | D |
| 82 | Mljeveno meso | B1 |
| 83 | Obrisak trupa goveda | D |
| 84 | Mesni pripravak | B1 |
| 85 | Mljeveno meso | B1 |
| 86 | Obrisak trupa goveda | B1 |
| 87 | Mesni pripravak | C |
| 88 | Mesni pripravak | B1 |
| 89 | Mljeveno meso | A |
| 90 | Juneće meso | B1 |
| 91 | Obrisak trupa goveda | C |
| 92 | Govede meso | B1 |
| 93 | Obrisak trupa goveda | A |
| 94 | Obrisak trupa goveda | B1 |
| 95 | Obrisak trupa goveda | A |
| 96 | Mljeveno meso | B2 |
| 97 | Mljeveno meso | B1 |
| 98 | Obrisak trupa goveda | A |
| 99 | Obrisak trupa goveda | A |
| 100 | Mljeveno meso | B1 |

5.6. Usporedba morfoloških i biokemijskih karakteristika s prisutnošću gena koji kodiraju čimbenike virulencije i pripadnosti filogrupi

Pretraženo je ukupno 15 β -glukuronidaza negativnih izolata, dok je njih 85 bilo β -glukuronidaza pozitivno. Pojedini izolati β -glukuronidaza pozitivnih i β -glukuronidaza negativnih izolata izdvojeni iz mesa peradi podrijetlom su iz istih uzoraka, pri čemu je iz šest uzorka mesa peradi izdvojen po jedan β -glukuronidaza pozitivan i jedan β -glukuronidaza negativan soj.

S obzirom na ukupan broj pretraženih izolata, nisu zamijećene biokemijski značajne razlike između β -glukuronidaza negativnih i pozitivnih izolata izdvojenih iz uzoraka različitog podrijetla. Od varijabilnih biokemijskih svojstava svi β -glukuronidaza negativni izolati iskazali su pozitivnu reakciju za tirozin arilamidazu, alkalizaciju sukcinata i alfa-galaktozidazu.

Najviše β -glukuronidaza negativnih sojeva izdvojeno je iz mesa peradi. Izolati β -glukuronidaza pozitivnih kao i β -glukuronidaza negativnih sojeva podrijetlom od peradi pokazali su podjednake biokemijske reakcije, osim svojstva alkalizacije L-laktata, za koju je devet od deset pretraženih β -glukuronidaza negativnih iskazivalo pozitivnu reakciju, za razliku od osam β -glukuronidaza pozitivnih izolata koji nisu posjedovali navedeno svojstvo.

Dokazivanjem gena za čimbenike virulencije u pet izolata (33,33%) od 15 β -glukuronidaza negativnih, dokazano je prisustvo gena: *eae*, *STII*, *cnf1*, *cnf2* i *EAST1* (tri izolata (60%) podrijetlom od peradi te po jedan izolat (20%) podrijetlom od divljači, odnosno svinje (20%).

Od ukupno 15 β -glukuronidaza negativnih izolata, njih pet (33,33%) svrstano je u filogrupu A, četiri (26,67%) u filogrupu B1, odnosno u filogrupu F te jedan (6,67%) u filogrupu D, odnosno filogrupu E.

Od 27 pretraženih izolata izdvojenih iz mesa peradi, deset (37,04%) su β -glukuronidaza negativni, dok ih je 17 (62,96%) β -glukuronidaza pozitivno. U tri (30%) izolata β -glukuronidaza negativnih sojeva dokazano je prisustvo gena za čimbenike virulencije (*EAST1*, *cnf1*, *cnf2*) te su svrstani u filogrupe A, B1 i F. Od ostalih 17 β -glukuronidaza pozitivnih izolata, u sedam (41,81%) je dokazano prisustvo gena za čimbenike virulencije (*eae* i *EAST1*) te su svrstani u filogrupe A, B1, F i E.

Za β -glukuronidaza pozitivne i β -glukuronidaza negativne izolate izdvojene iz mesa peradi podrijetlom iz istih uzoraka, rezultati pretraga na gene za čimbenike virulencije i

filogrupe pokazuju različitost. Četiri (66,66%) β -glukuronidaza pozitivnih izolata s dokazanim genima za čimbenike virulencije (*eae* i *EAST1*) svrstani su u filogrupu A, dok analizom izolata β -glukuronidaza negativnih bakterijskih sojeva izdvojenih iz istih uzoraka nije dokazana prisutnost gena za čimbenike virulencije, a izolati su svrstani u F i D filogrupe. Iznimku čine dva izolata izdvojena iz istog uzorka mesa peradi, u kojih je onaj β -glukuronidaza negativan posjedovao *EAST1* gen i pripadao filogrupu A, dok za β -glukuronidaza pozitivan izolat nije dokazano prisustvo gena za čimbenike virulencije, a analizom filogrupa svrstan je u filogrupu B1. Iznimku čine dva izolata izdvojena iz istog uzorka mesa peradi kojima nije dokazano prisustvo gena za čimbenike virulencije, a svrstani su u B1 filogrupu. Tablica 11. prikazuje raspodjelu β -glukuronidaza pozitivnih i onih negativnih za sve izolate podrijetlom od peradi, a Tablica 12. prikazuje pojedinačne rezultate β -glukuronidaza pozitivnih izolata naspram onih negativnih s obzirom na prisutnost gena za čimbenike virulencije i pripadnost filogrupu.

Od 14 pretraženih izolata izdvojenih iz mesa divljači, jedan (7,14%) je β -glukuronidaza negativan, dok je ostalih 13 (92,86%) β -glukuronidaza pozitivno. Uz izolat β -glukuronidaza negativnog bakterijskog soja, iz istog uzorka izdvojen je i β -glukuronidaza pozitivan. Daljnjim analizama ustanovljeno je da oba izolata posjeduju *EAST1* i *STII* gene i pripadaju filogrupu A. Od 13 izolata β -glukuronidaza pozitivnih izolata, u njih deset (76,92%) je dokazano prisustvo gena za čimbenike virulencije: *eae*, *hlyA*, *vtx1*, *cnf1*, *cnf2*, *EAST1*. Izolati β -glukuronidaza pozitivnih sojeva svrstani su u filogrupe A, B1, B2, D i E (Tablica 11.).

Pretraženo je ukupno 30 izolata podrijetlom od svinje od kojih su dva (6,66%) β -glukuronidaza negativna. Analizom izolata na gene za čimbenike virulencije u jednom je dokazano prisustvo *EAST1* gena i pripadnost filogrupu A. Drugom izolatu nije dokazano prisustvo pretraživanih gena za čimbenike virulencije, dok je analizom filogrupa svrstan u B1 filogrupu. Od 28 β -glukuronidaza pozitivnih izolata, u njih šest (21,43%) dokazani su geni za čimbenike virulencije: *eae*, *hlyA*, *vtx2*, *cnf1*, *cnf2*, *STII* i *EAST1*. Analizom filogrupa izolati β -glukuronidaza pozitivnih bakterijskih sojeva svrstani su A, B1, C i D filogrupu (Tablica 11.).

Od 29 ukupno pretraženih izolata podrijetlom od goveda, dva (6,90%) su β -glukuronidaza negativni. Molekularnim analizama nije dokazano prisustvo gena za čimbenike virulencije, a pretragom izolata na filogrupe jedan je svrstan u filogrupu A, dok je drugom određena pripadnost B1 filogrupu. Pretragom 27 β -glukuronidaza pozitivnih izolata, u njih osam

(29,63%) dokazano je prisustvo gena za čimbenike virulencije: *eae*, *EAST1*, *cnf1*, *cnf2* i pripadnost filogrupama A, B1, B2, C i D (Tablica 11.).

Tablica 11. Rezultati usporedbe morfološih karakteristika izolata s prisutnošću virulentnih gena i pripadnosti filogrupo

| Podrijetlo izolata | β -glukuronidaza pozitivni (+) i negativni (-) izolati | Prisutnost gena za čimbenike virulencije | Geni za čimbenike virulencije | Filogrupa | Odsutnost gena za čimbenike virulencije | Filogrupa | Ukupan broj pretraženih izolata |
|--------------------|--|--|---|-----------------|---|-----------------|---------------------------------|
| Perad | + | 7 | <i>eae, EAST1</i> | A, B1, F | 10 | A, B1, D, E, F | 17 |
| | - | 3 | <i>EAST1, cnf1, cnf2</i> | A, B1, D, F | 7 | A, B1, E, F | 10 |
| Divljač | + | 10 | <i>eae, hlyA, vtx1, cnf1, cnf2, STII, EAST1</i> | A, B1, B2, D, E | 3 | B1, B2, D | 13 |
| | - | 1 | <i>EAST1, STII</i> | A | 0 | 0 | 1 |
| Svinje | + | 6 | <i>eae, hlyA, vtx2, cnf1, cnf2, STII, EAST1</i> | A, B1, C, D | 22 | A, B1, D, E | 28 |
| | - | 1 | <i>EAST1</i> | A | 1 | B1 | 2 |
| Goveda | + | 8 | <i>eae, cnf1, cnf2, EAST1</i> | A, B1, B2, C, D | 19 | A, B1, B2, C, D | 27 |
| | - | 0 | | 0 | 2 | A, B1 | 2 |

Tablica 12. Morfološke i molekularne karakteristike izolata izdvojenih iz istih uzoraka

| Uzorak | β-glukuronidaza pozitivni (+) i negativni (-) izolati | Gen za čimbenik virulencije | Filogrupa |
|---------------|---|--|------------------|
| I | + | <i>eae</i> | A |
| | - | <i>cnf1, cnf2</i> | F |
| II | + | <i>eae</i> | A |
| | - | - | D |
| III | + | <i>EAST1</i> | A |
| | - | - | F |
| IV | + | - | B1 |
| | - | <i>EAST1</i> | A |
| V | + | <i>eae</i> | A |
| | - | - | F |
| VI | + | - | B1 |
| | - | - | B1 |

5.7. Usporedba biokemijskih karakteristika, prisutnosti gena koji kodiraju čimbenike virulencije, pripadnosti filogrupo i vrsnog podrijetla uzorka

Usporedba biokemijskih karakteristika i prisutnosti gena koji kodiraju čimbenike virulencije ukazuje na povezanost izolata s dokazanim *eae* genom naspram onih kojima navedeni gen nije dokazan s obzirom na biokemijsku karakteristiku alkalizacije sukcinata pri čemu je ustanovljena statistička značajnost. Osim ustanovljene povezanosti navedene reakcije, također je ustanovljena povezanost i statistička značajnost za izolate s dokazanim *cnf1* genom naspram onih u kojima navedeni gen nije dokazan s obzirom na aktivnost enzima arilamidaze prema tirozinu.

Predmetnim istraživanjem najučestalije filogrupe dokazane u svih izolata bile su A (38%) i B1 (36%) te s manjom zastupljenošću: B2 (4%), C (3%), D (9%), E (4%) i F (6%). Od 36 izolata kojima je dokazana prisutnost gena za čimbenike virulencije, njih 14 (38,89%) svrstano je u filogrupu A, dok je 12 izolata (33,33%) svrstano u filogrupu B1, čime su potonje najučestalije, dok je isti broj izolata (5,56%) svrstan u filogrupe B2, C, D, E i F (Dijagram 4.).

Najviše gena za čimbenike virulencije izdvojeno je iz izolata podrijetlom od divljači. Od ukupno 14 pretraženih bakterijskih sojeva, u njih 11 (78,57%) ustanovljena je prisutnost barem jednog gena za čimbenike virulencije. Rezultati analize filogrupo prikazuju one najučestalije u sojeva s dokazanim genima za čimbenike virulencije, pri čemu su četiri (36,36%) svrstana u filogrupu A i četiri (36,36%) u filogrupu B1. Od ostalih, jedan izolat (9,10%) svrstan je u filogrupu B2, jedan (9,10%) u filogrupu D i jednom je bakterijskom izolatu (9,10%) ustanovljena pripadnost filogrupo E (9,10%).

Najučestalija patogrupa ustanovljena u sojevima podrijetlom od divljači je EAEC s dokazanim *EAST1* genom u osam (72,73%) izolata. Od navedenih, tri izolata (37,5%) svrstano je u filogrupu B1, četiri (50%) u filogrupu A i jedan (12,5%) u filogrupu D.

Prisutnost ETEC patogrupe s dokazanim *STII* genom potvrđena je u četiri bakterijska izolata (36,36%) kojima je također dokazano prisustvo *EAST1* gena. Tri izolata (75%) s dokazanim *STII* genom svrstana su u filogrupu A, dok je jedan izolat (25%) pripadao filogrupo B1.

Prisutnost ExPEC patogrupe s dokazanim *cnf1* i *cnf2* genima potvrđena je u jednom izolatu (9,09%) pripadniku filogrupe B2.

Prisutnost EPEC patogrupe s dokazanim *eae* genom dokazana je za jedan soju (9,09%) svrstan u filogrupu B1.

EHEC (VTEC) patogrupa s dokazanim *vtx1* genom ustanovljena je u jednom izolatu (9,09%) koji je svrstan u filogrupu E.

Od ostalih gena za čimbenike virulencije, u jednom soju (9,09%) dokazan je *hlyA*. Istom izolatu dokazan je *EAST1* gen i pripadnost filogrupu B1.

Pretraživanjem ukupno 27 izolata podrijetlom od peradi, za njih deset (37,04%) je dokazano prisustvo barem jednog gena koji kodira čimbenike virulencije. Među njima, rezultati analize filogrupa prikazuju pet (50%) svrstanih u filogrupu A, dva (20%) svrstana u filogrupu B1, dva (20%) izolata kojima je određena pripadnost F filogrupu i jedan (10%) svrstan u E filogrupu. Patogrupa EAEC s dokazanim *EAST1* genom potvrđena je u pet izolata (50%), od kojih su dva (40%) svrstana u filogrupu B1, dva (40%) u filogrupu A i jedan (20%) u filogrupu F.

Patogrupa EPEC s dokazanim *eae* genom dokazana je u pet izolata (50%), od kojih je u jednom izolatu potvrđeno prisustvo *EAST1* gena. Tri izolata (60%) svrstana su u filogrupu A, a preostala dva u filogrupe B1 (20%) i E (20%).

Prisutnost ExPEC patogrupe s dokazanim *cnf1* i *cnf2* genima potvrđeno je u jednom izolatu (10%) koji je svrstan u filogrupu F.

Od ukupno 29 pretraženih izolata podrijetlom od goveda, u njih osam (27,59%) dokazano je prisustvo gena za čimbenike virulencije. Rezultati analize filogrupa prikazuju da je od osam izolata tri (37,5%) svrstano u filogrupu A, tri (37,5%) u filogrupu B1 te po jedan izolat (12,5%) u filogrupu C, odnosno filogrupu B2 (12,5%).

Patogrupa EAEC s dokazanim *EAST1* genom ustanovljena je u četirima izolatima (50%) od kojih su tri (75%) svrstana u filogrupu A i jedan (25%) u filogrupu C.

Patogrupa ExPEC dokazana je u dvama izolatima (25%), pri čemu su u jednom izolatu dokazani *cnf1* i *cnf2* geni i pripadanost filogrupu B1, dok je izolat s dokazanim *cnf1* genom svrstan u filogrupu B2.

Patogrupa EPEC s dokazanim *eae* genom potvrđena je u dvama izolatima (5%) te su oba svrstana u filogrupu B1.

Pretraženo je ukupno 30 izolata izdvojenih iz uzoraka podrijetlom od svinja. Među njima, za sedam (23,33%) je dokazano prisustvo gena za čimbenike virulencije. Rezultati analize filogrupa prikazuju pripadnost dva izolata (28,57%) filogrupu A, njih tri (42,86%) filogrupu B1, jedan izolat (14,29%) filogrupu C i jedan (14,29%) filogrupu D.

Patogrupa EAEC s dokazanim *EAST1* genom ustanovljena je u trima izolatima (42,86%), od kojih su dva (66,67%) svrstana u filogrupu A i jedan (33,33%) u filogrupu B1.

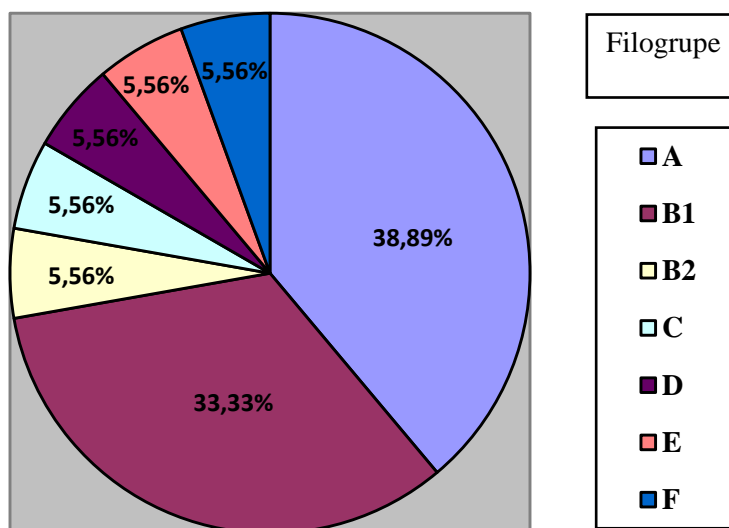
Patogrupa ExPEC dokazana je u dvama izolatima (28,57%), pri čemu su u jednom izolatu dokazani *cnf1* i *cnf2* geni, dok je u drugom dokazan samo *cnf1* gen. Oba izolata svrstana su u B1 filogrupu.

Patogrupa ETEC s dokazanim *STII* genom ustanovljena je u jednom izolatu (14,29%) kojemu je također dokazan *EAST1* gen. Bakterijski izolat je svrstan u B1 filogrupu.

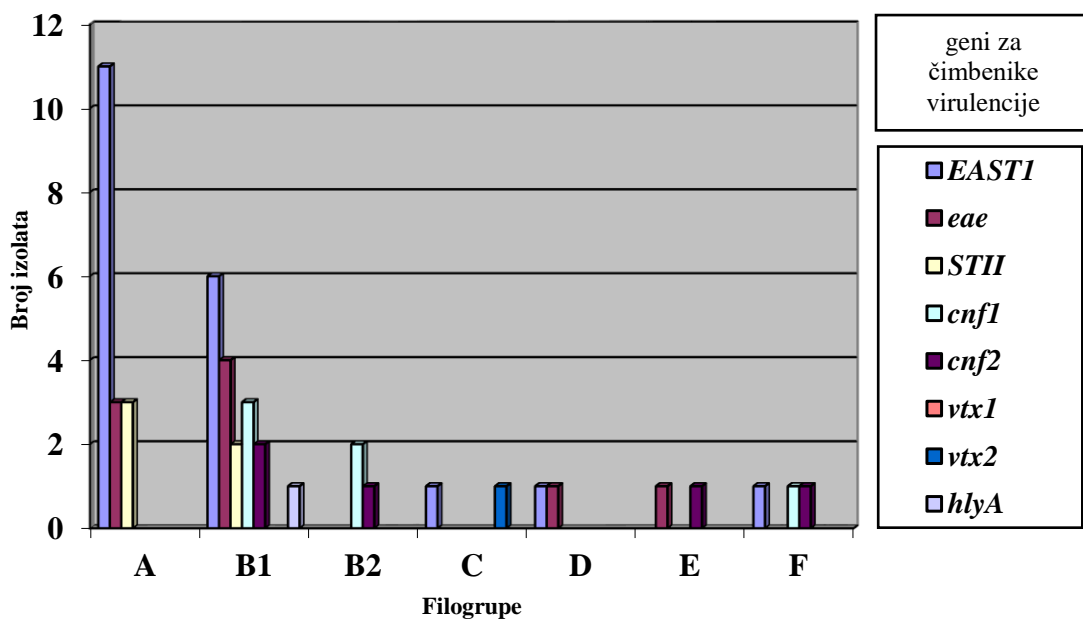
Prisutnost EPEC patogrupe s dokazanim *eae* genom potvrđeno je u jednom izolatu (14,29%) kojemu je također dokazan *hlyA* gen. Izdvojeni soj svrstan je u filogrupu D.

Patogrupa VTEC s dokazanim *vtx2* genom ustanovljena je u jednom izolatu (14,29%) koji je svrstan u C filogrupu.

Raspodjela gena koji kodiraju čimbenike virulencije unutar filogrupa prikazana je u Dijagramu 5., a raspodjela gena za čimbenike virulencije i filogrupe s obzirom na podrijetlo uzorka prikazana je u Tablici 13.



Dijagram 4.: Zastupljenost filogrupa u izolatima kojima su dokazani geni za čimbenike virulencije



Dijagram 5: Raspodjela gena koji kodiraju čimbenike virulencije unutar filogrupa

Tablica 13. Raspodjela gena za čimbenike virulencije i filogrupe s obzirom na podrijetlo uzorka

| Podrijetlo uzorka | Gen za čimbenik virulencije i postotak učestalosti u pretraženih izolata | Filogrupa i postotak učestalosti u pretraženih izolata |
|-------------------|--|--|
| Perad | <i>eae</i> (50%) | A (60%), B1 (20%), E (20%) |
| | <i>EAST1</i> (50%) | A (40%), B1 (40%), F (20%) |
| | <i>cnf1, cnf2</i> (10%) | F |
| Divljač | <i>eae</i> (9,09%) | B1 |
| | <i>EAST1</i> (72,73%) | A (50%), B1 (37,5%), D (12,5%) |
| | <i>cnf1, cnf2</i> (9,09%) | B2 |
| | <i>STII</i> (36,36%) | A (75%), B1 (25%) |
| | <i>vtx1</i> (9,09%) | E |
| | <i>hlyA</i> (9,09%) | B1 |
| Svinje | <i>eae</i> (14,29%) | D |
| | <i>EAST1</i> (42,86%) | A (66,67%), B1 (33,33%) |
| | <i>cnf1, cnf2</i> (14,29%) | B1 |
| | <i>cnf1</i> (14,29%) | B1 |
| | <i>STII</i> (14,29%) | B1 |
| | <i>vtx2</i> (14,29%) | C |
| | <i>hlyA</i> (14,29%) | D |
| Goveda | <i>eae</i> (25%) | B1 |
| | <i>EAST1</i> (50%) | A (75%), C (25%) |
| | <i>cnf1, cnf2</i> (12,5%) | B1 |
| | <i>cnf1</i> (12,5%) | B2 |

5.8. Statistička obrada podataka

Pojedini izolati u ovom istraživanju izdvojeni su iz istog uzoraka (12 izolata izdvojenih iz šest trupova peradi – po dva izolata iz svakog uzorka i dva izolata izdvojena iz mesa divljači), zbog pretraživanja morfološki različitih bakterijskih sojeva. Daljnjim molekularnim analizama ustanovljeno je da se izolati izdvojeni iz mesa peradi razlikuju prema filogrupi i prisustvu gena za čimbenike virulencije, dok su izolati izdvojeni iz mesa divljači pripadali istim filogrupama i posjedovali iste virulentne faktore. Zbog morfološke različitosti navedenih izolata, statistička obrada rezultata određivala se prema broju pretraženih bakterijskih izolata, a ne broju uzoraka uključenih u istraživanje.

Najveći broj izolata nije pokazivao značajnost s obzirom na ustanovljene biokemijske karakteristike i njihovu povezanost s drugim ispitanim parametrima.

Statistička značajnost uočena je za izolate kojima je dokazano prisustvo *eae* gena u odnosu na one kojima nije dokazano prisustvo navedenog gena prema sposobnosti alkalizacije sukcinata ($p=0.045$) (Tablica 14.).

Tablica 14. Povezanost među izolatima koji posjeduju *eae* gen u odnosu na sposobnost alkalizacije sukcinata

| Gen za čimbenik virulencije | Alkalizacija sukcinata | | p |
|-----------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------|
| | Broj izolata u kojih nije prisutna | Broj izolata u kojih je prisutna | |
| <i>eae</i> | Odsutnost | 11 | 0.045 |
| | Prisutnost | 5 | |
| Ukupno | | 16 | 61 |

Statistička značajnost uočena je i za izolate kojima je dokazano prisustvo *cnfI* gena prema onima bez navedenog gena u odnosu na aktivnost enzima arilamidaze prema tirozinu (Tablica 15.).

Tablica 15. Povezanost među izolatima koji posjeduju *cnfI* gen u odnosu na aktivnost enzima arilamidaze prema tirozinu

| Gen za čimbenik virulencije | Arilamidaza tirozina | | P |
|-----------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------|
| | Broj izolata u kojih nije prisutna | Broj izolata u kojih je prisutna | |
| <i>cnfI</i> | Odsutnost | 13 | 0.007 |
| | Prisutnost | 5 | |
| Ukupno | | 18 | 61 |

Prisutnost barem jednog od pretraženih gena ustanovljena je u 36 (36%) od 100 pretraženih izolata *E. coli*. Pojavnost pretraženih gena statistički je povezana s podrijetlom uzorka ($p=0.004$). Izolati s najviše potvrđenih gena za čimbenike virulencije podrijetlom su iz divljači, pri čemu je u 11 (78,57%) od 14 pretraženih izolata dokazano prisustvo barem jednog gena (Tablica 16.).

Od ukupno 27 izolata izdvojenih iz uzoraka podrijetlom od peradi, u njih deset (37,04%) dokazano je prisustvo barem jednog gena koji kodira čimbenike virulencije. Pretraženo je ukupno 30 izolata izdvojenih iz uzoraka podrijetlom od svinja, od kojih je u sedam (23,33%) dokazano prisustvo barem jednog gena, dok je u osam (27,59%) od 29 ukupno pretraženih uzoraka podrijetlom od goveda dokazano prisustvo barem jednog gena odgovornog za kodiranje čimbenika virulencije.

Tablica 16. Učestalost pojavljivanja gena za čimbenike virulencije prema podrijetlu uzorka

| Podrijetlo uzorka | Ukupan broj uzoraka | Geni za čimbenike virulencije | | p |
|-------------------|---------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------|
| | | Broj izolata u kojih nisu prisutni | Broj izolata u kojih su prisutni | |
| Perad | 27 | 17 | 10 | 0.004 |
| Divljač | 14 | 3 | 11 | |
| Svinje | 30 | 23 | 7 | |
| Goveda | 29 | 21 | 8 | |
| Ukupno | 100 | 64 | 36 | |

U pojedinim izolatima istovremeno su dokazana najviše dva gena za čimbenike virulencije. Najveća učestalost prisutnosti dvaju gena opažena je u izolatima izdvojenim iz mesa divljači. Opažene razlike u učestalosti pojavljivanja gena statistički su značajne u odnosu na vrstu uzorka iz kojeg je *E. coli* izdvojena ($p=0.003$) (Tablica 17.).

Tablica 17. Broj dokazanih gena za čimbenike virulencije prema podrijetlu uzorka

| Podrijetlo uzorka | Broj ustanovljenih gena u pretraženim uzorcima | | | p |
|-------------------|--|-----------|----------|-------|
| | Odsutnost | Jedan gen | Dva gena | |
| Perad | 17 | 8 | 2 | 0.003 |
| Divljač | 3 | 5 | 6 | |
| Svinja | 23 | 4 | 3 | |
| Govedo | 21 | 7 | 1 | |
| Ukupno | 64 | 24 | 12 | |

Najviše izolata svrstano je u filogrupe A i B1 te s manjom učestalosti u ostale filogrupe. Statističkom obradom podataka zamjetna je statistička povezanost pripadnosti filogrupo s podrijetlom uzorka iz kojeg je izolat izdvojen ($p=0.039$) (Tablica 18.).

Tablica 18. Pripadnost izolata filogrupama prema podrijetlu uzorka

| Podrijetlo uzorka | Filogrupo | | | | | | | Ukupnan broj izolata |
|-------------------|-----------|----|----|---|---|---|---|----------------------|
| | A | B1 | B2 | C | D | E | F | |
| Perad | 11 | 6 | 0 | 0 | 2 | 2 | 6 | 27 |
| Divljač | 4 | 5 | 2 | 0 | 2 | 1 | 0 | 14 |
| Svinja | 13 | 12 | 0 | 1 | 3 | 1 | 0 | 30 |
| Govedo | 10 | 13 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 29 |
| Ukupno | 38 | 36 | 4 | 3 | 9 | 4 | 6 | 100 |
| p | 0.039 | | | | | | | |

Opažene razlike u prisustvu gena za čimbenike virulencije u pojedinim filogrupa bakterije *E.coli* nisu statistički značajne ($p=0.833$) (Tablica 19.).

Tablica 19. Povezanost filogrupa i gena za čimbenike virulencije

| Filogrupa | Geni za čimbenike virulencije | | Ukupan broj izolata | p |
|-----------|------------------------------------|----------------------------------|---------------------|-------|
| | Broj izolata u kojih nisu prisutni | Broj izolata u kojih su prisutni | | |
| A | 24 | 14 | 38 | |
| B1 | 24 | 12 | 36 | |
| B2 | 2 | 2 | 4 | |
| C | 1 | 2 | 3 | 0.833 |
| D | 7 | 2 | 9 | |
| E | 2 | 2 | 4 | |
| F | 4 | 2 | 6 | |

6. RASPRAVA

U ovoj raspravi obrazloženi su rezultati biokemijskih i molekularnih analiza provedenih na izolatima *E. coli* izdvojenih iz mesa i obrisaka trupova podrijetlom od različitih vrsta životinja. Uspoređeni su rezultati ovog istraživanja i rezultati dosadašnjih spoznaja te statistička značajnost dobivenih podataka.

S obzirom na biokemijska svojstva bakterije *E. coli*, ovo istraživanje navodi jedno od najznačajnijih, a to je sposobnost stvaranja β -glukuronidaze. Predmetnim istraživanjem svojstvo proizvodnje enzima β -glukuronidaze dokazano je u 85 od 100 pretraženih izolata, dok je njih 15 bilo β -glukuronidaza negativno. Znatno manja učestalost izdvajanja β -glukuronidaza negativnih sojeva uobičajena je jer približno 97% sojeva *E. coli* posjeduje navedenu karakteristiku, dok je svega 3–4% pripadnika ove vrste β -glukuronidaza negativno (KILIAN i BÜLOW, 1976.; RICE i sur., 1990.). Od pretraženih 15 β -glukuronidaza negativnih izolata, deset je bilo podrijetlom od peradi, jedan podrijetlom od divljači, te dva podrijetlom iz svinja, odnosno goveda. Od 15 izolata, u njih pet (33,33%) dokazano je prisustvo gena za čimbenike virulencije, dok je većina gena dokazana u β -glukuronidaza pozitivnih izolata. Pojedini bakterijski izolati β -glukuronidaza pozitivnih i onih negativnih izdvojeni su iz istih uzoraka (životinja) (njih ukupno 12 izolata iz šest uzoraka peradi i dva izolata iz jednog uzorka divljači). Zanimljivo je da su izolati podrijetlom od peradi izdvojeni iz istih životinja – pet β -glukuronidaza pozitivnih i pet β -glukuronidaza negativnih sojeva – molekularnim pretragama na gene za čimbenike virulencije i filogrupe pokazivali različitu pripadnost filogrupoj te prisutnost ili odsutnost patogrupe (Tablica 12.). Iznimke čine dva izolata (jedan iz uzorka peradskog podrijetla i jedan iz uzorka mesa divljači), za koje je dokazana pripadnost istim filogrupama te isti virulentni profil. Bakterija *E. coli* posjeduje raznolika svojstva unutar različitih sojeva, stoga ih u jednom uzorku može biti prisutno više koji se razlikuju prema morfološkim karakteristikama, virulentnosti i filogrupoj.

Prilikom izdvajanja β -glukuronidaza negativnih sojeva postavlja se sumnja na patogenost izolata i prisutnost VTEC serogrupe O157, s obzirom na to da je izostanak aktivnosti β -glukuronidaze za istu karakterističan. Rezultatima ovog istraživanja nije ustanovljena prisutnost VTEC u β -glukuronidaza negativnih izolata te je većina gena za čimbenike virulencije dokazana u onih β -glukuronidaza pozitivnih, među kojima su i dva VTEC izolata. Potonje se slaže s rezultatima istraživanja VERHAGEN i sur. (2015.) koji prikazuju aktivnost

β -glukuronidaze u 39 VTEC izolata, dva EPEC izolata i četiri izolata komenzalnih *E. coli*, izdvojenih iz kravljeg mlijeka, izmeta goveda i ljudi te obrisaka trupova goveda.

Prema navedenom, nedostatak aktivnosti enzima β -glukuronidaze ne smatra se smjernicom za određivanje patogenosti izolata.

Pored aktivnosti β -glukuronidaze, bakterija *E. coli* posjeduje brojne druge biokemijske karakteristike. Ovim istraživanjem izolati su biokemijski karakterizirani VITEK2 sustavom koji koristi 47 reakcija prilikom identifikacije izolata. Rezultatima dobivenim usporedbom biokemijskih karakteristika, zamjetno je kako su izolati *E. coli* biokemijski vrlo slični i bez značajnih razlika. Usporedbom rezultata biokemijske karakterizacije s onima molekularnih pretraga na gene za čimbenike virulencije, povezanost kod većine izolata nije uočena. Iznimku čine izolati kojima je molekularnim metodama dokazano prisustvo *eae* gena i pripadnost EPEC patogrupi, a s obzirom na biokemijsku karakteristiku alkalizacije sukcinata. Statistička značajnost ($p=0.045$) dovodi u vezu izostanak biokemijske reakcije i prisutnosti *eae* gena. Slično je primijećeno u izolata s dokazanim *cnfI* genom, kojima je dokazana pripadnost ExPEC patogrupi, s obzirom na izostanak reakcije enzima arilamidaze prema tirozinu, čemu je određena statistička značajnost od $p=0.007$.

Prijašnje spoznaje vezane uz biokemijske karakteristike alkalizacije sukcinata i arilamidaze prema tirozinu te njihove povezanosti s genima za čimbenike virulencije *eae* i *cnfI* nisu pronađene.

Dobiveni rezultati upućuju na to da se izostanak reakcija alkalizacije sukcinata i arilamidaze tirozina može dovesti u vezu s prisutnošću *eae* i *cnfI* gena za čimbenike virulencije, ali s obzirom na mali broj ostvarenih rezultata, takav zaključak je upitan.

U svrhu određivanja učestalosti patogrupa *E. coli* na području Republike Hrvatske, korištene su molekularne metode dokazivanja gena specifičnih za patogrupe. Na temelju prisustva gena za čimbenike virulencije i kliničkih simptoma, patogene *E. coli* možemo podijeliti na sedam glavnih patogrupa (v. Poglavlje 2.2.). Ovim istraživanjem dokazane su sljedeće patogrupe: EAEC, EPEC, ETEC, ExPEC i EHEC (VTEC). Od ostalih pretraženih patogrupa, s obzirom na posjedovanje gena specifičnih za patogrupu, nije dokazana prisutnost EIEC patogrupe.

Provedenim istraživanjem EAEC, s dokazanim *EASTI* genom, ustanovljena je kao najučestalija patogrupa s udjelom 20% od ukupnog broja pretraženih izolata. Od 20 izolata s dokazanim *EASTI* genom, njih osam (40%) je izdvojeno iz uzoraka mesa divljači, pet (25%)

iz uzoraka peradi, tri (15%) podrijetlom od svinja te četiri izolata (20%) podrijetlom od goveda (Tablica 9.). Prema navedenom, zamjetna je prisutnost *EAST1* gena u svih uzoraka neovisno o podrijetlu, što je podudarno s rezultatima drugih istraživanja, kao primjerice BALDY-CHUDZIK (2008.), koji prikazuju u uzorcima izmeta prikupljenih od različitih vrsta životinja u zoološkom vrtu dokaz gena za kodiranje termostabilnog enterotoksina EAST1 u mesoždera, sveždera i biljoždera, ali s manjom učestalošću od prikazane ovim istraživanjem. VEILLEUX i DUBREUIL (2006.) također navode prisustvo gena koji kodira EAST1 u raznih vrsta životinja, a prvenstveno krava i svinja. Osim u izmetu životinja, nalaz EAST1 čest je u proizvodima životinjskog podrijetla, kao što je opisano istraživanjem TOSHIMA i sur. (2004.). Istraživači prikazuju veću učestalost (29,6%) gena koji kodira EAST1 u analiziranim proizvodima, nego što je prikazano u ovom istraživanju. Iako je često izdvojen iz proizvoda životinjskog podrijetla, patogeni potencijal EAST1 ostaje upitan te je prilikom određivanja patogenosti potrebno odrediti druge osobitosti izolata, kao što su serotip, kolonizacijski faktori i drugi virulentni geni. Uspoređujući sojeve koji posjeduju EAST1 izdvojene iz hrane s onima izdvojenim iz izmeta ljudi s proljevom, TOSHIMA i sur. (2004.) navode da pojedini sojevi posjeduju iste karakteristike u odnosu na adhezivna svojstva i prisutnost virulentnih gena.

Kako bi se prikazao patogeni potencijal EAST1, opisan je slučaj epidemije povezan s navedenim enterotoksinom u Japanu, gdje se u 2697 školske i predškolske djece pojavio jaki proljev. Iako izvor infekcije nije otkriven, jedina zajednička poveznica je hrana kuhana u istoj kuhinji. Analizom uzorka izmeta 30-ero djece, u njih 12 izdvojeno je 27 sojeva. Svi sojevi pripadali su istom serotipu, tvorili agregativnu adherenciju na Hep-2 stanicama i posjedovali gen koji kodira EAST1. Budući da prisutnost drugih patogenih bakterija nije dokazana, istraživači su zaključili kako je EAEC odgovoran za izbijanje epidemije (ITOH i sur., 1997.). Prema rezultatima ovog istraživanja, gen koji kodira EAST1 prisutan je u izolatima različitog podrijetla, što znači da je široko rasprostranjen, a s obzirom na navedeni slučaj moguć je zoonotski potencijal izolata izdvojenih ovim istraživanjem.

Iako je gen koji kodira EAST1 toksin karakterističan za EAEC patogrupu, također je dokazan u drugim patogrupa poput EPEC, ETEC i EHEC. Navedeno potvrđuju MÉNARD i DUBREUIL (2002.) koji navode brojna istraživanja provedena na izolatima ljudskog i životinjskog podrijetla prema kojima EAST1 nije ograničen na EAEC patogrupu.

Činjenica da u izolatima s dokazanim *EASTI* genom tijekom istraživanja nisu ustanovljeni *aggR* i *aaiC* geni, specifični za EAEC patogrupu, dodatno je otežana podjela, a pojedinim sojevima nije bilo moguće sa sigurnošću ustanoviti pripadnost patogrupi.

Također, moguća je pripadnost izolata takozvanim „atipičnim“ sojevima EAEC, jer prema ORDEN i sur. (2017.), „tipični“ sojevi EAEC posjeduju *pAA* plazmid ili barem *aggR* gen, dok „atipični“ sojevi ne posjeduju niti jedan, iako prijanjaju na crijevnu stijenku na isti način. U njihovu istraživanju, na gene za čimbenike virulencije *aat*, *aap* i *aggR*, pretraženo je 920 izolata izdvojenih iz uzoraka izmeta preživača (goveda, koze, ovce). Rezultati prikazuju odsustvo svih analiziranih gena i time EAEC patogrupe. Slične rezultate dobili su CASSAR i sur. (2004.) analizom sojeva izdvojenih iz izmeta krava, ovaca i svinja u kojima, koristeći *pAA* gen, nisu dokazali prisustvo EAEC patogrupe te WIELER i sur. (2011.) koji pretragom izolata izmeta goveda nisu dokazali prisustvo *pAA*, *aggR* i *astA* gena. WIELER i sur. (2011.) također navode da su navedeni geni i EAEC patogrupa prilagođenije ljudima, a prema JENSEN i sur. (2014.) EAEC patogrupa rijetko je izdvojena iz životinja.

Prema navedenom, nepostojanost *aggR* i *aaiC* gena (ovisnog o *aggR*-u) u sojeva pretraženih ovim istraživanjem može se obrazložiti činjenicom da su rijetko prisutni u životinja i da se trenutno čovjek smatra jedinim rezervoarom EAEC patogrupe.

ETEC patogrupa s dokazanim *STII* virulentnim genom dokazana je u 5% od ukupnog broja pretraženih izolata. Od ukupno pet izolata s dokazanim *STII* genom, njih četiri (80%) je dokazano u uzorcima podrijetlom od divljači, a jedan (20%) je bio podrijetlom od svinja (Tablica 9.). ETEC patogrupa proizvodi dva tipa toksina: termolabilni (LT), za kojeg geni nisu dokazani ovim istraživanjem, i termostabilni (ST), koji se dijeli na STI (Sta) i STII (STb). Gen za čimbenik virulencije *STI* također nije dokazan, no provedenim molekularnim pretraživanjem dokazana je prisutnost *STII* gena. S obzirom na to da je *STI* gen uglavnom prisutan u sojeva ljudskog podrijetla, za razliku od *STII* koji je pretežito životinjskog podrijetla (QUADRI i sur., 2005b.; BÖLIN i sur., 2006.), nije neuobičajeno da njegova prisutnost u pretraženih izolata nije dokazana.

Provedenim istraživanjem dokazano je prisustvo *STII* gena u sojeva podrijetlom od divljači i svinja, što je podudarno s rezultatima drugih istraživanja koji navode prisutnost *STII* gena uglavnom u sojeva ETEC izdvojenih iz izmeta sisajuće prasadi s proljevom te sporadičnih slučajeva proljeva u ljudi, teladi i peradi (SEARS i KAPER, 1996; CASEY i sur., 1998; NAGY i FEKETE, 1999.). Prema podacima iz literature, prisutnost ove patogrupe dokazana je također u divljih životinja i goveda (RAVINDRAN i VISWANATHAN, 2015.).

OKAMOTO i sur. (1993.) proučavali su povezanost izolata koji posjeduju *STII* gene s pojavom proljeva u ljudi. U svom istraživanju navode učestalost ETEC, s dokazanim *STII* genima, u rasponu od 70–90% kod sisajuće prasadi, dok je izdvajanje *E. coli* koja proizvodi *STII* bilo iznimno u ljudi. Prema očekivanom, dokazali su prisustvo *STII* gena u 3 (0,75%) od 400 pretraženih izolata izdvojenih iz izmeta pacijenata oboljelih od „putničkog proljeva“. Također, opisuju *E. coli* koja proizvodi *STII* kao mogućeg povremenog uzročnika proljeva u ljudi, ali i napominju potrebu daljnjih epidemioloških istraživanja za dokaz takve tvrdnje. Slično izlažu LORTIE i sur. (1991.) nalazom *STII* gena u dva (4,08%) od 49 izolata *E. coli* izdvojena iz izmeta ljudi s proljevom. Kako daljnjim analizama istraživači nisu ustanovili prisutnost životinjskih i ljudskih antigenih kolonizacijskih faktora, a izolati su serotipizacijom svrstani u serogrupu O7, koju se ne povezuje s pojavom proljeva, zaključili su da uloga *STII* u izolatima izdvojenim iz ljudi nije jasna.

Usporedbom opisanih literaturnih podataka i rezultata ostvarenih predmetnim radom, za predviđanje zoonotskog potencijala sojeva sa *STII* genima izdvojenih iz uzoraka životinjskog podrijetla potrebna su daljnja istraživanja.

EPEC patogrupa s dokazanim *eae* virulentnim genom bila je zastupljena u 9% od ukupnog broja pretraženih izolata. S obzirom na to da je pretraživanjem izolata dokazan samo *eae* gen, bez ustanovljenog prisustva *bfp* gena, nije dokazana tipična već atipična EPEC. Nepostojanje ovog gena razumljivo je s obzirom na činjenicu da su ljudi jedini rezervoar tipične EPEC (TRABULSI i sur., 2002.).

Od ukupno devet izolata s dokazanim *eae* genom, njih pet (5,56%) bili su podrijetlom iz uzoraka peradi, dva (22,22%) podrijetlom od goveda te po jedan izolat (11,11%) podrijetlom iz uzorka svinje, odnosno divljači (Tablica 9.). Dosadašnja istraživanja navode ljude i životinje kao rezervoar atipične EPEC (TRABULSI i sur., 2002.; MOURA i sur., 2009.) te njezinu rasprostranjenost unutar brojnih životinjskih vrsta, što prikazuju i rezultati ovog istraživanja. Rasprostranjenost atipične EPEC među različitim vrstama životinja prikazuju i rezultati istraživanja KAGAMBÈGA i sur. (2012.) nalazom 172 (24%) EPEC u ukupno 704 pretražena izolata izmeta, od koji je 25 izdvojeno iz goveda, 131 iz peradi i 172 iz svinja. Dokaz atipične EPEC u peradi potvrdili su FAROOQ i sur. (2009.) analizom 212 uzoraka izmeta podrijetlom od pilića, pataka i golubova te prikazali prisutnost atipične EPEC u 33 (15,56%) uzorka. Postupkom serološke tipizacije NZOUANKEU i sur. (2010.) ustanovili su prisustvo EPEC u 17 (11,3%) od ukupno 150 pretraženih uzoraka mesa peradi, čime je dokaz

EPEC učešćaliji u potonje navedenim istraživanjima nego u predmetnom istraživanju. Rezultati ovog istraživanja prikazuju također prisustvo atipične EPEC u izolatima podrijetlom od goveda, dok rezultati istraživanja WANG i sur. (2013.) opisuju goveda kao važan izvor infekcije EPEC za ljude.

Nalaz EPEC u uzorcima različitog životinjskog podrijetla važan je, kao i kod drugih patogrupa, pri određivanju rezervoara infekcije. Kao prilog tome može se navesti istraživanje MOURA i sur. (2009.) koji na temelju čimbenika virulencije i klonalne sličnosti između izolata ljudskog i životinjskog podrijetla ukazuju na njihovu povezanost i sposobnost izolata životinjskog podrijetla da uzrokuju proljev u ljudi. S obzirom na navedeno, moguće je pretpostaviti zoonotski potencijal izolata uključenih u ovo istraživanje.

Jedna od najznačajniji patogrupa je VTEC (EHEC), također dokazana predmetnim istraživanjem u 2% od ukupnog broja pretraženih izolata. Dosadašnja istraživanja navode goveda kao primarni rezervor i izvor VTEC, ali i mogućnost drugih preživača (koze i ovce) i drugih životinjskih vrsta kao asimptomatskih nosioca (BALJER i WIELER, 1999.; GYLES, 2007.). Rezultati rada SAMADPOUR i sur. (1994.) potvrđuju prijašnja istraživanja te prikazuju visok postotak verotoksigene *E. coli* u uzorcima goveđeg (23%), svinjskog (4%), janječeg (48%), telećeg (63%), pilećeg (12%), purećeg (7%) i mesa riba (10%) te školjkašima (5%).

Ovim istraživanjem prisustvo VTEC nije ustanovljeno u 29 sojeva (29%) izdvojenih iz uzoraka podrijetlom od goveda, ali je dokazana u jednom izolatu podrijetlom od divljači (1%) i jednom (1%) podrijetlom od svinje.

Gen za čimbenik virulencije *vtx1* dokazan je u izolatu podrijetlom od divljači (srneće meso), što potvrđuje prijašnja istraživanja prema kojima su divlji preživači rezervoari VTEC, a divlje svinje potencijalni izvor infekcije za ljude i farmske životinje (BARDIAU i sur., 2010.; GARCÍA-SÁNCHEZ i sur., 2007.; SÁNCHEZ i sur., 2010.). Ovim istraživanjem dokazano je prisustvo VTEC u jednom (7,14%) od ukupno 14 pretraženih izolata podrijetlom od divljači, što je malen broj u odnosu na istraživanje OBWEGESER i sur. (2012.) koji su dokazali prisustvo *vtx* gena u 56 od ukupno 239 uzoraka izmeta izdvojenih iz divljih preživača s prevalencijom od 44,6% za *vtx2* grupu, 30,4% za *vtx1* grupu i 21,4% za sojeve koji su posjedovali obje grupe. Mali broj pozitivnih izolata ostvaren ovim istraživanjem može se objasniti činjenicom da je pretraživanje provedeno na uzorcima hrane različitih životinjskih vrsta, ali i kategorija uzorka.

Gen za čimbenik virulencije *vtx2* izdvojen je iz obriska trupa svinje, te je tipizacijom ustanovljena njegova pripadnost podtipu *vtx2e*. Ovim istraživanjem je prisustvo VTEC dokazano u jednom (3,33%) od 30 pretraženih izolata, što je mala učestalost s obzirom na istraživanje BOUVET i sur. (2002.) koji su dokazali prisutnost *vtx* gena u obriscima trupova svinja i uzorcima svinjskog mesa u 328 (15%) od ukupno 2146 pretraženih uzoraka. Istraživanje BOTTELDOORN i sur. (2001.) također navodi prisustvo VTEC u 54 (18,69%) od ukupno 289 pretraženih uzoraka izmeta svinja, a daljnom tipizacijom ustanovljeno je da 31 izolat (24,07%) pripada podtipu *vtx2e*, kao i izolat izdvojen u ovom istraživanju. Prema MAINIL (2013.), dokaz *vtx2e* kod svinja najčešće se povezuje s pojavom edemske bolesti, dok je u ljudi nalaz *vtx2e* najčešći u pacijenata s nekomplikiranim proljevom i u asimptomatskih nosioca (ISHII i sur., 2007.). Prema opisanom, može se pretpostaviti kako je prisustvo *vtx2e* ostvareno ovim istraživanjem povezano s edemskom bolesti svinja, te da izolat može biti uzročnik proljeva u ljudi, ali ne i HUS-a.

Prisustvo ExPEC patogrupe ustanovljeno je dokazom *cnf1* i *cnf2* gena za čimbenike virulencije te čini 6% od ukupnog broja pretraženih izolata. Prevalencija od 6% visoka je u usporedbi s istraživanjem TRKOV i sur. (2014.) koji u 84 *E. coli* izdvojene iz raznih uzoraka hrane (sirovo meso, riblja jela, šunka, salate i dr.) nisu dokazali prisutnost *cnf* gena. Usporedba s rezultatima istraživanja MARTINS i sur. (2011.), tijekom kojeg je prisustvo *cnf2* gena dokazano u pet (7,81%) od 64 sojeva izdvojenih iz sira, ukazuje na učestalost približnu ostvarenoj predmetnim istraživanjem. Nadalje, ovim istraživanjem dokazano je prisustvo *cnf1* i *cnf2* gena u izolatima podrijetlom iz uzoraka mesa peradi, divljači, goveda i prasadi, što je djelomično podudarno s rezultatima DUFFY (2011.), prema kojima je *cnf1* dokazan kao uzročnik bolesti u ljudi, svinja, goveda, konja i pasa, dok je *cnf2* vezan uz preživače.

Rezultati provedenog istraživanja prikazuju nalaz ExPEC u izolatima različitog životinjskog podrijetla, koje također uzrokuju razna oboljenja u životinja i na taj način predstavljaju potencijalni izvor infekcije za ljude. Jedan od primjera je kolibaciloza uzrokovana ptičjom patogenom *E. coli*, zbog koje peradarska industrija trpi znatne gubitke (do 20% uginuća u jatu), dok kod odraslih svinja ExPEC može biti uzročnik uginuća (BÉLANGERN i sur., 2011.). U goveda, osim što su uzročnici upala mokraćnog sustava, ExPEC su važan uzrok mastitisa, koji, osim ekonomskih gubitaka, može uzrokovati perakutno uginuće. Za razliku od svinja i peradi, nije dokazana povezanost između izolata koji uzrokuju mastitis u goveda i onih koji uzrokuju oboljenja u ljudi (BÉLANGERN i sur., 2011.). Rezultati brojnih istraživanja (JOHNSON i sur. 2003b., JOHNSON i sur., 2005.; JAKOBSEN i sur., 2010.;

VINCENT i sur., 2010.) virulentnih i genetskih profila izolata izdvojenih iz mesa peradi i svinja te njihovom usporedbom s kliničkim izolatima ExPEC podrijetlom od ljudi, pokazuju da su izolati isti ili slični, što ukazuje na to da bi svinje i perad mogle biti izvor infekcije za ljude. U ovom istraživanju, između ostalog, dokazano je prisustvo ExPEC u izolatu podrijetlom od peradi i svinja, no za procjenu njihova zoonotskog potencijala potrebno je pretraživanje izolata na prisutnost drugih gena povezanih s ExPEC te njihova usporedba s izolatima ljudskog podrijetla. JAKOBSEN i sur. (2009.) navode kako sojevi ExPEC mogu uzrokovati infekciju u čovjeka te opisuju hranu životinjskog podrijetla kao mogući izvor infekcije, dok SINGER (2015.) navodi da mogućnost prijenosa ExPEC iz hrane životinjskog podrijetla postoji putem nedovoljno termički obrađenog mesa.

Od ostalih gena za čimbenike virulencije, u dvama izolatima dokazana je prisutnost hemolizina *hlyA*, koji se prvenstveno povezuje s patogrupom VTEC. Prisutnost navedenog gena dokazana je u ukupno 2% od svih pretraženih izolata, od kojih je jedan podrijetlom od divljači, uz dokazani *EAST1* gen, a drugi podrijetlom od svinje, uz dokazani *eae* gen (Tablica 9.), ali nije dokazana u sojeva koji su potvrđeni kao VTEC. U istraživanju ISHII i sur. (2007.), izolati kojima je dokazano prisustvo gena za hemolizu (*ehxA*), uglavnom su bili podrijetlom od kože i jelena, ali su također dokazani u goveda i svinja, što se slaže s rezultatima ovog istraživanja.

SCHMIDT i sur. (1995) ukazuju na povezanost EHEC hemolizina, među kojima su i oni kodirani *hlyA* genom, s VTEC sojevima. Od ostalih istraživanja, BEUTIN i sur. (1989.) su analizom prisustva hemolizina kod velikog broja serološki različitih VTEC, pronašli poveznicu između proizvodnje enterohemolizina i verotoksina. Zbog njihove povezanosti postoji pretpostavka da enterohemolizini mogu utjecati na djelovanje verotoksina i pojačati njihovu virulenciju (NATARO i KAPER, 1998.). U ovom istraživanju nije dokazano prisustvo *vtx* gena u izolatima u kojima je dokazan gen za čimbenik virulencije enterohemolizin, no s obzirom na to da se potonji nalaze na plazmidu (PATON i PATON, 1998.), postoji velika mogućnost horizontalnog prijenosa na druge bakterijske mikroorganizme, pa tako i na druge patogrupe i komenzalne *E. coli*.

U provedbi ovog istraživanja odabrani su geni karakteristični za patogrupe, iako pojedini mogu biti prisutni u više njih. Kako bi se dobio uvid u zastupljenost patogrupa, analizirani su izolati izdvojeni iz hrane različitog životinjskog podrijetla (perad, divljač, svinje i goveda) na prisutnost 17 gena koji kodiraju čimbenike virulencije. S obzirom na broj

analiziranih izolata, najviše gena za čimbenike virulencije dokazano je u onima izdvojenim iz uzoraka podrijetlom od divljači, u kojima je, u 11 od ukupno 14 analiziranih izolata dokazano prisustvo barem jednog gena. Povezanost između prisustva gena za čimbenike virulencije i podrijetla izolata potvrđena je statistički ($p=0.004$) te je također ustanovljena povezanost podrijetla uzorka ($p=0.003$) s prisutnošću više gena za čimbenike virulencije.

U izolatima izdvojenim iz divljači dokazani su sljedeći geni i patogrupe: *EAST1* (EAEC), *STII* (ETEC), *cnf1* i *cnf2* (ExPEC), *eae* (EPEC), *stx1* (VTEC) i gen za čimbenik virulencije *hlyA*.

Rezultati drugih istraživanja također navode divlje životinje kao rezervoar i izvor infekcije VTEC i EHEC za ljude (BARDIAU i sur., 2010.; GOMES i sur., 2016.; GARCÍA-SÁNCHEZ i sur., 2007.; SÁNCHEZ i sur., 2010.). Potonja istraživanja navode dokaz prisutnosti *vtx* (VTEC) u izolatima podrijetlom od divljači što se slaže i s rezultatima ovog istraživanja. OBWEGESER i sur. (2012.) su pretraživanjem 239 uzoraka izmeta divljači izdvojili *vtx* u 32,6% izdvojenih izolata, *eae* u njih 6,7% te *vtx* i *eae* u 13,8% sojeva, zbog čega su proglasili divlje preživače rezervoarima VTEC. Rezultati njihova istraživanja prikazuju veću učestalost *vtx* i *eae* gena nego što je ustanovljena ovim istraživanjem.

Od svih pretraženih izolata, u onima izdvojenim iz mesa divljači dokazano je najviše gena koji kodiraju čimbenike virulencije te je većina također posjedovala više od jednog gena. Razlog najveće kontaminacije mesa divljači patogenim sojevima može se objasniti na više načina. Jedan od njih je mogućnost kontaminacije mesa prilikom odstrela životinje, tj. ovisno o mjestu ranjavanja životinje, meso može biti kontaminirano bakterijama iz crijeva. Nadalje, bakterijska kontaminacija mesa ovisi i o načinu evisceracije životinja, koja se uglavnom odvija na terenu, ponekad i s odgodom od nekoliko sati uslijed čega se crijeva životinje nadmu zbog čega se povećava mogućnost njihova oštećenja prilikom evisceracije. Uz navedeno, ponekad se trupovi skladište na neadekvatnim temperaturama (sobna temperatura), zbog čega raste broj mikroorganizama u trupu životinje (GILL, 2007.).

Sljedeći su po učestalosti, a s obzirom na broj dokazanih gena za čimbenike virulencije, izolati podrijetlom od peradi. Od 27 izolata, u njih deset (37,04%) dokazano je prisustvo barem jednog gena za čimbenik virulencije. U pretraživanih izolata dokazani su sljedeći geni za čimbenike virulencije i patogrupe: *EAST1* (EAEC), *cnf1* i *cnf2* (ExPEC) i *eae* (EPEC). Prisutnost gena za čimbenike virulencije u uzorcima podrijetlom od peradi posljedica je kontaminacije mesa uslijed izlivanja crijevnog sadržaja ili kontaminacijom trupa preko opreme, kao i prilikom pohrane i transporta (ADEYANJU i ISHOLA, 2014.).

Nakon peradi, slijede izolati podrijetlom od goveda, u kojima je u osam (27,59%) od 29 pretraženih sojeva dokazano prisustvo barem jednog gena za čimbenike virulencije. U izolatima su dokazani sljedeći geni za čimbenike virulencije i patogrupe: *EAST1* (EAEC), *cnf1* i *cnf2* (ExPEC) i *eae* (EPEC). Klaonička obrada ima svoje osobitosti ovisno o vrsti životinja, a tijekom klanja goveda najveća mogućnost kontaminacije mesa patogenim bakterijama nastaje prilikom skidanja kože i podvezivanja rektuma (KOTULA i KOTULA, 2000.; McEVOY i sur., 2003.).

Od 30 izolata podrijetlom od svinja, u sedam (23,33%) je dokazano prisustvo barem jednog gena za čimbenike virulencije. U izolatima su dokazani sljedeći geni za čimbenike virulencije i patogrupe: *EAST1* (EAEC), *STII* (ETEC), *cnf1* i *cnf2* (ExPEC), *eae* (EPEC), *stx2* (VTEC) i gen za čimbenik virulencije *hlyA*. Prisutnost patogrupa u izolatima podrijetlom od svinje može se također objasniti postupcima uključenim u klaoničku obradu životinjskih trupova. Kontaminacija trupova bakterijama se, prema KOTULA i KOTULA (2000.), odvija prilikom šurenja. Ono su odvija nakon klanja, uobičajeno u vodi zagrijanoj na 60 ° do 70 °C, a bakterije se skupljaju u vodi i ulaze u trup životinje kroz nosnu i usnu šupljinu, putujući dalje u pluća, cirkulaciju, organe i mišiće.

Određivanje prisutnosti gena za čimbenike virulencije i svrstavanje izolata u patogrupe ima javno zdravstveni značaj i zbog spoznaje o očekivanoj infektivnoj dozi. Iako nisu jednako infektivne, sve patogrupe imaju potencijal uzrokovanja infekcija i intoksikacija. Tako, primjerice, istraživanje EPEC provedeno na odraslim dobrovoljcima ukazuje na visoku infektivnu dozu (od 10^8 do 10^{10} cfu, engl. *colony forming units*), dok je „stvarna“ infektivna doza, potrebna za uzrokovanje infekcije, nepoznata (CROXEN i sur., 2013.). U ovom istraživanju *eae* genom je dokazano prisustvo EPEC u devet izolata, a svaki izolat izdvojen je iz pojedinačnih uzoraka, od kojih je za njih sedam – korištenom mikrobiološkom metodom određivanja broja – određen broj bakterijskih kolonija u uzorku. Svi sojevi bili su β -glukuronidaza pozitivni, a brojčane vrijednosti su u rasponu od $1,9 \times 10$ do $5,6 \times 10^3$ cfu/g. S obzirom na to da je infektivna doza EPEC visoka, pretpostavlja se da je broj mikroorganizama (cfu/g) u uzorcima pretraženim ovim istraživanjem premalen za uzrokovanje infekcije kod čovjeka.

Prema LEVINE i sur. (1979.), infektivna doza ETEC je u vrijednostima između 10^6 i 10^8 cfu, iako je njihova tvrdnja temeljena na rezultatima dobivenim u kontroliranim laboratorijskim uvjetima na odraslim dobrovoljcima te se može razlikovati od infektivne doze

zadobivene prirodnim prijenosom. Za razliku od njih HARA-KUDO i TAKATORI (2011.) opisuju procjenu rizika vezanu uz infektivnu dozu pojedinih mikroorganizama navodeći da je u 93% slučajeva infektivna doza ETEC bila u vrijednostima od 25 do 1000 cfu.

U ovom istraživanju, dokazom *STII* gena ustanovljeno je prisustvo ETEC u pet izolata. Za navedene, broj mikroorganizama iznosio je manje od 10 cfu/g, a sojevi su izdvojeni iz uzorka metodom namnažanja. S obzirom na to da je ustanovljena koncentracija mikroorganizama u uzorcima niska te da je nalaz *STII* gena rijetko povezan s izbijanjem bolesti u ljudi, pretpostavljeno je kako rizik za zdravlje ljudi ne postoji.

Za EAEC patogrupu se također pretpostavlja da ima visoku infektivnu dozu, što opisuju NATARO i sur. (1995.) u svom istraživanju u kojem su koristili soj s karakteristikama stvaranja AAF/II fimbrija i prisustva EAST1 i kDa Pet toksina. Prema rezultatima, infektivna doza koja uzrokuje pojavu proljeva u četiri od pet odraslih dobrovoljaca je 10^{10} mikroorganizama. Provedenim predmetnim istraživanjem dokazano je prisustvo EAEC patogrupe dokazom *EAST1* gena u 20 izolata, koji su bili podrijetlom od peradi, divljači, svinja i goveda. Za 15 uzoraka nije se mogao odrediti broj mikroorganizama, jer je korištenom mikrobiološkom metodom broj mikroorganizama iznosio manje od 10 cfu/g, dok su u pet uzoraka ustanovljene brojčane vrijednosti bile u rasponu od $1,0 \times 10$ do $3,6 \times 10^3$ cfu/g. Budući da je ustanovljena infektivna doza EAEC visoka, pretpostavlja se da je broj mikroorganizama (cfu/g) prisutan u uzorcima pretraženim ovim istraživanjem premalen za uzrokovanje infekcije kod čovjeka.

Ovim istraživanjem u dvama izolatima dokazano je prisustvo VTEC, jednom podrijetlom od divljači i jednom od svinje. Daljnjom tipizacijom *vtx* gena određen je podtip *vtx1c* i *vtx1d* u izolatu podrijetlom od srne te *vtx2e* u izolatu podrijetlom od svinje. Tipizacija gena koji kodiraju verotoksine važna je zbog određivanja zoonotskog potencijala, pri čemu su podtipovi *vtx2a*, *vtx2c* i *vtx2d* često povezani s HUS-om i krvavim proljevom. Sojevi kojima je dokazano prisustvo *vtx1c* ili *vtx2b* često su izdvojeni iz pacijanata s blažim infekcijama, dok su oni koji posjeduju *vtx2e* ili *vtx2f* podtip verotoksina najčešće povezani s oboljenjima u životinja te su rijetko izdvojeni iz ljudi (BUVENS i sur., 2012.). Prema navedenom, možemo zaključiti kako sojevi izdvojeni u predmetnom istraživanju ne mogu uzrokovati teža klinička oboljenja u ljudi.

Za VTEC se smatra da imaju nisku infektivnu dozu, zbog čega se ne preporuča korištenje klasičnih mikrobioloških metoda određivanja broja, već uzgoj bakterijskog mikroorganizma u bujonu za namnažanje stanica. TUTTLE i sur. (1999.) navode slučaj

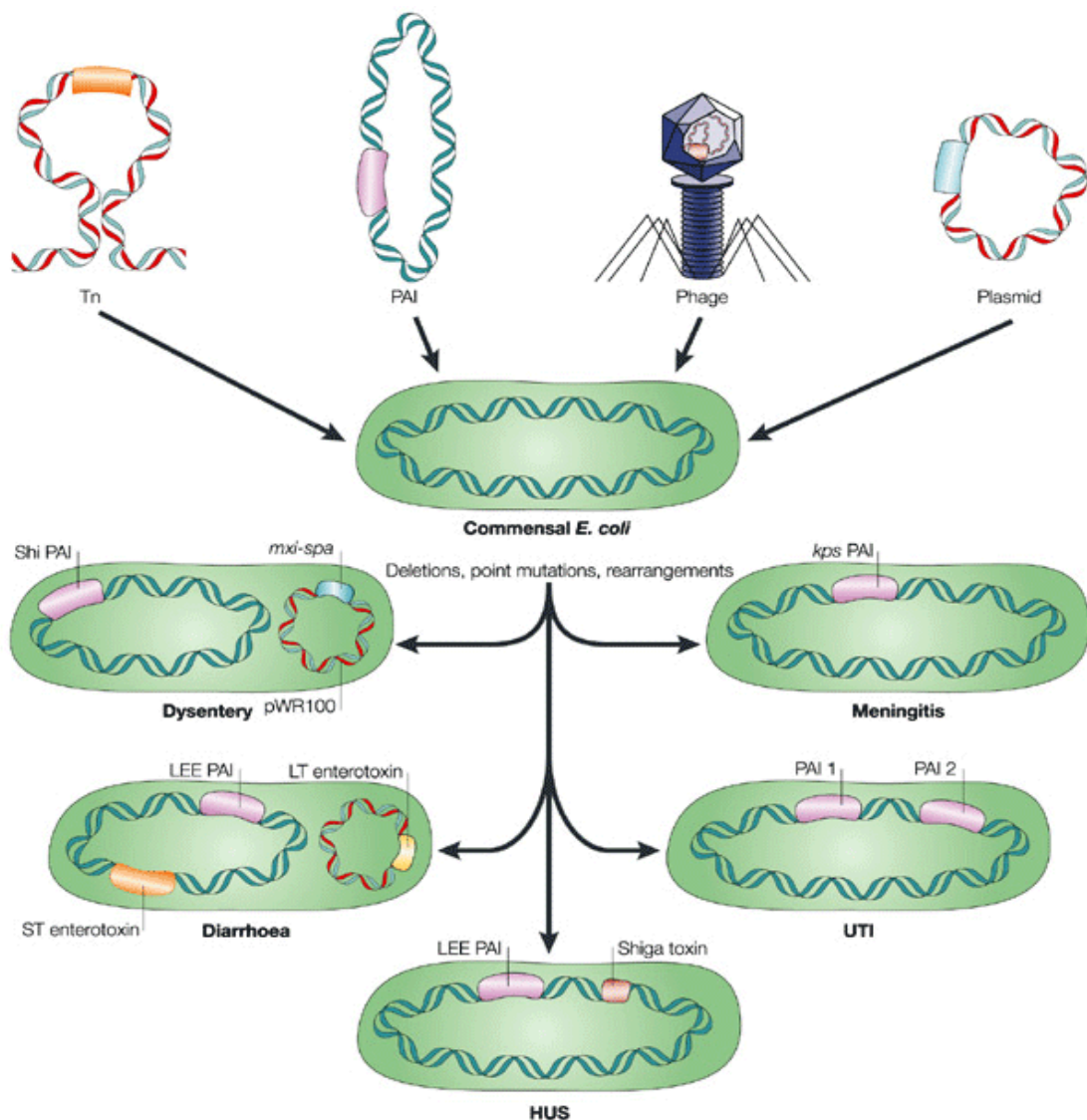
izbijanja epidemije izazvane *E. coli* O157:H7 povezane s konzumacijom junećih pljeskavica. Mikrobiološkom pretragom hrane dokazana je infektivna doza O157:H7 manja od 7×10^2 cfu/g, dok podaci iz *Food safety authority of Ireland* navode da infektivna doza VTEC može biti do 10 mikroorganizama (Anon. 4, 2015.), što se slaže s podacima *Public Health Agency of Canada* (Anon. 5, 2015.). U predmetnom istraživanju, broj mikroorganizama u uzorcima kojima je dokazano prisustvo VTEC iznosio je manje od 10 cfu/g te su sojevi izdvojeni metodom namnažanja. S obzirom na navedenu infektivnu dozu, moguće je da spomenuti uzorci predstavljaju opasnost za zdravlje ljudi, ali prema podtipu verotoksina ne mogu uzrokovati teška klinička oboljenja u čovjeka te se ne smatraju opasnim.

S obzirom na opisana istraživanja, moguće je da uzorci, kojima su dokazane ETEC, EAEC i EPEC patogrupe, nemaju zoonotski potencijal, ali treba uzeti u obzir da je većina istraživanja provedena u laboratorijskim uvjetima te da ne odražavaju „pravu sliku“ infektivne doze zadobivene prirodnim putem. Također, infektivna doza i odgovor domaćina na mikroorganizam ovise o soju koji je upotrebljen, godištu i fizičkom stanju ispitanika. Isto tako, za prijenos i širenje mnogih patogrupa *E. coli* uzima se na uvid osobna higijena pojedinca, mogućnost opskrbe svježom vodom, pravilna toplinska obrada i čuvanje hrane.

Ovo istraživanje obuhvaća određivanje prisutnosti sedam patogrupa na temelju 17 gena za čimbenike virulencije. Istraživanjem je ustanovljeno prisustvo njih šest (35,30%), a pojedine izolate nije bilo moguće svrstati u samo jednu patogrupu. Predmetnim istraživanjem ustanovljeno je da šest izolata posjeduje više od jednog gena za čimbenike virulencije. Primjer jednog takvog izolata (16,67%) je onaj podrijetlom od peradi kojem je dokazano prisustvo *eae* gena, karakterističnog za EPEC patogrupu, i *EAST1* gena, karakterističnog za EAEC patogrupu. Ostale primjere čine četiri izolata (6,67%) podrijetlom od divljači i jedan (16,67%) izolat podrijetlom od svinje, kojima je dokazan *STII* gen, karakterističan za ETEC patogrupu, i *EAST1* gen, karakterističan za EAEC patogrupu (Tablica 8.). Slične rezultate dobio je OSEK (2003.) istražujući *E. coli* izdvojene iz izmeta sisajuće prasadi s proljevom koji prikazuju dokaz *EAST1* gena u većini izolata kojima je također ustanovljeno prisustvo *LTI* i *STII* gena.

Provedeno istraživanje jedan je od primjera sve složenije podjele *E. coli* u patogrupe, što se može objasniti činjenicom prisustva velikog broja virulentnih faktora na mobilnim genetskim elementima (transpozoni, plazmidi, bakteriofagi). Zbog navedenog, moguć je horizontalni prijenos gena za čimbenike virulencije na komezalne bakterije i druge patogrupe (Slika 12.).

Primjer su sojevi ETEC patogrupe kojoj se većina gena i kolonizacijskih faktora važnih za infekciju i intoksikaciju nalazi na plazmidu (QADRI i sur., 2005.). Sojevi EPEC i neki sojevi VTEC patogrupe posjeduju kromosomski patogeni otočić pod nazivom „lokusom brisanja enterocita“ (LEE), koji kodira gene za čimbenike virulencije potrebne za stvaranje prijanjajućih i brišućih lezija (McDANIEL i sur., 1995.). Najvažniji su faktori virulencije EHEC, tj. VTEC, shiga toksini (*stx*) ili verotoksini (*vtx*), koji su kodirani bakteriofagom (PAVANKUMAR i SANKARAN, 2008.), dok se, s druge strane, termostabilni enterotoksin 1 (EAST1) karakterističan za EAEC patogrupu može nalaziti na plazmidu i kromosomu (MÉNARD i DUBREUIL, 2002.).



Nature Reviews | Microbiology

Slika 12. Doprinos mobilnih genetskih elemenata evoluciji patogenih *E. coli* (izvor: KAPER i sur., 2004.)

Dokaz prisutnosti gena za čimbenike virulencije jedini je objektivni dokaz virulentnosti izolata, iako je istraživanjima ustanovljena važnost svrstavanja *E. coli* u filogrupe pri procjeni virulentnosti izolata. Budući da su u Republici Hrvatskoj podaci vezani uz zastupljenost filogrupa oskudni, ovim su istraživanjem pretraženi izolati izdvojeni iz uzoraka mesa i obrisaka trupova različitih vrsta životinja, s ciljem ustanovljenja njihove učestalosti. Rezultati istraživanja vidljivi u Tablici 10. i Dijagramu 2. prikazuju najveću učestalost filogrupa A (38%) i B1 (36%), dok su ostale filogrupe zastupljene u manjem postotku: B2 (4%), C (3%), D (9%), E (4%) i F (6%). Prevalencija filogrupa A i B1 također je opisana u istraživanju CARLOS i sur. (2010.) koji prikazuju prisutnost filogrupa A i B1 u svih izolata izdvojenih iz izmeta podrijetlom od ljudi i životinja. Slične rezultate prikazali su CROXEN i sur. (2013.) navodeći povezanost većine komenzalnih sojeva s filogrupom A te TRKOV i sur. (2014.), koji su analizom raznih uzoraka hrane (sirovo meso, riblja jela, šunke, salate i dr.) ustanovili učestalost filogrupa A (50%) i B1 (35,7%), dok su filogrupe D (11,9%) i B2 (2,4%) bile zastupljene s manjom učestalošću.

Analizom ostvarenih rezultata, zamjetna je dominacija filogrupa A (40,74%) te podjednako B1 (22,22%) i F (22,22%) u izolatima podrijetlom od peradi. Filogrupe A (43,33%) i B1 (40%) bile su podjednako zastupljene u izolatima podrijetlom od svinja, dok je u divljači i goveda učestalija bila filogrupa B1 (divljač 35,72%; goveda 44,83%), nakon koje slijedi filogrupa A (divljač 28,57%; goveda 34,48%).

Pojedine filogrupe imaju sklonost održavanja unutar određenih domaćina, što je prikazano rezultatima ovog i prijašnjih istraživanja. Ovim istraživanjem ustanovljena je najveća učestalost filogrupa A, B1 i F u izolatima podrijetlom od peradi, što je podudarno istraživanju COURA i sur. (2015.) koji prema statističkoj obradi podataka povezuju filogrupe A i F s izolatima izdvojenim iz uzoraka podrijetlom od peradi. Također, navode B1 i E filogrupe kao najučestalije u izolatima izmeta goveda. Potonje se slaže s rezultatima ovog istraživanja u kojem je B1 filogrupa najučestalija u izolatima izdvojenim iz divljači i preživača. Zamjetna je prevalencija filogrupe A u peradi i svinja te B1 u goveda i divljači, što se slaže s istraživanjem CARLOS i sur. (2010.) koji su većinu sojeva podrijetlom od ljudi i svinja (svežderi) svrstali u filogrupu A, dok u izolatima podrijetlom od krava, koza i ovaca (biljoždera) prevladava filogrupa B1. Osim činjenice da većina crijevnih komenzalnih bakterija pripada filogrupama A i B1, BALDY-CHUDZIK i sur. (2008.) objašnjavaju kako su komenzalne *E. coli* izdvojene iz izmeta biljoždera najbolje prilagođene filogrupi B1, za razliku od sojeva izdvojenih iz mesoždera i sveždera u kojih to vrijedi za filogrupu A.

Prema navedenom, vidna je povezanost filogrupa s podrijetlom uzorka (vrstom životinje), što je predmetnim istraživanjem i statistički dokazano ($p=0.039$). Zastupljenost filogrupa unutar domaćina je bitna, jer pojedine životinjske vrste mogu biti rezervoari patogenih *E. coli*, kao primjerice goveda koja su primarni rezervoar VTEC, a B1 filogrupa je najbolje prilagođena govedima (biljožderi). Kao dokaz povezanosti pato- i filogrupe, postoje rezultati brojnih istraživanja koji prikazuju sojeve VTEC uglavnom svrstane u B1 filogrupu (GIRARDEAU i sur., 2005.; ISHII i sur., 2007.; BALDY-CHUDZIK i sur., 2008.).

Osim što su filogrupe A i B1 bile najučestalije u izolata kojima nije dokazano prisustvo gena za čimbenike virulencije, također su dokazane kao najučestalije u izolata koji su ih posjedovali. Od 36 izolata, njih 14 (38,89%) svrstano je u filogrupu A, 12 (33,33%) je pripadalo filogrupi B1, dok su preostale filogrupe (B2, C, D, E, F) bile zastupljene jednako (5,56%). Prema dobivenim rezultatima, izolati kojima su dokazani geni za čimbenike virulencije uglavnom su prisutni unutar filogrupa A i B1, što se podudara s rezultatima prijašnjih istraživanja koja navode komenzalne sojeve i one koji uzrokuju crijevne infekcije najčešće u filogrupama A i B1 (BALDY-CHUDZIK i sur., 2008.; CLERMONT i sur., 2013.). Iako su A i B1 filogrupe podjednako zastupljene u izolatima s dokazanim genima za čimbenike virulencije te je prema Dijagramu 5. zamjetna prisutnost najvećeg broja gena virulencije unutar B1 filogrupe, statističkom obradom podataka nije dokazana povezanost između prisutnosti gena za čimbenike virulencije i pripadnosti filogrupi ($p=0.833$).

Provedenim istraživanjem dokazan je *EAST1* gen i time prisustvo EAEC patogrupe u 20 izolata, od kojih je 11 (55%) svrstano u filogrupu A, šest izolata (30%) u filogrupu B1 te po jedan izolat u filogrupe C (5%) i F (5%), odnosno D (5%) (Dijagram 5.). Prema navedenom, sojevi koji pripadaju EAEC patogrubi svrstani su u pet filogrupa, što se djelomično podudara s istraživanjem ESCOBAR-PARAMO i sur. (2004.) i CROXEN i sur. (2013.) koji navode kako se EAEC sojevi nalaze unutar četiri filogrupe: A, B1, B2 i D. Izolati koji pripadaju filogrupi A i B1 te posjeduju gen koji kodira EAST1, dokazani su u peradi, divljači, svinja i goveda s većom učestalošću nego što je u istraživanju BALDY-CHUDZIK i sur. (2008.), iako njihovi rezultati prikazuju dokaz navedenog gena u mesoždera i sveždera unutar filogrupe A, dok su kod biljoždera raspoređeni u B1 filogrupu. U ovom istraživanju je to bio slučaj kod divljači, ali ne i goveda.

Rezultati predmetnog istraživanja prikazuju rasprostranjenost *EAST1* gena u uzorcima različitog podrijetla (Tablica 13.), što je suglasno s rezultatima prijašnjih istraživanja

(TOSHIMA i sur., 2004.; VIELLEUX i DUBREUIL, 2006.; BALDY-CHUDZIK i sur., 2008.).

Slični podaci dobiveni su za patogrupu EPEC s dokazanim *eae* genom u devet izolata, čiji rezultati analize filogrupa prikazuju tri izolata (33,33%) svrstana u filogrupu A, četiri izolata (44,44%) svrstana u filogrupu B1 te po jedan izolat svrstan u filogrupe D (11,11%) i E (11,11%) (Dijagram 5.). Navedeni podaci slažu se s istraživanjem ISHII i sur. (2007.) koji objavljuju EPEC patogrupe ravnomjerno raspoređene unutar četiri filogrupe (A, B1, B2 i D), osim što je predmetnim istraživanjem jedan izolat svrstan u E filogrupu.

Ovim istraživanjem EPEC patogrupa dokazana je u peradi, divljači, svinja i goveda. Od navedenih, izdvojeni su izolati podrijetlom od divljači te prvenstveno goveda koji pripadaju filogrupi B1, zbog navoda WANG i sur. (2013.) koji su analizom sojeva izdvojenih iz hrane, izmeta domaćih životinja, zdravih ljudi, kliconoša i pacijenata ustanovili učestalost filogrupe B1 u izolata pacijenata s proljevom (50%) i goveda (79%). Isti autori grupiranjem *E. coli* prema filogrupama i virulentnim profilima iznose rezultate prema kojima su filogrupe B1 i D specifične za pacijente i goveda te zaključuju kako su goveda važan izvor infekcije za ljude te da je svrstavanje *E. coli* u filogrupe prvi izbor prilikom procjene patogenosti atipičnih EPEC sojeva i njihove sposobnosti uzrokovanja proljeva u ljudi.

S obzirom na navedeno, dokaz *eae* gena i B1 filogrupe u izolatima izdvojenim u predmetnom istraživanju može ukazivati na njihov zoonotski potencijal.

U ovom istraživanju, pet izolata s dokazanim *STII* genom svrstano je u ETEC patogrupu, od kojih tri izolata (60%) pripadaju filogrupi A te dva (40%) filogrupi B1. Nadalje, dva izolata kojima je ustanovljeno prisustvo VTEC s dokazanim *vtx* genima, svrstani su u E (50%), odnosno C (50%) filogrupu. Dobiveni rezultati slažu se s istraživanjem ESCOBAR-PARAMO i sur. (2004.), kojim naglašavaju pripadnost sojeva povezanih s akutnim i teškim proljevom, poput EHEC i ETEC, isključivo u grupama A, B1, C i E, dok je izolate patogrupa koje su povezane s kroničnim i blagim proljevom, kao što su EPEC, EAEC i DAEC, moguće dokazati u bilo kojoj filogrupi.

Izolati kojima je predmetnim radom dokazano prisustvo VTEC patogrupe podrijetlom su od divljači i svinja. Rezultati prikazani za izolate podrijetlom od divljači (biljožderi) podudaraju se s rezultatima istraživanja COURA i sur. (2017.) prema kojima sojevi VTEC, izdvojeni iz teladi s proljevom i bez njega, pripadaju filogrupama A (6,33%), B1 (70,89%), B2 (2,53%), C (1,27%) i E (18,99%), a sojevi koji pripadaju ETEC patogrupi filogrupama A (15%), B1 (35%) i E (50%). Osim potonjeg, istraživanje BALDY-CHUDZIK i sur. (2008.) navodi

prisutnost *vtx* gena (5%) u izolatima izdvojenim iz izmeta divljih preživača svrstanih u B1 filogrupu, isto kao istraživanje MORA i sur. (2012.) koji izolate VTEC podrijetlom od srne, divlje svinje i lisice svrstavaju u filogrupe A (3%), B1 (51%), B2 (17%) i D (29%), što se ne slaže s predmetnim istraživanjem, budući da izolat podrijetlom iz srnećeg mesa pripada filogrupu E, dok je onaj izdvojen iz svinje svrstan u C filogrupu.

Ovim istraživanjem prisutnost ExPEC ustanovljena je dokazom *cnf1* i *cnf2* gena, a izolati su svrstani u B1 (50%), B2 (50%) i F (1%) filogrupe (Dijagram 5.). Izolati podrijetlom od peradi pripadali su filogrupu F, oni podrijetlom od svinja grupi B1, dok je po jedan izolat podrijetlom od goveda svrstan u filogrupu B1, odnosno B2, isto kao i jedan izolat podrijetlom od divljači. Prema dosadašnjim spoznajama, kao primjerice onom SMITH i sur. (2007.), navodi se da većina ExPEC sojeva pripada filogrupama B2 i D te posjeduju brojne virulentne faktore koji im omogućavaju uzrokovanje ekstraintestinalnih infekcija. Slične rezultate prikazuju MITCHELL i sur. (2015.) svrstavanjem izolata ExPEC također u filogrupe B2 (27,13%) i D (43,14%), dok za izolate koji nisu ExPEC dokazuju pripadnost uglavnom filogrupama A (44,44%) i B1 (33,33%). JAKOBSEN i sur. (2010.) navode kako sojevi ExPEC izdvojeni iz mesa peradi i svinja mogu pripadati bilo kojoj filogrupu, no pripadnici B2 i D imaju više gena za čimbenike virulencije, dok rezultati istraživanja CLERMONT i sur. (2011.) prikazuju povezanost izvancrijevnih infekcija s filogrupom B2, a onih crijevnih pretežno s A, B1 i E filogrupama.

Usporedbom rezultata prijašnjih istraživanja, s izdvojenim u ovom istraživanju, izolati podrijetlom od goveda i divljači koji pripadaju B2 filogrupu imaju veći zoonotski potencijal od preostalih pretraživanih.

S obzirom da su podaci vezani uz zastupljenost pato- i filogrupa *E. coli* u Republici Hrvatskoj oskudni, predmetni doktorat je može poslužiti kao polazišna točka za nastavak daljnjih istraživanja. Od ostalih istraživanja provedenih na području Republike Hrvatske, izdvaja se istraživanje SUKALIĆ (2015.) koje prikazuje raznolikost i učestalost pojavljivanja gena koji kodiraju čimbenike virulencije (*F4*, *LT*, *STa*, *STb*, *PAA*, *EAST1* i *AIDA-I* i dr.) u *E. coli* sojeva izdvojenih iz organa prasadi uginule od kolibaciloze. Osim navedenog, HORVATEK i sur. (2017.) prikazali su podatke istraživanja ptičjih patogenih sojeva *E. coli* (eng. avian pathogenic *E. coli*, APEC) izdvojenih iz organa peradi uginulih od koliseptikemije. Izdvojeni sojevi pretraženi su na prisutnost gena za čimbenike virulencije i svrstani u filogrupe.

Potonja istraživanja usmjerena su na utvrđivanje prisutnosti gena koji kodiraju čimbenike virulencije i njihovu povezanost s patomorfološkim promjenama te na prisutnost različitih – prema filograpi i prisutnosti gena za čimbenike virulencije – *E. coli* sojeva koji uzrokuju uginuće životinja, dok je predmetno usmjereno na ustanovljenje pripadnosti filograpi i prisutnosti gena koji kodiraju čimbenike virulencije u izolata izdvojenih iz mesa i obrisaka trupova zdravih životinja. Pretragom izolata podrijetlom od peradi, divljači, svinja i goveda ustanovljena je učestalost raznih patogrupa te također prisutnost više njih unutar jednog soja. Daljnja istraživanja mogu se usmjeriti na pretraživanje drugih gena koji kodiraju čimbenike virulencije te usporedbu izolata životinjskog podrijetla sa onima ljudskog podrijetla. Međusobna usporedba izolata može se ostvariti korištenjem metoda genotipizacije kao što su MLST i PFGE. Osim navedenog, filogenetska analiza *E. coli* može se također proširiti korištenjem MLST i PFGE metoda te postati predmetom zasebnog istraživanja.

7. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata istraživanja biokemijskih karakteristika, gena za čimbenike virulencije i filogrupa sojeva bakterijske vrste *E. coli* izdvojenih iz uzoraka hrane podrijetlom od različitih vrsta životinje, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. U bakterijskim izolatima *Escherichia coli* izdvojenim iz mesa i obrisaka trupova različitih vrsta životinja dokazana je prisutnost gena za čimbenike virulencije: *EAST1* (20%), *eae* (9%), *STII* (5%), *cnf1* (6%), *cnf2* (4%), *hlyA* (2%) i *vtx* (2%). Ustanovljeno je prisustvo patogrupe EAEC (*EAST1*) u 20% pretraženih bakterijskih izolata, čime je spomenuta najučestalija. ETEC (*STII*) patogrupa dokazana je u 5% izolata, EPEC (*eae*) u 9% izdvojenih bakterijskih sojeva, ExPEC (*cnf1*, *cnf2*) je bila prisutna u 6% bakterijskih izolata te EHEC/VTEC (*vtx1*, *vtx2*) u 2% izolata. Prema navedenim podacima, primjetna je prisutnost raznih patogrupa u hrani različitog životinjskog podrijetla.
2. Najviše gena za čimbenike virulencije dokazano je u izolatima podrijetlom od divljači u kojima je u 11 (78,57%) izolata od ukupno 14 pretraženih dokazano prisustvo gena za čimbenike virulencije (*EAST1*, *STII*, *eae*, *cnf1*, *cnf2*, *stx1*, *hlyA*), pri čemu je određena i statistička značajnost ($p=0.004$). Predmetnim istraživanjem meso divljači ustanovljeno je kao važan izvor patogenih *E. coli*.
3. Najviše izolata svrstano je u filogrupe A (38%) i B1 (36%), a s manjom učestalošću u B2 (4%), C (3%), D (9%), E (4%) i F (6%) filogrupe, što potvrđuje činjenicu o pripadnosti većine komenzalnih *E. coli* filogrupi A odnosno B1.
4. Izolati kojima je dokazano prisustvo gena za čimbenike virulencije svrstani su većinom u filogrupe A (38,89%) i B1 (33,33%) te s manjom učestalošću u B2 (5,56%), C (5,56%), D (5,56%), E (5,56%) i F (5,56%) filogrupe, što odgovara rezultatima dosadašnjih spoznaja.
5. Statistička značajnost ($p=0.039$) navodi na povezanost između podrijetla izolata (životinjska vrsta) i njegove pripadnosti filogrupi, što potvrđuje sklonost filogrupa prema određenim domaćinima.
6. Biokemijskom karakterizacijom izolata ustanovljeno je da su vrlo slični i da nema značajnijih razlika. Njihovom usporedbom s prisutnošću gena koji kodiraju čimbenike virulencije ističu se sojevi kojima je dokazano prisustvo *eae* gena u odnosu na

biokemijsku karakteristiku aktivnosti alkalizacije sukcinata ($p=0.045$) te oni kojima je dokazano prisustvo *cnfI* gena u odnosu na aktivnost enzima arilamidaze prema tirozinu ($p=0.007$), no za pouzdanost ustanovljene povezanosti poželjno je analizirati veći broj sojeva ovakvih karakteristika.

7. Za procjenu patogenosti potrebna je proširena karakterizacija izolata, uključivanjem dokazivanja i preostalih gena za čimbenike virulencije (primjerice fimbrijskih i nefimbrijski adhezina, mehanizama oduzimanja željeza i dr.) uz poželjnu usporedbu s izolatima ljudskog podrijetla koji su izdvojeni iz pacijenata s intestinalnim i ekstraintestinalnim infekcijama (primjerice uporabom PFGE ili MLST metoda genotipizacije).
8. S obzirom na to da je u uzorcima dokazanih EPEC, ETEC i EAEC patogrupa broj mikroorganizama ustanovljen ispod pretpostavljene granice infektivne doze, a za one VTEC patogrupe ustanovljeno (prema dokazanom podtipu verotoksina) da ne mogu uzorkovati teška klinička oboljenja u ljudi, pretpostavlja se kako navedeni uzorci nisu predstavljali opasnost za zdravlje ljudi.

8. POPIS LITERATURE

Anonymus 1, dostupno na: <http://what-when-how.com/acp-medicine/infections-due-to-escherichia-coli-and-other-enteric-gram-negative-bacilli-part-1.>, posjećeno: 24.7.2017.)

Anonymus 2, 2016; dostupno na: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/e_coli.pdf; posjećeno: 20.04.2017.

Anonymus 3, 2012; dostupno na: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/escherichia-coli-eng.php>; posjećeno: 15.05.2017.

Anonymus 4; 2015, dostupno na: https://www.fsai.ie/enforcement_audit/monitoring/food_surveillance/zoonoses/reports/vtec.html; posjećeno: 20.06.2017.

Anonymus 5, 2015; dostupno na: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/msds63e-eng.php>; posjećeno: 17.05.2017.

ADEYANJU, G. T., O. ISHOLA (2014): *Salmonella* and *Escherichia coli* contamination of poultry meat from a processing plant and retail markets in Ibadan, Oyo State, Nigeria. Springerplus 3, doi:10.1186/2193-1801-3-139.

AFSET, J. E., E. ANDERSSON, G. BRUANT, J. HAREL, L. WIELER, K. BERGH (2008): Phylogenetic Backgrounds and Virulence Profiles of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains from a Case-Control Study Using Multilocus Sequence Typing and DNA Microarray Analysis. J. Clin. Microbiol. 46, 2280–2290.

BALDY-CHUDZIK, K., P. MACKIEWICZ, M. STOSIK (2008): Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. *Vet. Microbiol.* 131, 173–184.

BALJER, G., L. H. WIELER (1999): Animals as a source of infections for humans diseases caused by EHEC. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 106, 339–343.

BARDIAU, M., M. SZLO, J. G. MAINIL (2010): Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. *Vet. Res.* 41, doi: 10.1051/vetres/2010029.

BEGUM, Y. A., K. A. TALUKDER, G. B. NAIR, A. M. SVENNERHOLM, R. B. SACK, F. QUADRI (2005): Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from surface water in urban and rural Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3582–3583.

BÉLANGERN L., A. GARENAUX, J. HAREL, M. BOULIANNE, E. NADEAU, C. M. DOZOIS (2011): *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *Pathogen and disease* 62, 1–10.

BETTELHEIM, K. A. (1994): Biochemical Characteristics of *Escherichia coli*. U: *Escherichia coli* in domestic Animals and Humans (Gyles, C.L., ur.), Cab International, Wallingford, str. 3–13.

BEUTIN, L., K. GLEIER, I. KONTNY, P. ESCHEVERRIA, F. SCHEUTZ (1997): Origin and characteristics of enteroinvasive strains of *Escherichia coli* (EIEC) isolated in Germany. *Epidemiol. Infect.* 118, 199–205.

BIBBAL, D., M. KÉROURÉDAN, E. LOUKIADIS, F. SCHEUTZ, E. OSWALD, H. BRUGÉRE (2014): Slaughterhouse effluent discharges into rivers not responsible for environmental occurrence of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* 168, 451–454.

BLANCO, M., J. E. BLANCO, M. P. ALONSO, J. BLANCO (1996): Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and asymptomatic bacteriuria. *Eur. J. Epidemiol.* 12, 191–198.

BOTTELDOORN, N., M. HEYNDRICKX, N. RIJPENS, L. HERMAN (2001): Prevalence of *Salmonella*, *Campylobacter* and VTEC on pig farms. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwk. Toegep. Biol. Wet.* 66, 373–380.

BOUVET, J., J. P. MONTET, R. ROSSEL, A. LE ROUX, C. BAVAI, S. RAY-GUENIOT, C. MAZUY, V. ATRACHE, C. VERNZOY-ROZAND (2002): Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157:H7 in French pork. *Appl. Microbiol.* 9, 7–14.

BÖLIN, I., G. WIKLUND, F. QUADRI, O. TORRES, A. L. BOURGEOIS, S. SAVARINO, A.M. SVENNERHOLM (2006): Enterotoxigenic *Escherichia coli* with STh and STp Genotypes Is Associated with Diarrhea Both in Children in Areas of Endemicity and in Travelers. *J Clin Microbiol* 44, 3872–3877.

BRAATEN, B. A., L. L.MYERS (1977): Biochemical characteristics of enterotoxigenic and non-enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea. *Am. J. Vet. Res.* 38, 1989–1991.

BUVENS, G., Y. DE GHELDRE, A. DEDISTE, A. I. DE MOREAU, G. MASCART, A. SIMON, D. ALLEMEERSCH, F. SCHEUTZ, S. LAUWERS, D. PIÉRARD (2012): Incidence and Virulence Determinants of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Infections in the Brussels-Capital Region, Belgium, in 2008–2010. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1336–1345.

CAPRIOLI, A., S. MORABITO, H. BRUGÈRE, E. OSWALD (2005): Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* 36, 289–311.

CARLOS C., M. M. PIRES, N. C. STOPPE, E. M. HACHICH, M. IZ SATO, T. AT. GOMES, L. A. AMARAL, L. MM. OTTOBONI (2010): *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol.* 10, doi.org/10.1186/1471-2180-10-161.

CASEY, T. A., C. J. HERRING, R. A. SCHNEIDER, B. T. BOSWORTH, S. C. WHIPP (1998): Expression of Heat-Stable Enterotoxin STb by Adherent *Escherichia coli* Is Not Sufficient To Cause Severe Diarrhea in Neonatal Pigs. *Infect. Immun.* 66, 1270–1272.

CASSAR, C. A., M. OTTAWAY, G. A. PAIBA, R. FUTTER, S. NEWBOULD, M. J. WOODWARD (2004): Absence of enteroaggregative *Escherichia coli* in farmed animals in Great Britain. *Vet. Rec.* 154, 237–239.

CHENG, D., H. SUN, S. GAO (2005): Prevalence of fimbrial colonization factors F18ab and F18ac in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema and/or diarrhea in China. *Vet. Microbiol.* 110, 35–39.

CLEMENS, A., J. C. YOUNG, N. CONSTANTINOU, G. FRANKEL (2012): Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* 3, 71–87.

CLERMONT, O., S. BONACORSI, E. BINGEN (2000): Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Appl. Environ. Microb.* 66, 4555–4558.

CLERMONT, O., J. K. CHRISTENSON, E. DENAMUR, D. M. GORDON (2013): The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol.* 5, 58–65.

CLERMONT, O., O. MAIWENN, C. HOEDE, L. DIANCOURT, S. BRISSE, M. KEROUDEAN, J. GLODT, B. PICARD, E. OSWALD, E. DENAMUR (2011): Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infect. Genet. and Evol.* 11, 654–662.

COBURN, B., I. SEKIROV, B. FINLAY (2007.): Type III Secretion Systems and Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 535–549.

COURA, F.M., S. DE ARAÚJO DINIZ, M. X. SILVA, J. M. SUHET MUSSI, S. MINHARRO BARBOSA, A. PEREIRA LAGEI, M. B. HEINEMANN (2015): Phylogenetic Group Determination of *Escherichia coli* Isolated from Animal Samples. *Sci. World. J.* 2015, doi.org/10.1155/2015/258424.

COURA, F. M., S. DE ARAÚJO DINIZ, M. J. SUHET MUSSI, S. MARCOS XAVER, A. PEREIRA LAGE, M. B. HEINEMANN (2017): Characterization of virulence factors and phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic calves from Brazil. *Folia Microbiol.* 62, 139–144.

CROXEN, M. A., R. J. LAW, R. SCHOLZ, K. M. KEENEY, M. WOLDARSKA, B. B. FINLAY (2013): Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 26, 822–880.

DANIELSSON, M. L., R. MÖLLBY, H. BRAG, N. HANSSON, P. JONSSON, E. OLSSON, T. WADSTRÖM (1979): Enterotoxigenic enteric bacteria in foods and outbreaks of food-borne diseases in Sweden. J. Hyg. (Lond) 83, 33–40.

DAVIES, B. I. (1975): Biochemical typing of urinary *Escherichia coli* strains by means of the API 20E *Enterobacteriaceae* system. Med. Microbiol. 10, 293–298.

DE RYCKE, J., J. P. NOUGAYREDE, E. OSWALD, P. MAZARS (1997): Interaction of *Escherichia coli* producing cytotoxic necrotizing factor with HeLa epithelial cells. U: Mechanism in the pathogenesis of enteric diseases (Prem, S.P., D.H. Francis, D.A. Benfield, ur.), Springer science i Business media, South Dakota, str. 363–367.

DEZFULIAN, H., I. BATISSON, J. M. FAIRBROTHER, P. C. K. LAU, A. NASSAR, G. SZATMARI, J. HAREL (2003): Presence and Characterization of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Virulence Genes in F165 Positive *E. coli* Strains Isolated from Diseased Calves and Pigs. J. Clin. Microbiol. 41, 1375–1385.

DOYLE, M. P., V. V. PADHYE (1989): *Escherichia coli*. U: Foodborne Bacterial Pathogens (Doyle, M.P., ur.), Marcel Dekker Inc, New York, str. 235–283.

DUFFY (2006): Emerging pathogenic *E. coli*. U: Emerging foodborne pathogens (Motarjemi Y, M. Adams, ur.), Woodhead Publishing Limited, England, str. 253–282.

ESCOBAR-PARAMO, P., O. CLERMONT, A.B. BLANC-POTARD, H. BUI, C. LE BOUQUENEC, E. DENAMUR (2004): A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* 21, 1085–1094.

EURL Reference Laboratory for *E. coli* (2013): Detection of Enteroaggregative *Escherichia coli* in food by Real Time PCR amplification of the *aggR* and *aaiC* genes. EU RL VTEC Method 5 Rev 01 (dostupno na: http://www.iss.it/binary/vtec/cont/EU_RL_VTEC_Method_05_Rev_1.pdf)

EURL Reference Laboratory for *E. coli* (2013): Detection of Enteroinvasive *Escherichia coli* in food by Real Time PCR amplification of the *ipaH* gene. EU RL VTEC Method 07 Rev 0 (dostupno na: http://www.iss.it/binary/vtec/cont/EU_RL_VTEC_Method_07_Rev_0.pdf).

EURL Reference Laboratory for *E. coli* (2013): Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in food by Real Time PCR amplification of the *lt*, *sth* and *stx* genes, encoding the heat-labile and heat-stable enterotoxins. EU RL VTEC Method 08 Rev 0 (dostupno na: http://www.iss.it/binary/vtec/cont/EU_RL_VTEC_Method_08_Rev_0.pdf).

EURL Reference Laboratory for *E. coli* (2013): Identification of the subtypes of Verocytotoxin encoding genes (*vtx*) of *Escherichia coli* by conventional PCR. EU RL VTEC Method 006 Rev 1 (dostupno na: http://www.iss.it/binary/vtec/cont/EU_RL_VTEC_Method_06_Rev_1.pdf).

FAROOQ, S., I. HUSSAIN, M.A. MIR, M. A. BHAT i S. A. WANI (2009): Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin 1 and 2f-producing *Escherichia coli* from avian species in India. *Appl. Microbiol.* 48, 692–697.

FAUNDEZ., G. G. FIGUEROA, M. TRONCOSO, F. C. CABELLO (1988): Characterization of Enteroinvasive *Escherichia coli* Strains Isolated from Children With Diarrhea in Chile. *J. Clin. Microbiol.* 26, 928–932.

GARCÍA-SÁNCHEZ, A., S. SÁNCHEZ, R. RUBIO, G. PEREIRA, J. M. ALONSKO, (2007): Presence of Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 in a survey of wild artiodactyls. *Vet Microbiol.* 121, 373–377.

GARGAN, R., W. BRUMFITT, J. M. T. HAMILTON-MILLER (1982): A concise biotyping system for differentiating strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Pathol.* 35, 1366–1369.

GIRARDEAU, J. P., A. DALMASSO, Y. BERTIN, C. DUCROT, S. BORD, V. LIVRELLI, C. VERNZOZY-ROZAND, C. MARTIN (2005): Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43, 6098–6107.

GIRARDEAU, J. P., L. LALIOUI, A. M. O. SAID, C. DE CHAMPS, C. LE BOUGUENEC (2003): Extended virulence genotype of pathogenic *Escherichia coli* isolates carrying the *afa-8* operon: evidence of similarities between isolates from humans and animals with extraintestinal infections. *J. Clin. Microbiol.* 41, 218–226.

GILL, D. M., S. H. RICHARDSON (1980): Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate cyclase catalyzed by heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: comparison with cholera toxin. *J. Infect. Dis.* 141, 64–70.

GILL, C.O. (2007): Microbiological conditions of meats from large game animals and birds. *Meat Sci.* 77, 149–160.

GODBOUT-DELASALLE, F., R. HIGGINS (1986): Biotyping of Clinical Isolates of *Escherichia coli* of Animal Origin, using the Analytab API20E System. *Can. J. Vet. Res.* 50, 418–421.

GOMES, T.A.T., W. P. ELIAS, I. C. A. SCALETSKY, B. E. C. GUTH, J. F. RODRIGUES, R. M. F. PIAZZA, L. C. S. FERREIRA, M. B. MARTINEZ (2016): Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Braz. J. Microbiol.* 47, 3–30.

GONZALES. L., E. JOFFRE, R. RIVERA, A. SJÖLING, A. M. SVENNERHOLM, V. INIGUEZ (2013): Prevalence, seasonality and severity of disease caused by pathogenic *Escherichia coli* in children with diarrhoea in Bolivia. *J. Med. Microbiol.* 62, 1697–1706

GORDON, D. M, A. COWLING (2003): The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology* 149, 3575–3586.

GUNZBURG, S. T., N. G. TORNIÉPORTH, L. W. RILEY (1995): Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1375–1377.

GYLES C. L. (2007): Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J. Anim. Sci.* 85, 45–62.

HABRUN (2014): Uzgoj i identifikacija bakterija. U: Klinička veterinarska bakteriologija. (Herak Perković, V., ur.), Medicinska naklada Zagreb i Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, str. 51–67.

HARA-KUDO., Y, K. TAKATORI (2011): Contamination level and ingestion dose of foodborne pathogens associated with infections. *Epidemiol. Infect.* 139, 1505–1510.

HARTLAND, E. L., J. M. LEONG (2013): Enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli*: ecology, pathogenesis and evolution. *Front. Cell. Infect. Mi.* 3, doi: 0.3389/fcimb.2013.00015.

HARNETT, N. M., C. L. GYLES (1984): Resistance to Drugs and Heavy Metals, Colicin Production and Biochemical Characteristics Of Selected Bovine and Porcine *Escherichia coli* Strains. *Appl. Environ. Microb.* 48, 930–935.

HORVATEK TOMIĆ, D., M. LUKAČ, G. NEDELJKOVIĆ, E. PRUKNER-RADOVČIĆ, I. TOTH, L. LOZICA, M. VLAHEK, Z. BANOVEC, Ž. GOTTSTEIN (2017): Filogenetska raznolikost APEC sojeva izdvojenih na farmama roditeljskih jata teških linija u Hrvatskoj. *Peradarski dani 2017*, 10.-13. svibnja, Šibenik, Hrvatska, str. 57-60.

HRN ISO 16649-2:2001: Mikrobiologija hrane i stočne hrane -- Metoda brojenja beta-glucuronidasa pozitivne *Escherichia coli* - 2. dio: Brojenje kolonija pri 44 °C uporabom 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide (ISO 16649-2:2001).

HRN CEN ISO/TC 13136:2013: Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Metoda temeljena na lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu (PCR) za dokazivanje prisutnosti patogena koji se prenose hranom -- Horizontalna metoda za dokazivanje Shiga toksin producirajuće bakterije *Escherichia coli* (STEC) i određivanje O157, O111, O26, O103 i O145 serotipova (ISO/TS 13136:2012; CEN ISO/TS 13136:2012).

HYON-JI, K., K. HYO-SUN, Y. SANG-HYEON, W. GUN-JO (2012): Phylogenetic group distribution and prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolates from food samples in South Korea. *World. J. Microb. Biot.* 28, 1813–1816.

ISHII, S., K. P. MEYER, M. J. SADOWSKY (2007): Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. *Appl. Environ. Microb.* 73, 5703–5710.

IRANPOUR, D., M. HASSANPOUR, H. ANSARI, S. TAJBAKHSH, G. KHAMISIPOUR, A. NAJAFI (2015): Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method. *Biomed Res. Int.* 2015, doi.org/10.1155/2015/846219.

ITOH, Y., I. NAGANO, M. KUNISHIMA, T. EZAKI (1997): Laboratory Investigation of Enteroaggregative *Escherichia coli* O Untypeable:H10 Associated with a Massive Outbreak of Gastrointestinal Illness. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2546–2550.

JAKOBSEN, L., D. J. SPANGHOLM, K. PEDERSEN, L. B. JENSEN, H.D. EMBORG, Y. AGERSO, F. M. AARESTRUP, A. M. HAMMERUM, N. FRIMODT-MOLLER (2010): Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients. *Int. J. Food. Microbiol.* 142, 264–272.

JANSSON, L., J. TOBIAS, M. LEBENS, A. M. SVENNERHOLM, S. TENEBERG (2006): The Major Subunit, CfaB, of Colonization Factor Antigen I from Enterotoxigenic *Escherichia coli* Is a Glycosphingolipid Binding Protein. *Infect. Immun.* 74, 3488–3497.

JENSEN, B. H, K. E. P. OLSEN, C. STRUVE, K. A. KROGFELT, A. M. PETERSEN (2014): Epidemiology and Clinical Manifestations of Enteroaggregative *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 27, 614–630.

JOHNSON, J. R. (1991): Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clin Microbiol Rev. 4, 80–128.

JOHNSON, J. R., P. DELAVARI, T. T. O'BRYAN, K. E. SMITH, S. TATINI (2005): Contamination of retail foods, particularly turkey, from community markets (Minnesota, 1999–2000) with antimicrobial resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Foodborne Pathog. Dis. 2, 38–49.

JOHNSON, J. R., A. GAJEWSKI, A. J. LESSE, T. A. RUSSO (2003a): Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* as a Cause of Invasive Nonurinary Infections. J. Clin. Microbiol. 41, 5798–5802.

JOHNSON, J. R., A. C. MURRAY, A. GAJEWSKI, M. SULLIVAN, P. SNIPPES, M. A. KUSKOWSKI, K. E. SMITH (2003b): Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. Antimicrob. Agents. Ch. 47, 2161–2168.

KAGAMBÈGA, A., O. MARTIKAINEN, A. SIITONEN, A.S. TRAORÉ, N. NARRO, K. HAUKKA (2012) Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* virulence genes in the feces of slaughtered cattle, chickens, and pigs in Burkina Faso. Microbiologyopen. 1, 276–284.

KAPER, J. B., J. P. NATARO, H. L. T. MOBLEY (2004): Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. 2, 123–140.

KAUR, P., A. CHAKRABORTI, A. ASEA (2010): Enteroaggregative *Escherichia coli*: An Emerging Enteric Food Borne Pathogen. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases 2010, doi.org/10.1155/2010/254159.

KILIAN, M., P. BÜLOW (1976): Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae*. I. Detection of bacterial glycosidases. Acta Path. Micro. Im. B. 84, 245–251.

KOTULA, K. L., A. W. KOTULA (2000): Fresh red meats. U: The microbiological safety and quality of food Volume I (Lund, B.M., T.C. Baird-Parker, G.W. Gould, ur.). Aspen Publisher Inc, Maryland, str. 361–389.

LECLERCQ, A., B. LAMBERT, D. PIERARD, J. MAHILLON (2001): Particular Biochemical Profiles for Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Isolates on the ID 32E System. J. Clin. Microbiol. 39, 1161–1164.

LEVINE, M. M., D. R. NALIN, D. L. HOOVER, E. J. BERGQUIST, R. B. HORNICK, C. R. YOUNG (1979): Immunity to enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 23, 729–736.

LORTIE, L. A., J. D. DUBREUIL, J. HAREL (1991): Characterization of *Escherichia coli* Strains Producing Heat-Stable Enterotoxin b (STb) Isolated from Humans with Diarrhea. J Clin. Microbiol. 29, 656–659.

MANSAN-ALMEIDA, R., A. L. PEREIRA, L. G. GIUGLIANO (2013): Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. BMC Microbiol.13, doi: 10.1186/1471-2180-13-22.

MAINIL, J. (2013): *Escherichia coli* virulence factors. *Vet Immunol Immunop.* 152, 2–12.

MARTINS, R. P., L. NAKAZATO, V. DUTRA, D. DA SILVA LEITE (2011): Analysis of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from grated cheese. *Food Sci. Tech-Brazil.* 31 , doi.org/10.1590/S0101-20612011000100014.

McDANIEL, T. K., K. G. JARVIS, M. S. DONNENBERG, J. B. KAPER (1995): A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad Sci U.S.A.* 92, 1664–1668.

McEVOY, J. M., A. M. DOHERTY, J. J. SHERIDAN, F. M. THOMSON-CARTER, P. GARVEY, L. McGUIRE, I. S. BLAIR, D. A. McDOWELL (2003): The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157:H7 at a commercial beef abattoir. *J. Appl. Microbiol.* 95, 256–266.

MÉNARD, L.P., J. D. DUBREUIL (2002): Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Crit. Rev. Microbiol.* 28, 43–60.

MITCHELL, N. M., J. R. JOHNSON, B. JOHNSTON, R. CURTISS, M. MELLATA (2015): Zoonotic Potential of *Escherichia coli* Isolates from Retail Chicken Meat Products and Eggs. *Appl. Environ. Microb.* 81,1177–1187

MOSELY, S. L., W. HARDY, M. I. HUG, P. ESCHEVERRIA, S. FALKOW (1983): Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 39, 1167–1174.

MORA, A., C. LÓPEZ, G. DHABI, A. M. LÓPEZ-BECEIRO, L. E. FIDALGO, E. A. DÍAZ, C. MARTÍNEZ-CARRASCO, R. MAMMANI, A. HERRERA, J. E. BLANCO, M.

BLANCO, J. BLANCO (2012): Seropathotypes, Phylogroups, Stx Subtypes, and Intimin Types of Wildlife-Carried, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains with the Same Characteristics as Human-Pathogenic Isolates. *Appl. Environ. Microb.* 78, 2578–2585.

MOURA, R. A., M. P. SIRCILI, L. LEOMIL, M. H. MATTE, L. R. TRABULSI, W. P. ELIAS, K. IRINO, A. F. PESTANA DE CASTRO (2009): Clonal Relationship among Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Different Animal Species and Humans. *Appl. Environ. Microb.* 75, 7399–7408

NAGLIĆ, T., D. HAJSIG, J. MADIĆ, LJ. PINTER (2005): Rod *Escherichia*. U: Veterinarska mikrobiologija. (Hajsig, D., ur.), Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, str. 58–66.

NAGY, B., P. Z. S. FEKETE (1999): Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* 30, 259–284

NAGY, B., P. FEKETE (2005): Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine *Int. J. Med. Microbiol.* 295, 443–454.

NATARO, J. P., J. B. KAPER (1998): Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142–201.

NATARO, J. P., D. YIKANG, S. COOKSON, A. CRAVITO, S. J. SAVARINO, L.D. GUERS (1995): Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J. Infect. Dis.* 171, 465–468.

NGUYEN Y., V. SPERANDIO (2012): Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Front. Cell Infect. Mi.* 90, 1–7.

NZOUANKEU, A., A. NGANDJIO, G. EJENGUELE, T. NJINE, M. NDAYO WOUAFO (2010): Multiple contaminations of chickens with *Campylobacter*, *Escherichia coli* and *Salmonella* in Yaounde (Cameroon). *J. Infect. Dev. Countr.* 4, 583–586.

OBWEGESER, T., R. STEPHAN, A. E. HOFER, C. ZWEIFEL (2012.): Shedding of foodborne pathogens and microbial carcass contamination of hunted wild ruminants. *Vet. Microbiol.* 159, 149–154.

OCHOA, T. J., C. A. CONTRAS (2011): Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 24, 478 – 483.

OJEDA, A., V. PRADO, J. MARTINEZ, C. ARELLANO, A. BORCZYK, W. JOHNSON, H. LIOR, M. M. LEVINE (1995): Sorbitol-Negative Phenotype among Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains of Different Serotypes and from Different Sources. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2199–2201.

OKAMOTO, K., Y. FUJII, Y., N. AKASHI, S. HITOTSUBASHIL, H. KURAZONO, T. KARASAWA, Y. TAKEDA (1993): Identification and Characterization of Heat-Stable Enterotoxin II-Producing *Escherichia coli* from Patients with Diarrhea. *Microbiol. Immunol.* 37, 411–414.

ORDEN, J. A., G. DOMÍNGUEZ-BERNAL, P. HORCAJO, J. A. RUIZ-SANTA-QUITERIA, Á. GARCÍA, J. CARRIÓN (2017): Ruminants are not a reservoir of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Austral. J. Vet. Sci.* 1, 25–26.

ORSKOV, F., I. ORSKOV, D. J. EVANS, R. B. SACK, D. A. SACK, T. WADSTRÖM (1976): Special *Escherichia coli* serotypes among enterotoxigenic strains from diarrhoea in adults and children. *Med. Microbiol. Immun.* 162, 73–80.

OSEK, J. (2003): Identification of the *astA* gene in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains responsible for diarrhea in pigs. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 47, 9–15.

PASS, M. A., R. ODERA, R. M. BATT (2000): Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2001–2004.

PATON, A. W., J. C. PATON (1998): Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 598–602.

PATON, A. W., J. C. PATON (2002): Direct detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR of *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA* and *saa*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 271–274.

PATON, A. W., P. SRIMANOTE, M. C. WOODROW, J. C. PATON (2001): Characterization of *saa*, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans, *Infect. Immun.* 69, 6999–7009.

PAVANKUMAR, A. R., K. SANKARAN (2008): The need and new tools surveillance of *Escherichia coli* pathogens. *Food. Technol. Biotech.* 46, 125–145.

PRATS, G., T. LLOVET (1995): Enteroinvasive *Escherichia coli*. Pathogenesis and epidemiology 11, 91–96.

PUÑO-SARMIENTO, J., L. MEDEIROS, C. CHICONI, F. MARTINS, J. PELAYO, S. ROCHA, J. BLANCO, M. ZANUTTO, R. KOBAYASHI, G. NAKAZATO (2013): Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. Vet. Microbiol. 166, 676–680.

QUADRI, F., A. I. KHAN, A. S. G. FARUQUE, Y. A. BEGUM, F. CHOWDHURY, G. B. NAIR, M. A. SALAM, D. A. SACK, A. M. SVENNERHOLM (2005a): Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* Diarrhea, Bangladesh, 2004. Emerg Infect Dis. 11, 1104–1107.

QUADRI, F., A. M. SVENNERHOLM, A. S. G. FARUQUE, R. B. SACK (2005b): Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment and Prevention. Clin. Microbiol Rev. 18, 465–483.

QUIN, J., CARTER, M. E., MARKEY, B. K., CARTER, G. R. (1994): Bacteriology. U: Clinical veterinary microbiology. Wolf Publishing, London, str. 221.

RAVINDRAN, A. D. K., K. N. VISWANATHAN (2015): Foodborne Illness. U: Conn's current therapy. (Toppo, S., J. Ryan, ur.), Elsevier Saunders, Philadelphia, str. 94-104.

REIS, M. H., J. C. VASCONCELOS, L. R. TRABULSI (1980): Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in some processed raw food from animal origin. Appl. Environ. Microbiol. 39, 270–271.

RICE, E. W., M. J. ALLEN, S. C. EDBERG (1990): Efficacy of beta-glucuronidase assay for identification of *Escherichia coli* by the defined-substrate technology. *Appl. Environ. Microb.* 56, 1203–1205.

RIPPINGER, P., H. U. BERTSCHINGER, H. IMBERECHTS, B. NAGY, I. SORG, M. STAMM, P. WILD, W. WITTIG (1995): Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107, 2134P and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhoea and from oedema disease. *Vet Microbiol.* 45:281–295.

ROLLAND, K., N. LAMBERT-ZECHOVSKY, B. PICARD, E. DENAMUR (1998): Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli* strains are derived from distinct ancestral strains of *E. coli*. *Microbiology* 144, 2667–2672

SACK, R. B., A. SACK, I. J. MEHLMAN, F. ORSKOV, I. ORSKOV (1977): Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from food. *J. Infect. Dis.* 135, 313–317.

SAMADPOUR, D., J. E. ONGERTH, J. LISTON, N. TRAN, D. NGUYEN, T.S. WHITTAM, R.A. WILSON, P.I. TARR (1994): Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. *Appl. Environ. Microb.* 60, 1038–1040.

SÁNCHEZ, S., R. MARTÍNEZ, A. GÁRCIA, D. VIDAL, M. BLANCO, J. E. BLANCO, A. MORA, S. HERRERA-LEÓN, A. ECHEITA, J. M. ALONSO, J. REY (2010): Detection and characterisation of O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. *Vet. Microbiol.* 143. 420–423.

SCALETSKY, I. C. A., S. H. FABBRICOTTI, R. L. B. CARVALHO, C. L. NUNES, MARANHÃO, M. B. MORAIS, U. FEGUNDES-NETO (2002): Diffusely Adherent *Escherichia coli* as a Cause of Acute Diarrhea in Young Children in Northeast Brazil: a Case-Control Study. *J. Clin. Microbiol.* 40, 645–648.

SCALLAN, E., R. M. HOEKSTRA, F. J. ANGULO, R. V. TAUXE, M. WIDDOWSON, S. L. ROY, J. L. JONES, P. M. GRIFFIN (2011): Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 7–15.

SCAVIA, G., M. STAFFOLANI, S. FISICHELLA, G. STRIANO, S. COLLETTA, G. FERRI, M. ESCHER, F. MINELLI, A. CAPRIOLI (2008): Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis. *J. Med. Microbiol.* 57, 1141–1146.

SCHMIDT, H., L. BEUTIN, H. KARCH (1995): Molecular Analysis of the Plasmid-Encoded Hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 Strain EDL 933. *Infect. Immun.* 63, 1055–1061.

SEARS, C. L., J. B. KAPER (1996): Enteric Bacterial Toxins: Mechanisms of Action and Linkage to Intestinal Secretion. *Microbiol. Rev.* 60, 167–215

SERVIN (2005): Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 264–292.

SHAH, N., H. L. DUPONT, D. J. RAMSEY (2009): Global etiology of traveler's diarrhea: systematic review from 1973 to the present. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80, 609–614

SILVA, R. M., M. R. TOLEDO, L. R. TRABULSI (1980): Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 11, 441 – 444.

SINGER, R. S. (2015): Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals: evidence and data gaps. Front. Microbiol. 6, doi: 10.3389/fmicb.2015.00028.

SMITH, J. L., P. M. FRATAMICO, N. W. GUNTHER (2007): Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. Foodborne Pathog. Dis. 4, 134–163.

SON, I., R. BINET, A. MAOUNOUNEN-LAASRI, A. LIN, T.S. HAMMACK, J. A. KASE (2014): Detection of five Shiga toxin-producing *Escherichia coli* genes with multiplex PCR. Food. Microbiol. 40, 31–40.

SOUZA, M., G. KLASSEN, F. DE TONI, L. U. RIGO, C. HENKES, C. P. PIGATTO, C. DE BORBA DALAGASSA, C. FADEL-PICHETH (2010): Biochemical properties, enterohaemolysin production and plasmid carriage of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. Mem I Oswaldo Cruz. 105, 318–321.

SUKALIĆ (2015): Čimbenici virulencije bakterije *Escherichia coli* i njihov utjecaj na patoanatomske i histopatološke promjene u prasadi uginule od kolibaciloze. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.

TENNANT, S. M., M. TAUSCHEK, K. AZZOPARDI, A. BIGHAM, V. BENNETT-WOOD, E. L. HARTLAND, W. QI, T. S. WHITTAM, R. M. ROBINS-BROWNE (2009): Characterizations of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. BMC Microbiol. 9, doi.org/10.1186/1471-2180-9-117.

THOMSON-CARTER, F. (2001): General recovery, characterisation and typing protocols for VTEC. U: Verocytotoxigenic *E. coli*. (Duffy G., P. Garvey, D.A. MacDowell, ur.), Food & nutrition press, INC., Conneticut, str. 91–113.

TOSHIMA, H., E. UENAKA, Y. BI, H. NAKAMURA, J. OGASAWARA, A. HASE, Y. KAMATA, Y. NISHIKAWA(2004): Detection and isolation of *Escherichia coli* with a coding gene for enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin from food and comparison with fecal isolates. J. Food. Protect. 67, 2117–2122.

TRABULSI, L. R., R. KELLER, T. A. TARDELLI GOMES (2002): Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. Emerg. Infect. Dis. 8, 508–513.

TRKOV, M., T. RUPEL, D. ŽGUR-BERTOK, S. TRONTELJ, G. AVGUŠTIN, J. AMBROŽIĆ AVGUŠTIN (2014): Molecular Characterization of *Escherichia coli* Strains Isolated from Different Food Sources. Technol. Biotechnol. 52, 255–262.

TUTTLE, J., T.GOMEZ, M. P. DOYLE, J. G. WELLS, T. ZHAO, R. V. T AUX E P. M. GRIFFIN (1999): Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157 : H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. Epidemiol. Infect. 122, 185–192

VEILLEUX, S., J. D. DUBREUIL (2006): Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals. Vet. Res. 37, 3–13.

VERHAEGEN, B., K. DE REU, M. HEYNDRICKX, L. DE ZUTTER (2015): Comparison of six chromogenic agar media for the isolation of a broad variety of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serogroups. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 12, 6965–6978.

VINCENT, C., P. BOERLIN, D. DAIGNAULT, C. M. DOZOIS, L. DUTIL, C. GALANAKIS, R. J. REID-SMITH, P. P. TELLIER, P. A. TELLIS, K. ZIEBELL, A. R. MANGES (2010) Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 88–95.

WANI, S. A., I. HUSSAIN, S. A. BEG, M. A. RATHER, Z. A. KABLI, M. A. MIR, Y. NISHIKAWA (2013): Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Salmonella* in calves and lambs in Kashmir: absence, prevalence and antibiogram. *Rev. Sci. Tech .OIE* 32, 833–840.

WANG, L., M. WAKUSHIMA, T. AOTA, Y. YOSHIDA, T. KITA, T. MAEHARA, J. OGASAWARA, C. CHOI, Y. KAMATA, Y. HARA-KUDO, Y. NISHIKAWA (2013): Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolates from Diarrheal Patients and Comparison to Strains from Foods and Fecal Specimens from Cattle, Swine, and Healthy Carriers in Osaka City, Japan. *Appl. Environ. Microb.* 79, 1232–1240.

WEINTRAUB, A. (2007): Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. *J. Med. Microbiol.* 56, 4–8.

WIELER, L. H., T. SEMMLER, I. EICHHORN, E. M. ANTAO, B. KINNEMANN, L. GEUE, H. KARCH, S. GUENTHER, A. BETHE (2011): No evidence of the Shiga toxin-producing *E. coli* O104:H4 outbreak strain or enteroaggregative *E. coli* (EAEC) found in cattle faeces in northern Germany, the hotspot of the 2011 HUS outbreak area. *Gut Pathog.* 3, doi: 10.1186/1757-4749-3-17

WOLF., M. K. (1997): Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol Rev. 10, 569–584.

YAMAMOTO, T., P. ECHEVERRIA (1996): Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. Infect. Immun. 64, 1441–1445.

YAMAMURA, K., N. SUMI, Y. EGASHIRA, I. FUKUOKA, S. MOTOMURA, R. TSUCHIDA (1992): Food poisoning caused by enteroinvasive *Escherichia coli* (O164:H-) – a case in which the causative agent was identified. Kansenshogaku. Zasshi. 66, 761–768.

9. ŽIVOTOPIS

Dora Stojević rođena je 27.11.1984. godine u Zagrebu gdje je završila osnovnu i srednju školu. Veterinarski fakultet sveučilišta u Zagrebu upisala je 2002. godine, a diplomirala je 2010. godine. Vježbenički staž je odradila u Veterinarskoj ambulanti Noa od 2010. godine do 2011. godine, koje je također položila stručni ispit i stekla stručnu osposobljenost za samostalni rad na poslovima doktora veterinarske medicine.

Od studenog 2011. godine zaposlena je na Hrvatskom veterinarskom institutu u Zagrebu gdje stječe osnovne vještine rada u laboratoriju. Od siječnja 2012. godine zaposlena je na mjestu znanstvenog novaka na radnom mjestu asistenta u istom laboratoriju.

Tijekom rada u laboratoriju prošla je edukacije vezane uz sustav upravljanja kvalitetom i akreditacije laboratorija u Hrvatskom veterinarskom institutu.

Osim sudjelovanja u edukacijama u sklopu Hrvatskog veterinarskog instituta sudjelovala je u edukacijama i usavršalava se na području mikrobiološke i molekularne dijagnostike, na sljedećim radionicama:

„Study visit on MLST methodology“, Instituto G. Caporale, Teramo, Italija

„Study visit on microbiological testing criteriasFood Safety Center“, Bruxelles, Belgija

„Molecular typing of Verocytotoxin-producing (VTEC) by Pulse Field Gel Electrophoresis“, EU-RL VTEC, Instituto Superiore di Sanita, Rim, Italija

„Detection of VTEC in food matrices according to the ISO TS 13136:2012 and the characterization of the isolated VTEC strains“, EU-RL VTEC, Instituto Superiore di Sanita, Rim, Italija

POPIS OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA I POSTERA:

REIL, I., S. ŠPIČIĆ, G. KOMPES, S. DUVNJAK, M. ZDELAR-TUK, D. STOJEVIĆ, Ž. CVETNIĆ (2017): Netuberkulozne mikobakterije u gmazova u zatočeništvu i kućnih ljubimaca. *Acta Vet Brno*. 86, 101-107.

STOJEVIĆ, D., M. STEPANIĆ, V. DOBRANIĆ, A. HUMSKI (2016): Određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilocoka na Baird-Parker selektivnoj podlozi različitih proizvođača. *Veterinarska stanica* 47, 309-315

MIKULIĆ, M., A. HUMSKI, NJ. BELA, D. STOJEVIĆ, L. JURINOVIĆ, S. ŠPIČIĆ, S. DUVNJAK, Ž. CVETNIĆ (2017): Metode izdvajanja i dokazivanja bakterija roda *Campylobacter* – klasične i molekularne metode (I. dio). *Veterinarska stanica* 48, 297-303.

MIKULIĆ, M., I. RAČIĆ, S. DUVNJAK, A. HUMSKI, S. ŠPIČIĆ, D. STOJEVIĆ (2012): Identification of enterotoxin genes in coagulase-positive staphylococci isolated from retail foods. 5th Croatian Congress of Microbiology with International Participation, 26.-30.09., Opatija, Hrvatska, 89-89.

MIKULIĆ, M., A. HUMSKI, NJ. BELA, D. STOJEVIĆ, L. JURINOVIĆ, S. ŠPIČIĆ, S. DUVNJAK, Ž. CVETNIĆ (2017): Metode izdvajanja i dokazivanja bakterija roda *Campylobacter* – metode genotipizacije (II. dio). *Veterinarska stanica* 48, 357-363.