

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ARSTITEADUSKOND
MIKROBIOLOOGIA INSTITUUT

Jana Lillo

**Inimese kliinilistest materjalidest ja normaalsest soole mikrofloorast
isoleeritud *Escherichia coli* tüvede virulentsusfaktorid**

Magistritöö

Juhendajad vanemteadur Epp Sepp, MD, PhD, teadur Siiri Kõljalg, MD, PhD
Kaasjuhendaja vanemteadur Riho Teras, PhD

TARTU 2013

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. <i>Escherichia coli</i> üldiseloomustus	6
1.1.1. <i>E. coli</i> kuulumine inimese normaalsesse mikrofloorasse	6
1.1.2. <i>E. coli</i> põhjustatud infektsioonid	7
1.2. Sooleväliseid infektsioone põhjustava <i>E. coli</i> virulentusfaktorid	9
1.2.1. O ja K antigeenid ning seerumresistentsus	9
1.2.2. Adhesiinid	11
1.2.3. Invasiinid	12
1.2.4. Siderofoorid	13
1.2.5. Toksiinid	14
1.2.6. Laienendatud spektriga β -laktamaaside produktsioon	15
2. EKSPERIMENTAALOSA	17
2.1. Töö eesmärgid	17
2.2. Materjal ja meetodika	17
2.2.1. Töös kasutatud bakteritüved	17
2.2.2. Bakteritüvede identifitseerimine	18
2.2.3. ESBL _A ja ESBL _{M-C} kindlakstegemine antibiootikumi diskide abil	19
2.2.4. DNA eraldamine	19
2.2.5. Virulentsusgeenide määramine <i>multiplex</i> -PCR meetodiga	20
2.2.6. Fülogeneetiliste gruppide määramine	23
2.2.7. Statistiline analüüs	24
2.3. Tulemused	25
2.3.1. Virulentsusgeenide esinemissagedused <i>E. coli</i> tüvedel	25
2.3.3. Seedetraktist, uriinist ja verest isoleeritud ESBL-negatiivsete <i>E. coli</i> tüvede virulentsusfaktorid	28
2.3.4. Erinevate riikide kliinilistest materjalidest isoleeritud ESBL-positiivsete <i>E. coli</i> tüvede virulentsusfaktorid	29
2.3.5. ESBL-positiivsete ja ESBL-negatiivsete uriinist isoleeritud <i>E. coli</i> tüvede virulentsusfaktorid	31
2.4. Arutelu	33
KOKKUVÕTE	39

SUMMARY	40
KIRJANDUSE LOETELU	42
KASUTATUD VEEBIAADDRESS.....	52
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	53

KASUTATUD LÜHENDID

BMEC – aju mikrovaskulaarse endoteeli rakud (ingl k *brain microvascular endothelial cells*)

C – klavulaanhape

CAZ – tseftasidiim

CDT – tsütoletaalne paisutav toksiin (ingl k *cytolethal distending toxin*)

CNF1 – tsütotoksiline nekrotiseeriv faktor 1 (ingl k *cytotoxic necrotizing factor 1*)

CTX – tsefotaksiim

CX – kloksatsilliin

DAEC – diffuusselt kinnituv *E. coli* (ingl k *diffusely adherent E. coli*)

EAEC – enteroagregatiivne *E. coli* (ingl k *enteroaggregative E. coli*)

EHEC – enterohemorraagiline *E. coli* (ingl k *enterohemorrhagic E. coli*)

EIEC – enteroinvasiivne *E. coli* (ingl k *enteroinvasive E. coli*)

EPEC – enteropatogeenne *E. coli* (ingl k *enteropathogenic E. coli*)

ESBL – laiendatud spektriga β -laktamaas (ingl k *extended spectrum β -lactamase*)

ETEC – enterotoksigeenne *E. coli* (ingl k *enterotoxigenic E. coli*)

ExPEC – sooleväline patogeenne *E. coli* (ingl k *extraintestinal pathogenic E. coli*)

LPS – lipopolüsahhariidid

MALDI-TOF – ingl k *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*

NMEC – vastsündinute meningiiti põhjustav *E. coli* (ingl k *neonatal meningitis-associated E. coli*)

PAI – patogeensussaareke (ingl k *pathogenicity island*)

SAT – sekreteeriv autotransporter-valk (ingl k *secreted autotransporter protein*)

SEPEC – sepsist põhjustav *E. coli* (ingl k *sepsis-associated E. coli*)

UPEC – uropatogeenne *E. coli* (ingl k *uropathogenic E. coli*)

VF – virulentsusfaktor

SISSEJUHATUS

Escherichia coli on Gram-negatiivne pulgakujuline bakter, mis koloniseerib inimese ja teiste püsisoojaste organismide soolestikku. Tüved on enamjaolt kommensaalsed, kuid leidub ka palju patogeenseid tüvesid, mis on võimelised tekitama infektsioone väga paljudes keha piirkondades. Patogeensed tüved jaotatakse soolesisesteks ja soolevälisteks vastavalt sellele, kus nad infektsioone põhjustavad.

Sooleväliselt patogeensed *E. coli* (ExPEC, ingl k *extraintestinal pathogenic Escherichia coli*) tüved põhjustavad kõige sagedamini uroinfektsioone, vereinfektsioone ja vastsündinute meningiiti. ExPEC tüvedel on leitud erinevaid virulentsusfaktoreid kodeerivaid geene, mis on vajalikud infektsiooni põhjustamisel. Nende hulka kuuluvad adhesiinide, kapsli sünteesi, toksiinide, invasiinide, siderofooride ning antibiootikumiresistentsuse geenid. Nimetatud virulentsusfaktorite abil on bakter võimeline peremeesorganismi koloniseerima, tungima tema kudedesse, immuunreaktsiooni eest kõrvale hoidma ning toitaineid omastama.

E. coli infektsioonide puhul on suureks probleemiks bakterite resistentsus β -laktaam antibiootikumidele. Laiendatud spektriga β -laktamaaside (ESBL, ingl k *extended spectrum β -lactamase*) tootmine on *E. coli* puhul üheks antibiootikumiresistentsuse mehhanismiks.

On tehtud palju uuringuid, mis käsitlevad virulentsusfaktoreid erinevatest kliinilistest materjalidest isoleeritud *E. coli* tüvedel, samas aga ei ole lõpuni selge, millised neist on hädavajalikud infektsiooni põhjustamisel. Samuti on väga vähe andmeid erinevatest geograafilistest piirkondadest pärit *E. coli* tüvede virulentsusfaktorite erinevusest.

Töö eesmärgiks oli võrrelda *E. coli* tüvede virulentsusfaktoreid kodeerivate geenide esinemist: (1) erinevatesse fülogruppidesse kuuluvatel tüvedel, (2) patogeensetel ja kommensaalsetel tüvedel, (3) ESBL-positiivsetel ja ESBL-negatiivsetel tüvedel ning (4) Eestis, Lätis, Leedus ja Venemaal isoleeritud ESBL-positiivsetel tüvedel.

Töö tehti Tartu Ülikooli arstiteaduskonna mikrobioloogia instituudis. Täna oma juhendajaid Epp Seppa ning Siiri Kõljalga, kes aitasid käesolevat tööd kirjutada, Kristi Huiki, kes oli abiks praktilises töös ning kaasjuhendajat Riho Terast konstruktiivse kriitika eest. Samuti sooviksin tänada kõiki laborikaaslast meeldiva töökeskkonna loomise eest.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. *Escherichia coli* üldisloomustus

Escherichia coli on Gram-negatiivne fakultatiivne anaeroobne pulgakujuline bakter. *E. coli*'t leidub inimeste ja teiste püsisoojaste loomade seedekulglas. Seedekulglast satuvad tüved väliskeskkonda ning on võimelised seal elama ja ka paljunema. *E. coli*'t kasutatakse keskkonna saastatuse määramiseks kui indikaatororganismi (Ishii ja Sadowsky, 2008; Tenaillon jt, 2010).

Inimest koloniseerivad *E. coli* tüved võib jagada kolme gruppi: kommensaalsed tüved, soolesisesed patogeensed tüved ning soolevälised patogeensed tüved (Russo ja Johnson, 2000). Patogeensetel *E. coli* tüvedel on leitud palju virulentsusfaktoreid, mis on otseses seoses esile kutsutud infektisoonidega (Johnson, 1991).

Kuna *E. coli* elab väga erinevates keskkondades, on bakteritüvedel palju strateegiaid keskkonnatingimustega kohanemiseks. *E. coli* genoom on väga plastiline ning eri keskkondades elavatel tüvedel on olemas kohastumisega seotud geeniklastrid. Touchon jt (2009) leidsid 20 kommensaalse ja patogeense tüve sekveneerimisel, et keskmine *E. coli* genoom koosneb ligikaudu 4700 geenist, kuid umbes 2000 geeni on konserveerunud kõigil tüvedel (Touchon jt, 2009).

Fülogeneetilise päritolu põhjal võib *E. coli* tüved jagada erinevatesse gruppidesse. Clermont jt töötasid 2000 aastal välja *multiplex*-PCR-i, mis näitab *E. coli* tüvede kuuluvust ühte neljast enamlevinud fülogeneetilisest grupist A, B1, B2 ja D (Clermont jt, 2000). Gruppidesse A ja B1 kuuluvad põhilised kommensaalsed tüved, mida võib leida inimese ja loomade seedekulglas, aga ka väliskeskkonnast. Nendel tüvedel on vähe virulensusgeene, aga nad võivad põhjustada haigusi immuunpuudulikkusega inimestel. B2 ja D gruppi kuuluvad patogeensed tüved, millel on tavaliselt mitmed erinevad virulensusfaktorid ning mis põhjustavad sageli infektsioone (Picard jt, 1999; Rijavec jt, 2008). On näidatud, et soolevälised patogeensed tüved (ExPEC, ingl k *extraintestinal pathogenic E. coli*) kuuluvad põhiliselt B2 gruppi ning vähemal määral D gruppi (Escobar-Paramo jt, 2004).

1.1.1. *E. coli* kuulumine inimese normaalsesse mikrofloorasse

Kommensaalsed *E. coli* tüved moodustavad osa normaalsest soole mikrofloorast inimesel, teistel imetajatel ja lindudel. Need tüved on adapteerunud rahulikuks

kooseksisteerimiseks peremeesorganismiga, neil on vähe või ei ole üldse virulentsusgeene ning nad ei tekita infektsioone (Russo ja Johnson, 2000).

E. coli koloniseerib inimese soole varajases imikueas. Vaginaalsel teel sündinud lapsed saavad oma esmased *E. coli* tüved ema sünnitusteedest ning nende kolonisatsioon *E. coli*’ga toimub varem kui keisrilõikega sündinud lastel (Nowrouzian jt, 2003).

Kommensaalsed *E. coli* tüved koloniseerivad jämesoole limaskestast, mis katab soole epiteelirakkude pinda, ning baktereid eritatakse koos väljaheitega (Poulsen jt, 1994). Limaskestas sisalduvaid toitaineid on *E. coli*’l kerge omastada, kuna tal on olemas vajalikud metabolismirajad (Chang jt, 2004b). Kuigi suhet mittepatoogeensete *E. coli* tüvede ning peremeesorganismi vahel nimetatakse kommensalismiks, saab ka peremeesorganism kommensaalsest mikrofloorast mõningast kasu. Kommensaalne mikrofloora võib tagada kolonisatsiooniresistentsuse - kaitse patoogeensete tüvede eest, kasutades ära olemasolevad toidained (Maltby jt, 2013).

Inimese kommensaalse mikrofloora koostis ei ole stabiilne. Tavaliselt domineerib ühel ajahetkel soolestikus üks või paar *E. coli* tüve, mis püsivad mõne aja jooksul ning seejärel asenduvad teiste tüvedega (Caugant jt, 1981; Schlager jt, 2002). Seedekulgla kommensaalse *E. coli* populatsiooni mõjutab geograafiline piirkond, kus inimene elab. Elukoha vahetamisel toimuvad muutused ka kommensaalse mikrofloora koostises (Skurnik jt, 2008). Samuti on näidatud, et sama *E. coli* tüvi võib levida inimese pereliikmete vahel ning isegi inimeselt koduloomale ja vastupidi (Johnson jt, 2008).

1.1.2. *E. coli* põhjustatud infektsioonid

Patogeensed *E. coli* tüved võib jagada soolevälisteks ning soolesisesteks vastavalt sellele, kus nad infektsioone põhjustavad. Sooleinfektsioone põhjustavaid *E. coli* tüvesid võib omakorda jagada kuude gruppi: enterotoksigeenne (ETEC; ingl k *enterotoxigenic E. coli*), enterohemorraagiline (EHEC; ingl k *enterohemorrhagic E. coli*), enteropatoogeenne (EPEC; ingl k *enteropathogenic E. coli*), enteroinvasiivne (EIEC; ingl k *enteroinvasive E. coli*), enteroagregatiivne (EAEC; ingl k *enteroaggregative E. coli*), ja diffuusselt kinnituv (DAEC; ingl k *diffusely adherent E. coli*) *E. coli*. Igal patotüübil on unikaalne virulentusfaktorite kombinatsioon, mis tagab iseloomuliku patogeensusmehhanismi ja kliinilised sümptomid. Vaatamata nende tüvede võimele põhjustada soolesiseseid haigusi, on nad enamasti võimetud põhjustama infektsioone väljaspool soolt (Nataro ja Kaper, 1998).

Patogeensed soolevälised *E. coli* (ExPEC; ingl k *extraintestinal pathogenic E. coli*) tüved põhjustavad keskkonnatekkelisi ja haiglasisesid infektsioone. ExPEC tüvede hulka kuuluvad uropatogeensed tüved (UPEC; ingl k *uropathogenic E. coli*), bakterieemiat põhjustavad tüved (SEPEC; ingl k *sepsis-associated E. coli*) ning vastsündinute meningiiti põhjustavad tüved (NMEC; ingl k *neonatal meningitis-associated E. coli*). ExPEC infektsioonid esinevad kõigis vanusegruppides ning on väga erineva lokalisatsiooniga. Kõige sagedasemad on uroteede, kõhuõõne, pehmete kudede ja hingamisteede infektsioonid ning vastsündinute meningiit. Nende kõigiga võib kaasneda bakterieemia, ehk bakterite esinemine veres (Russo ja Johnson, 2000; Russo ja Johnson, 2003).

ExPEC tüvedel arvatakse olevat mitmeid reservuaare. Inimese seedetrakt on üheks reservuaariks, kuna ExPEC tüved võivad kuuluda inimeste normaalsesse mikrofloorasse, koloniseerides soolt asümptomaatiliselt. Translokatsiooni korral (levides soolest välja) on nad võimelised koloniseerima teisi keha piirkondi ning põhjustama sooleväliseid infektsioone (Kohler ja Dobrindt, 2011). Teised ExPEC tüvede võimalikud reservuaarid on lemmikloomad, toiduks kasutatavad loomad ja linnud, reovesi ning muud keskkondlikud tegurid (Hamelin jt, 2007; Johnson jt, 2008; Jakobsen jt, 2010; Clermont jt, 2011).

Uroinfektsioonid on ühed levinuimaid infektsioonid maailmas. Kuni 90% kõigist uroinfektsioonidest põhjustab uropatogeenne *E. coli*. *E. coli* põhjustab põiepõletikku ehk tsüstiiti ja neeruvaagana põletikku ehk püelonefriiti. Naistel esineb uroinfektsioone palju sagedamini kui meestel. Foxman jt (2000) andmetel põeb kuni 60% naistest elu jooksul vähemalt ühe korra uroinfektsiooni ning paljudel esineb korduvaid haiguse episoodide (Foxman jt, 2000). Tihti on korduvate infektsioonide põhjustajaks sama bakteritüvi (Russo jt, 1995b; Koljalg jt, 2009).

Kuigi uroinfektsioonid on võrdlemisi lihtsalt ravitavad, võivad need põhjustada tõsiseid komplikatsioone (Foxman, 2003; Nicolle, 2008). Uroinfektsiooni korral on uriinis bakterid ja leukotsüüdid ning urineerimine on valulik. Neerupõletiku puhul võivad lisaks eelmainitud sümptomitele esineda valu, palavik ja oksendamine (Hunstad ja Justice, 2010).

Uropatogeensetel *E. coli* tüvedel on leitud palju erinevaid virulentsusfaktoreid, mille tõttu on nad võimelised põhjustama infektsioone alumistes ja ülemistes uroteedes. UPEC tüvede hädavajalikeks virulentsusfaktoriteks peetakse uroepiteelile kinnitumiseks vajalikke fimbriaid ning polüsahhariidset kapslit, mis kaitseb bakterit peremehe immuunsüsteemi eest (Bahrani-Mougeot jt, 2002; Crepin jt, 2012).

Bakterieemiaks nimetatakse mikroorganismide esinemist veres. *E. coli* on üks sagedasemaid bakterieemia põhjustajaid ning sellega kaasneb ka kõrge suremus (Diekema jt, 2003; Uslan jt, 2007; Skogberg jt, 2008). Riskifaktorid bakterieemia tekkeks on

immuunpuudulikkus, veenisisesed kateetrid, transplantatsioonid aga ka uro- ja seedetrakti infektsioonid (Jauregui jt, 2007; Kumpf ja Schumann, 2008; Cooke jt, 2010; Silva jt, 2010).

Bakterieemiat põhjustavatel *E. coli* tüvedel (SEPEC) on leitud rohkelt virulentsusfaktoreid (Sannes jt, 2004; Ananias ja Yano, 2008). Vereinfektsioonide tekitajate puhul peetakse väga olulisteks siderofoore, mille abil saavad bakterid keskkonnast rauda kätte ning seerumresistentsust, mis kaitseb bakterit peremeesorganismi immuunvastuse eest. Suuremal osal verest isoleeritud *E. coli* tüvedest on need virulentsusfaktorid olemas (Ananias ja Yano, 2008; Cooke jt, 2010).

1.2. Sooleväliseid infektsioone põhjustava *E. coli* virulentusfaktorid

E. coli patogeensus on korrelatsioonis virulentsusgeenide olemasoluga, mis kodeerivad erinevaid virulentsusfaktoreid. Virulentsusgeenid võivad bakteritüvede vahel edasi kanduda nii vertikaalselt kui horisontaalselt (Johnson jt, 2001). Adhesiine, toksiine, antibiootikumiresistentsust ja teisi virulentsusfaktoreid kodeerivad geenid võivad asuda ülekanduvatel geneetilistel elementidel nagu transposoonid, plasmiidid või bakteriofaagid (Waldor ja Mekalanos, 1996; Venturini jt, 2010; Bailey jt, 2011). Lisaks võivad virulentsusgeenid asuda regioonides bakteri kromosoomis, mida nimetatakse patogeensussaarteks (PAI; ingl k *pathogenicity island*) (Hacker jt, 1990; Blum jt, 1994).

ExPEC tüvedel on leitud erinevaid virulentsusfaktorite geene. Virulentsusfaktorid on olulised peremehe koloniseerimiseks ja kudedesse tungimiseks (adhesiinid, invasiinid, toksiinid), immuunsüsteemi eest kõrvalehoidmiseks (kapsel, seerumresistentsus), toitainete kättesaamiseks (siderofoorid). Lisaks eelmainitutele virulentsusfaktoritele on paljudel ExPEC tüvedel võime toota laienendatud spektriga β -laktamaase (ESBL, ingl k *extended spectrum β -lactamase*), mis annavad bakterile resistentsuse β -laktaam antibiootikumidele (Kohler ja Dobrindt, 2011; Pitout, 2012).

1.2.1. O ja K antigeenid ning seerumresistentsus

Bakterieemiat põhjustavad patogeensed *E. coli* tüved peavad olema kaitstud vereseerumi antibakteriaalsete omaduste eest, milles põhilist rolli mängib komplemendi süsteem. *E. coli* ekspresseerib raku pinnal 3 tüüpi pinnaantigene: O - lipopolüsahhariidsed, H

- flagellaarsed ja K - kapsullaarsed pinnaantigeenid (Orskov ja Orskov, 1992). O ja K antigeenid on olulised hoidumisel peremeesorganismi immuunvastuse eest (Johnson, 1991).

Lipopolüsahhariidid (LPS) on Gram-negatiivsete bakterite välismembraani põhiline koostisosa. LPS koosneb kolmest osast: lipiid A, südamik-polüsahhariid ning O-polüsahhariid (O-antigeen). O-antigeeni struktuur määrab *E. coli* serogruppi (Valvano, 1992). Tuntakse üle 170 erinevat O-antigeeni (Orskov ja Orskov, 1992).

On näidatud, et mõned O antigeenid võivad bakterirakku kaitsta komplemendi ning fagotsütoosi eest. Näiteks O75 ja O18 serogruppi kuuluvad LPS kaitsevad bakterit peremehe immuunsüsteemi eest, samas kui O4 serogruppi kuuluvad LPS, mida on leitud sooleväliseid infektsioone põhjustavatel tüvedel, bakterit ei kaitse (Russo jt, 1995a; Burns ja Hull, 1998; Burns ja Hull, 1999).

Paljudel *E. coli* tüvedel on kogu rakupinda katvad ning sellega seotud polüsahhariidsed struktuurid, mida nimetatakse kapsliteks. *E. coli* kapslid on väga mitmekesised, eristatakse üle 80 kapsli polüsahhariidide (K-antigeenid) serotüübi. Kapslid saab geneetilistel ja biokeemilistel alustel jagada nelja gruppi (Whitfield ja Roberts, 1999). *E. coli* tüvesid, mis toodavad gruppidesse II ja III kuuluvad kapsleid seostatakse sooleväliste infektsioonidega (Whitfield, 2006). On leitud, et kapsel on oluline virulentsusfaktor uroinfektsioone põhjustavatel tüvedel ning vajalik bakteri ellujäämiseks uroteedes (Bahrani-Mougeot jt, 2002; Buckles jt, 2009).

Kapsel võib bakterit kaitsta peremeesorganismi immuunsüsteemi eest, inhibeerides komplemendi aktivatsiooni ning fagotsütoosi (Horwitz ja Silverstein, 1980). Kapsli kaitsvad omadused sõltuvad selle koostisest. Mitmed uuringud näitavad, et gruppi II kuuluvad K1 ja K2 antigeensed kapslid on olulised seerumresistentuse faktorid (Allen jt, 1987; Vermeulen jt, 1988; Leying jt, 1990; Buckles jt, 2009). Samas teised K antigeenid ei pruugi kaitsta komplemendi eest (Opal jt, 1982).

Lisaks O- ja K-antigeenidele mängib bakteri seerumresistentuse kujunemisel olulist rolli välismembraani pinnal ekspresseeritav lipoproteiin TraT, mida kodeerib plasmiidne geen *traT* (Moll jt, 1980). TraT suurendab bakterite vastupanuvõimet komplemendi lüütilisele aktiivsusele ning fagotsütoosile (Aguero jt, 1984; Rhen ja Sukupolvi, 1988). *TraT* geeni on leitud rohkem septitseemiat põhjustavatel *E. coli* tüvedel kui normaalse mikrofloora tüvedel (Montenegro jt, 1985). Samuti on geeni leitud paljudel uropatogeensetel *E. coli* tüvedel (Oliveira jt, 2011).

1.2.2. Adhesiinid

Peremeesorganismi koloniseerimine algab bakteri kinnitumisega peremehe epiteelirakkude retseptoritele, mis toimub adhesiinide vahendusel. Seedetraktiväliseid infektsioone põhjustavatel *E. coli* tüvedel on leitud mitu fimbrialse adhesiinide perekonda: tüüp 1 fimbriad (*fim*), P-fimbriad (*pap*), S-fimbriad (*sfa*), F1C-fimbriad (*foc*), Dr-fimbriad (*dra*) ning mittefimbrialse adhesiini (Wright ja Hultgren, 2006; Antao jt, 2009).

Tüüp1 fimbriad seonduvad D-mannoosi ning mannotrioosi jääkidele, mida leidub põie luumenipoolse epiteeli pinnal. Fimbria tipus asub valk FimH, mis moodustab mannoosi-siduva tasku ning mille vahendusel toimub seondumine retseptormolekulile. Tüüp 1 fimbriad on suure tähtsusega põie koloniseerimisel (Krogfelt jt, 1990; Hung jt, 2002). 50-70% *E. coli* tüvedest sisaldab tüüp 1 fimbriate geene (Klemm jt, 1982). FimH valku on vaadeldud vaktsiini kandidaadina uroinfektsioonide vastu, kuna leiti, et üle 90% uropatogeensetest *E. coli* tüvedest võib seda valku ekspresseerida (Langermann jt, 1997).

P-fimbriad on morfoloogiliselt sarnased tüüp 1 fimbriatega, kuid nad seonduvad teistele retseptoritele. P-fimbriate retseptoriks on inimese P-veregrupi spetsiifilised glükosfingolipiidid erütrotsüütidel ning uroepiteelis, mis sisaldavad α -D-Galp-(1-4)- β -D-Galp järjestust (Korhonen jt, 1982). P-fimbriad on leitud 90% uroinfektsioone põhjustanud tüvedel (Kallénus jt, 1981). On täheldatud, et need võivad olla olulised ka baktereemia põhjustamisel (Otto jt, 1993). P-fimbriad kodeerib *pap* geeniklaster, kuhu kuulub 11 geeni. *PapG* kodeerib P-fimbria tipuadhesiini ning vastutab retseptorile seondumise eest. On leitud mitu erinevat *papG* varianti (Lund jt, 1987; Mitsumori jt, 1998; Lane ja Mobley, 2007).

S-fimbriad on morfoloogiliselt sarnased tüüp 1 ja P-fimbriatega ning nende retseptoriteks on sialüül-galaktosiidid (Korhonen jt, 1984; Parkkinen jt, 1986). S-fimbriad seonduvad neerude epiteelile ning vaskulaarsele endoteelile (Korhonen jt, 1986). S-fimbriad ekspresseerivad *E. coli* tüvesid on seostatud sepsise ja vastsündinute meningiidiga ning on näidatud, et hematoentsefaalbarjääri läbimisele eelneb *E. coli* seondumine aju mikrovaskulaarse endoteeli rakkudele S-fimbriate abil (Parkkinen jt, 1986; Stins jt, 1994).

F1C-fimbriate retseptoriteks on kaks glükosfingolipiidi (galaktosüülteramiid ning globotriaosüülteramiid), mida on isoleeritud roti, küüliku ning inimese urotraktist (Backhed jt, 2002). Kuigi F1C- ning S-fimbriate retseptorid on erinevad, on need kaks fimbriate perekonda omavahel lähedases suguluses, nende DNA järjestused on homoloogilised (Ott jt, 1988).

Dr-perekonna fimbriad seonduvad Dr-antigeenidele inimese neeru tubulaarses basaalmembraanis ning Bowmanni kapslis (Nowicki jt, 1988). Dr-fimbriaid ekspresseerivatel tüvedel on suurenenud võime põhjustada neerupõletikke (Goluszko jt, 1997).

Lisaks erinevaid fimbriaid kodeerivatele geenidele on ExPEC tüvedel ka mittefimbrialisi adhesiine kodeerivaid geeniklastreid: *afa*, *nfa* ja *bma*. *Afa* geeniklaster kodeerib Afa perekonna adhesiine, mida leidub nii uropatogeensetel kui sooleinfektsioone põhjustavatel *E. coli* tüvedel (Germani jt, 1997). Afa adhesiinid seonduvad samuti nagu Dr-fimbriad Dr-antigeenidele, kuid tõenäoliselt teisele epitoobile (Nowicki jt, 1990). *Nfa* geeniklaster, mis koosneb viiest erinevast geenist (*nfaA-nfaE*) kodeerib Nfa perekonna mittefimbrialisi adhesiine, mille retseptoreid on leitud inimese erütrotsüütide pinnal. Nfa adhesiine on detekteeritud uropatogeensetel tüvedel (Goldhar jt, 1987; Ahrens jt, 1993). Patogeensetel *E. coli* tüvedel on leitud ka M-veregrupi spetsiifiline mittefimbrialine adhesiin, mida kodeerib 5 geenist (*bmaA-bmaE*) koosnev geeniklaster (Rhen jt, 1986).

1.2.3. Invasiinid

Bakterieemia saab tihti alguse uroinfektsioonist (Marschall jt, 2012). Kirjanduses on vähe andmeid SEPEC tüvede vereringesse tungimise mehhanismist, aga arvatakse, et haigustekitajad sisenevad neerude kaudu ning olulist rolli mängivad adhesiinid (Conceicao jt, 2012). Mokady jt (2005) võrdlesid bakterieemiat põhjustavaid *E. coli* tüvesid ja leidsid, et tüvedel on vähe ühiseid virulentsusgeene. Arvatakse, et erinevad SEPEC tüved kasutavad ühes infektsioonietapis erinevad virulentsusfaktoreid ning igal tüvel võib olla unikaalne virulentsusfaktorite kombinatsioon (Mokady jt, 2005).

E. coli põhjustab vastsündinutel meningiiti (Chang jt, 2004a). Haigust põhjustavad need veres tsirkuleerivad *E. coli* tüved, mis on võimelised läbima hematoentsefaalbarjääri. Hematoentsefaalbarjäär koosneb mikrovaskulaarse endoteeli rakkudest (BMEC; ingl k *brain microvascular endothelial cells*): astrotsüütidest ja peritsüütidest. Eelduseks hematoentsefaalbarjääri läbimisele on võime esmalt seonduda ning seejärel tungida BMEC rakkudesse (Kim, 2001; Kim, 2006).

E. coli tungimisel kesknärvisüsteemi on olulised mitmed virulentsusfaktorid. Kinnitumisel BMEC rakkudele on tähtsal kohal tüüp 1 ja S-fimbriad, välismembraanis paiknev OmpA ja transmembraanne IbeA (Ibe10) valk (Stins jt, 1994; Huang jt, 1995; Huang jt, 2001; Shin jt, 2005; Teng jt, 2005). BMEC rakkude pinnalt on leitud IbeA retseptor ning arvatakse, et IbeA soodustab invasiooni kesknärvisüsteemi seondudes BMEC rakkudele

(Prasadarao jt, 1999). Kuigi täpne mehhanism on siiani ebaselge, arvatakse, et meningiiti põhjustav *E. coli* tüvi K1 kasutab BMEC rakkudesse tungimisel peremeesrakkude Rac1 GTP-aasi aktivatsiooni. Näidati, et valkudel IbeA ning OmpA on oluline roll Rac1 aktiveerimisel (Maruvada ja Kim, 2012).

1.2.4. Siderofoorid

E. coli vajab elutegevuseks rauda. Inimkehas on bakteritele kättesaadavat rauda vähe. Suurem osa rauavarudest rakkude sees on seotud hemoglobiini, heemi, ferritini või hemosideriini kujul, rakuväline raud on seotud transferriini ja laktoferriini koosseisu (Litwin ja Calderwood, 1993).

Selleks, et inimkehas rauda kätte saada, toodavad bakterid siderofoore ja ferrisiderofooride (raud-siderofoor kompleks) retseptoreid. Siderofoorid on madalmolekulaarsed ühendid, millel on kõrge afiinsus Fe^{3+} ionide suhtes (Clarke jt, 2001). Rauavaeses keskkonnas nagu veri ja uriin sünteesivad bakterid siderofoore ning sekreteerivad need keskkonda (Opal jt, 1990; Schubert jt, 2000). Siderofoorid suudavad efektiivselt konkureerida imetajate rauda siduvate valkudega ning Fe^{3+} nendest kätte saada. Bakterid tunnevad ferrisiderofoori ära spetsiaalsete retseptorite abil ning ferrisiderofoor transporditakse bakterirakku (Chakraborty jt, 2007). ExPEC tüved on võimelised tootma nelja erinevat siderofoori: aerobaktiini, enterobaktiini (enterokeliin), salmokeliini ja jersiniabaktiini (Watts jt, 2012).

Aerobaktiin on hüdroksamaatne siderofoor, mida kodeerib operon *iucABCD iutA*, IutA on ferriaerobaktiini retseptor (de Lorenzo jt, 1986). Aerobaktiin on uropatogeense *E. coli* oluline virulentsusfaktor (Gao jt, 2012).

Enterobaktiin on katehhoolne siderofoor, mida toodavad nii patogeensed kui kommensaalsed *E. coli* tüved ning seda ei loeta virulentsusfaktoriks (Bhattacharya ja Bhattacharya, 2007). Enterobaktiinil ei ole tähtsust infektsiooni põhjustamisel, kuna selle seob ära valk siderokaliin, mida sekreteerivad makrofaagid põletiku käigus (Flo jt, 2004).

Salmokeliin on enterobaktiini C-glükosüleeritud derivaat ning tunduvalt efektiivsem siderofoor (Bister jt, 2004). Algselt avastati salmokeliin *Salmonella enterica* tüvedel, aga seda toodavad ka uropatogeensed *E. coli* tüved. Ferrisalmokeliini tunneb ära välismembraanis paiknev valk IroN (Hantke jt, 2003). Salmokeliini geenid võivad paikneda bakteri genoomis või ColV virulentsusplasmiidil (Johnson jt, 2006). Siderofoori on leitud rohkem ExPEC

tüvedel, mis põhjustavad vastsündinute meningiiti ja uroinfektsioone (Bauer jt, 2002; Negre jt, 2004).

Jersiniabaktiin on fenolaatne siderofoor, mida toodavad paljud ExPEC tüved ning mis algselt avastati *Yersinia* perekonna liikidel (Schubert jt, 2002). Jersiniabaktiini kodeerivad geenid asuvad *Yersinia* patogeensussaarel, mis on horisontaalselt liikunud *E. coli*’le. FyuA on jersiniabaktiini retseptor (Pelludat jt, 1998; Schubert jt, 1998). On leitud seos ExPEC tüvede virulentsuse ja jersiniabaktiini vahel (Schubert jt, 2002).

1.2.5. Toksiinid

Soolevälise patogeense *E. coli* tüved toodavad mitut toksiini, mis on olulised virulentsusfaktorid ExPEC-i põhjustatud haiguste patogeneesis.

Hemolüsiin α (HlyA) on tsütolüütiline valguline toksiin, mida sekreteerivad enamused hemolüütilisi *E. coli* tüvesid ning mis lüüsib imetajate erütrotsüüte (Rennie ja Arbuthnott, 1974). Hemolüsiini toodavad bakterid eksponentsiaalses kasvufaasis ning sekreteerivad selle rakust välja. HlyA tootmiseks ning sekretsiooniks vajalikud geenid võivad paikneda bakteri kromosoomis või plasmiidil (Cavalieri jt, 1984). Hemolüsiin α molekulid moodustavad erütrotsüütide membraanidesse umbes 2 nm diameetriga kanalid, mis võimaldavad katioonide sissevoolu rakkudesse. Kõrge HlyA kontsentratsiooni juures rakud lüüsuvad (Bhakdi jt, 1986; Menestrina jt, 1987). Lisaks erütrotsüütidele avaldab HlyA tsütotoksilist mõju ka teistele rakkudele, sealhulgas vererakkudele ning neeru tubulaarsetele rakkudele (Gadeberg jt, 1983; König jt, 1986; Keane jt, 1987).

Tsütotoksiline nekrotiseeriv faktor 1 (CNF1; ingl k *cytotoxic necrotizing factor 1*) on toksiin, mis seondub peremeesraku pinna laminiini retseptori prekursoriga ning siseneb endotsütoosiga rakku (Contamin jt, 2000; Chung jt, 2003). CNF1 stimuleerib Rho GTPaasi-sõltuvat aktiinkiuude ümberkorraldust ning membraani sopistuste teket (Flatau jt, 1997). On näidatud ka CNF1 apoptoosi esilekutsuvat toimet uroepiteeli rakkudele (Mills jt, 2000). Samuti on näidatud CNF1 olulisust *E. coli* tüve K1 tungimisel inimese kesknärvisüsteemi (Khan jt, 2002).

Sekreteeritav autotransporter-valk (SAT; ingl k *secreted autotransporter protein*) on uropatogeense *E. coli* virulentsusfaktor, mis kuulub SPATE (ingl k *serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae*) perekonda (Guyer jt, 2000). Bakterid sekreteerivad SAT valku tüüp V sekretsioonisüsteemi abil (Henderson jt, 2004). Toksiinil on leitud tsütopatogeenne aktiivsus neeru- ja põieepiteeli rakkudele. SAT kahjustab neeruepiteeli -

toimub neerude glomerulaarmembraani rakkudevaheliste kontaktide nõrgenemine ning proksimaalsete tuubulite rakkude vakuoliseerumine (Guyer jt, 2002).

Tsütoletaalne paisutav toksiin (CDT; ingl k *cytolethal distending toxin*) blokeerib eukariootsete rakkude rakutsükli (Peres jt, 1997). CDT on kolmest monomeerist (CdtA, CdtB ja CdtC) koosnev valk. CdtB on nukleas, mis lõikab peremeesraku DNA-d, CdtA ja CdtC vastutavad CdtB transpordi eest peremeesrakku (Lara-Tejero ja Galan, 2000; Lee jt, 2003). CDT sünteesiks vajalikud geenid *cdtA*, *cdtB* ja *cdtC* võivad asuda kromosoomis või plasmiidil (Scott ja Kaper, 1994; Peres jt, 1997). *E. coli*'l on avastatud 5 erinevat CDT tüüpi: CDT-I – V (Toth jt, 2009). Kuigi CDT toksiini on seostatud rohkem soolesiseste patogeensete *E. coli* tüvedega, on seda leitud olulisel hulgal ka ExPEC esindajate seas (Clarke, 2001; Johnson jt, 2002b).

Kolitsiin V (ColV) on bakteriotsiinide klassi kuuluv toksiin. Bakteriotsiinid on antimikroobsed peptiidid, mida sekreteerivad paljud *E. coli* tüved, et tappa lähedalt suguluses olevad bakterid, vähendades sellega konkurentsi toitainetele. *E. coli* toodab kahte tüüpi bakteriotsiini: kolitsiini ja mikrotsiini. Kolitsiin V sünteesiks on vajalikud 4 geeni (*cvaA*, *cvaB*, *cvaC* ja *cvl*), mis võivad paikneda kromosoomis, aga ExPEC tüvedel asuvad enamasti mitmeid virulentsusgeene sisaldaval ColV plasmiidil (Frick jt, 1981; Gilson jt, 1987; Fernandez-Beros jt, 1990; Budic jt, 2011). CvaC on ColV prekursorvalk, mida bakterid sekreteerivad rakust välja kasutades CvaA, CvaB ja TolC valkudest koosnevat ABC transporterit. CvaC protsessitakse sekretsiooni käigus valmis toksiiniks. Cvl kodeerib valku, mis kaitseb kolitsiini tootvat tüve toksiini mõju eest (Zhang jt, 1995). ColV sihtmärgiks on bakteri sisemembraan, toksiin tapab tundlikud bakterirakud takistades membraanipotentsiaali formeerumist (Yang ja Konisky, 1984). Kliinilistest materjalidest pärit *E. coli* tüved toodavad rohkem ColV kui normaalse seedetrakti mikrofloora tüved (Davies jt, 1981).

1.2.6. Laienendatud spektriga β -laktamaaside tootmine

E. coli infektsioonide puhul on probleemiks kasvav resistentsus β -laktamsetele antibiootikumidele, mille põhjuseks peetakse üha suurenevat antibiootikumide kasutamist meditsiinis. Paljud resistentsed *E. coli* tüved toodavad laiendatud spektriga β -laktamaase (ESBL; ingl k *extended spectrum β -lactamase*), ensüüme, mis lõhuvad β -laktamsete antibiootikumide β -laktamtuuma (Walsh, 2000; Datta jt, 2012). ESBL ensüümid annavad resistentsuse penitsilliinidele, tsefalosporiinidele ja monobaktaamile, kuid on inhibeeritavad β -laktam inhibiitoritega (nt klavulaanhape ja sulbaktam) (Perez jt, 2007).

Tuntakse palju erinevaid ESBL ensüümide tüüpe. Giske jt (2009) välja pakutud klassifikatsiooni kohaselt võib ESBL-id jagada kolme klassi: ESBL_A, ESBL_M ja ESBL_{CARBA}. ESBL_A hulka kuuluvad „klassikalised“ ESBL-id, klavulaanhappe poolt inhibeeritavad ensüümid (CTX-M, TEM, SHV jt). ESBL_M hulka kuuluvad plasmiididel paiknev AmpC (ESBL_{M-C}) ning OXA-ESBL-id (ESBL_{M-D}). ESBL_{CARBA} hulka kuuluvad lisaks tsefalosporiinidele ka karbapeneeme hüdroolüüsivad ESBL ensüümid (KPC, IMP, VIM jt) (Giske jt, 2009).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks oli võrrelda *E. coli* virulentsusfaktoreid:

- 1) tüvedel, mis kuuluvad erinevatesse fülogeneetilistesse gruppidesse
- 2) ESBL-negatiivsetel tüvedel, mis on isoleeritud seedetraktist, verest ja uriinist
- 3) ESBL-positiivsetel tüvedel, mis on isoleeritud Eest, Läti, Leedu ja Venemaa (Peterburi) patsientide kliinilistest materjalidest
- 4) ESBL-negatiivsetel ja positiivsetel tüvedel, mis on isoleeritud uroinfektsiooniga patsientide uriinist

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Töös kasutatud bakteritüved

Töös kasutati 757 seedetrakti mikrofloorast ja erinevatest kliinilistest materjalidest isoleeritud *E. coli* tüve, neist 334 olid ESBL-negatiivsed ja 423 ESBL-positiivsed.

ESBL-positiivsed tüved koguti ARMMD (Antibiootikumiresistentsuse molekulaarne *multiplex* diagnostika) projekti raames kahekümnest Eesti, Läti, Leedu ja Venemaa (Peterburi) haiglast 2012. aasta jaanuarist maini. Tüved isoleeriti kliinilistest materjalidest (Tabel 1).

Tabel 1. Eri riikidest ja eri materjalidest isoleeritud ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede arv.

Materjal	Eesti (n=149)	Läti (n=112)	Leedu (n=35)	Venemaa (n=127)
Uriin (n=266)	110	52	19	85
Veri (n=27)	7	8	7	5
Haavaeritis (n=92)	23	37	7	25
Hingamisteede eritis (n=38)	9	15	2	12

Töös kasutati 334 ESBL-negatiivset *E. coli* tüve. Tüved olid isoleeritud uriinist, verest ja roojast. Uriinist isoleeritud tüved olid kogutud uroinfektsioonidega patsientidelt Tartu Ülikooli kliinikumis 2011. aasta septembrist novembrini. Verest isoleeritud tüved olid kogutud baktereemiaga patsientidelt Tartu Ülikooli kliinikumis 2006. aasta veebruarist 2007. aasta detsembrini. Rooja tüved (kommensaalse soole mikrofloora tüved) olid kogutud tervetelt inimestelt ABRESIST (Antibiootikumiresistentsuse levikuteed) projekti käigus 2012. aasta maist detsembrini. Tüvede arv on toodud tabelis 2.

Tabel 2. Uriinist, verest ja roojast isoleeritud ESBL-negatiivsete *E. coli* tüvede arv.

Materjal	Tüvede arv
Uriin	92
Veri	112
Roe	130

2.2.2. Bakteritüvede identifitseerimine

Tervete inimeste seedetrakti *E. coli* tüvede esmaseks selekteerimiseks külvati inimeste roe kromogeensele agarile *Brilliance UTI Clarity agar* [1,5% peptoon, 2,6% kromogeenide Red-gal (6-kloro-3-indolüül- β -D-galaktopüranosiid) ja X-gluc (5-bromo-4-kloro-3-indolüül- β -D-glukuroniid) segu, 1,5% agar; (Oxoid)]. *E. coli* ensüüm β -galaktosidaas metaboliseerib agaris sisalduvat kromogeeni Red-gal ning moodustuvad roosad kolooniad.

E.coli'na identifitseeritud seedetrakti mikrofloorast isoleeritud tüved ja kõik kliinilistest materjalidest isoleeritud tüved identifitseeriti lõplikult kasutades MALDI-TOF (ingl k *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*) spektromeetrit (Bruker). Tüved külvati mitteselektiivsele veriagarile [1% „Lab Lemco“ puljongipulber (Oxoid), 1% peptoon, 0,5% NaCl, 1,5% agar, 5% defibrineeritud hobuseveri; (Oxoid)], kasvatati üleöö 37 °C juures ning identifitseeriti MALDI-TOF spektromeetriga, vastavalt tootja protokollile. Meetod põhineb valkude spektri põhjal bakteriliigi kindlakstegemisel.

2.2.3. ESBL_A ja ESBL_{M-C} kindlakstegemine antibiootikumi diskide abil

Vastavalt ühtsele protokollile tehti haiglates kindlaks *E. coli* ESBL-i tootmine. Esmalt määrati vähenenud tundlikkus ühe või mitme β -laktaamse antibiootikumi suhtes, kasutades antimikroobse tundlikkuse määramise Euroopa komitee kriteeriume (EUCAST; ingl k *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Pärast esmast määramist kasutati ESBLi kinnitamiseks ESBL komplekti (ROSCO). ESBL_A olemasolu kindlakstegemiseks kasutati tsefotaksiimi (CTX), tseftasidiimi (CAZ), tsefotaksiimi + klavulaanhappe (CTX-C) ning tseftasidiimi + klavulaanhappega (CAZ-C) immutatud diske. ESBL_M olemasolu kindlakstegemiseks kasutati tsefotaksiimi, tseftasidiimi, tsefotaksiimi + kloksatsilliini (CTX-CX) ning tseftasidiimi + kloksatsilliiniga (CAZ-CX) immutatud diske. Tsefotaksiim ja tseftasidiim on tsefalosporiinid, millele ESBL_A ja ESBL_{M-C} annavad resistentsuse. Klavulaanhape on ESBL_A inhibiitor ning kloksatsilliin ESBL_{M-C} inhibiitor.

Tüved külvati veriagarile ning kasvatati üleöö 37 °C juures. Seejärel valmistati bakterikultuurist suspensioon, mis oleks ekvivalentne 0,5 McFarland-iga ning plaaditi Mueller Hinton agarile. Peale asetati antibiootikumidega immutatud diskid (CTX 30 µg, CTX 30 µg + C, CTX 30 µg + CX, CAZ 30 µg, CAZ 30 µg + C, CAZ 30 µg + CX) ning inkubeeriti üleöö 37 °C juures. Mõõdeti diskide ümber tekkinud kasvuvabade tsoonide diameetrid. Kui CTX-C ning CTX ja/või CAZ-C ning CAZ diskide ümber tekkinud kasvuvaba tsooni diameetrite erinevus oli 5 mm või suurem, oli tegu ESBL_A positiivse tüvega. Kui CTX-CX ning CTX ja/või CAZ-CX ning CAZ diskide ümber tekkinud kasvuvaba tsooni diameetrite erinevus oli 5 mm või suurem, oli tegu ESBL_M positiivse tüvega.

2.2.4. DNA eraldamine

E. coli tüved külvati veriagarile, inkubeeriti üleöö 37 °C juures ning väljakasvanud kolooniatest eraldati DNA kasutades QIAamp DNA MiniKit (Qiagen®) ning PureLink™ Pro96 Genomic DNA Kit (Invitrogen) komplekte, tootjate protokolle järgides. DNA säilitati -20 °C juures.

2.2.5. Virulentsusgeenide määramine *multiplex*-PCR meetodiga

E. coli tüvedest eraldatud DNA-s määrati *multiplex*-PCR-iga 23 virulentsusfaktori geeni olemasolu. *Multiplex*-PCR-i reaktsioonides kasutati nelja praimerite kombinatsiooni (Johnson ja Stell, 2000). PCR-i reaktsioonisegu koostist ning programme optimeeriti sobivamaks arvestades labori tingimuste ja kasutatavate reagentidega. Praimerite järjestused ja kombinatsioonid on toodud tabelites 3a ja 3b.

Positiivsete kontrollidena kasutati nendest bakteritüvedest eraldatud DNA-d, milles oli PCR-iga geeni olemasolu detekteeritud ning PCR-i produkt sekveneeritud. Kasutati Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi sekveneerimisteenust. Sekveneerimisjärjestuste analüüsiks kasutati programmi BioEdit 7.0. Sekveneerimise tulemusel saadud DNA järjestusi võrreldi NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) *E. coli* geenijärjestustega.

Uuritavate geenide hulka kuulusid:

- 1) adhesiinide geenid: *papAH* (P-fimbria põhiline struktuurne subühik), *papEF* (P-fimbria tipu subühik, mis stabiliseerib tipuadhesiini), *papC* (P-fimbria kokkupanekuks vajalik faktor), *papGI* (P-fimbria tipuadhesiin klass I), *papGII* (P-fimbria tipuadhesiin klass II), *papGIII* (P-fimbria tipuadhesiin klass III), *fimH* (tüüp 1 fimbria tipuadhesiin), *sfa/focDE* (S- ja F1C-fimbria operonide tsentraalne regioon), *focG* (F1C-fimbria tipumolekul), *nfaE* (mittefimbrialise adhesiini NfaI kokkupanek ja transport), *bmaE* (M-fimbria subühik);
- 2) toksiinide geenid: *hlyA* (hemolüsiin α), *cvaC* (kolitsiin V prekursor), *cdtB* (CDT toksiini subühik);
- 3) kapsli sünteesi geenid: *kpsMTII* (gruppi II kuuluvate kapslite polüsahhariidide transpordis osalevate valkude süntees), *kpsMTIII* (gruppi III kuuluvate kapslite polüsahhariidide transpordis osalevate valkude süntees), *kpsMT K1* (K1 kapsli polüsahhariidide transpordis osaleva valgu süntees), *rfc* (O4 liposahhariidide süntees);
- 4) siderofooride geenid: *fyuA* (ferriijersiniabaktiini retseptor), *iutA* (ferriaerobaktiini retseptor);
- 5) invasiini geen *ibeA* (oluline faktor hematoentsefaalbarjääri ületamisel);
- 6) patogeensussaarekese marker PAI (uropatogeense *E. coli* tüve CFT073 patogeensussaareke);
- 7) seerumresistentsuse geen *traT* (välismembraani lipoproteiin, oluline faktor seerumresistentsuse puhul).

Tabel 3a. Kasutatud praimerid (Johnson ja Stell, 2000)

Geen(id), millele praimer seondub	Praimeri nimi	Järjestus 5'-3' suunas	Fragmendi pikkus (bp)	Praimeri kontsentratsioon PCR-i reaktsioonis
Praimerikombinatsioon 1				
PAI	RPAi-f	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA	930	0,6 µM
	RPAi-r	TCGCCACCAATCACAGCCGAAC		0,6 µM
papAH	PapA-f	ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG	720	0,6 µM
	PapA-r	CGTCCCACCATACGTGCTCTTC		0,6 µM
fimH	FimH-f	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	508	0,6 µM
	FimH-r	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA		0,6 µM
kpsMTIII	KpsIII-f	TCCTCTTGCTACTATTCCCCCT	392	0,6 µM
	KpsIII-r	AGGCGTATCCATCCCTCCTAAC		0,6 µM
papEF	PapEF-f	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	336	0,6 µM
	PapEF-r	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA		0,6 µM
ibeA	ibe10-f	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	170	0,6 µM
	ibe10-r	TGGTGCTCCGGCAAACCATGC		0,6 µM
Praimerikombinatsioon 2				
fyuA	fyuA-f	TGATTAACCCCGCGACGGGAA	880	0,6 µM
	fyuA-r	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA		0,6 µM
bmaE	bmaE-f	ATGGCGCTAACTTGCCATGCTG	507	0,6 µM
	bmaE-r	AGGGGGACATATAGCCCCCTTC		0,6 µM
sfa/focDE	sfa1	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410	0,6 µM
	sfa2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA		0,6 µM
iutA	aerJ-f	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	300	0,6 µM
	aerJ-r	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG		0,6 µM
papGIII	AlleleIII-f	GGCCTGCAATGGATTTACCTGG	258	0.6 µM
	AlleleIII-r	CCACCAAATGACCATGCCAGAC		0,6 µM
kpsMT K1	K1-f-f	TAGCAAACGTTCTATATTGGTGC	153	0,6 µM
	kpsII-r	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA		0,6 µM

Tabel 3b. Kasutatud praimerid (Johnson ja Stell, 2000)

Geen(id), millele praimer seondub	Praimeri nimi	Järjestus 5'-3' suunas	Fragmendi pikkus (bp)	Praimeri kontsentratsioon PCR-i reaktsioonis
Praimerikombinatsioon 3				
hlyA	hly-f	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1177	0,6 µM
	hly-r	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA		0,6 µM
Rfc	rfc-f	ATCCATCAGGAGGGGACTGGA	788	0,6 µM
	rfc-r	AACCATAACCAACCAATGCGAG		0,6 µM
nfaE	nfaE-f	GCTTACTGATTCTGGGATGGA	559	0,3 µM
	nfaE-r	CGGTGGCCGAGTCATATGCCA		0,3 µM
papGI	AlleleI-f	TCGTCTCAGGTCCGGAATTT	461	0,3 µM
	AlleleI-r	TGGCATCCCCCAACATTATCG		0,3 µM
kpsMTII	kpsII-f	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	272	0,3 µM
	kpsII-r	CATCCAGACGATAAGCATGAGC		0,3 µM
papC	PapC-f	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	200	0,3 µM
	PapC-r	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA		0,3 µM
Praimerikombinatsioon 4				
cvaC	ColV-C-f	CACACACAAACGGGAGCTGTT	680	0,6 µM
	ColV-C-r	CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT		0,6 µM
cdtB	cdt-a1	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA	430	0,6 µM
	cdt-a2	AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTTA		0,6 µM
	cdt-s1	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG		0,6 µM
	cdt-s2	GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG		0,6 µM
focG	FocG-f	CAGCACGGCAGTGGATACGA	360	0,6 µM
	FocG-r	GAATGTCGCCTGCCCATTGCT		0,6 µM
traT	TraT-f	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG	290	0.6 µM
	TraT-r	CACGGTTCAGCCATCCCTGAG		0,6 µM
papGII	Allele II-f	GGGATGAGCGGGCCTTTGAT	190	0.6 µM
	Allele II-r	CGGGCCCCCAAGTAACTCG		0,6 µM

PCR-i reaktsioonis kasutati matriitsina 2 µl bakteriaalset DNA-d. Reaktsiooni maht oli 25 µl, mis sisaldas 1x HotStart PCR-puhvrit (200 mM Tris-HCl pH 8,3, 200 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂SO₄ (Thermo Scientific)), 0,2 mM igat nukleotiidi, 0,6 või 0,3 µl praimereid (Tabelid 3a ja 3b), 2,5 mM MgCl ja 1U HotStart DNA polümeraasi (Thermo Scientific). Kasutati L Series Peltier Thermal Cycler (MyGene™) PCR-i masinat. PCR-i programmid on toodud tabelis 4.

Geenifragmendid lahutati geelelektforeesil. Kasutati Bio-Rad power pac 300 elektroforeesimasinat 150V, 400 mA juures 2% agarosigeelis, mis oli tehtud TAE puhvrist (40 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA, pH 8,5 (Naxo)) ning sisaldas etiidiumbromiidi 0,5 µg/ml. Geenifragmendid visualiseeriti UV-s, kasutati Syngene visualiseerimisaparatuuri ning GeneSnap (Syngene) tarkvara.

Tabel 4. Kasutatud PCR-i programmid (Johnson ja Stell, 2000), modifitseeritud.

praimeri-kombinatsioon	denaturatsiooni temp (°C)	aeg (min)	denaturatsiooni temp (°C)	aeg (sek)	praimerite seondumise temp (°C)	aeg (sek)	DNA sünteesi temp (°C)	aeg (min)	tsükli arv	lõppekstentsiooni temp (°C)	aeg (min)
1	94	4	94	30	55	30	72	1.30	30	72	15
2-4	94	4	94	30	63	30	72	1.30	30	72	15

2.2.6. Fülogeneetiliste gruppide määramine

Kristel Parve bakalaureusetöö raames määrati *E. coli* tüvede kuulumine ühte neljast enamlevinud fülogeneetilisest grupist (A, B1, B2, D) (Parv, 2013). *E. coli* fülogeneetiline grupp määrati PCR meetodiga, milles tehti kindlaks geenide *chuA* ja *yjaA* ning DNA fragmendi TSPE4.C2 olemasolu bakteritüvedes, vastavalt Clermont jt (2000) publitseeritud protokollile (Clermont jt, 2000).

2.2.7. Statistiline analüüs

Kasutati statistikaprogrammi PAST versiooni 2.17. Virulentsusgeenide esinemissageduste võrdlemiseks erinevatesse gruppidesse kuuluvatel tüvedel kasutati χ^2 -testi. Keskmise virulentsusgeenide arvu võrdlemisel kasutati Mann Whitney või Kruskal Wallis'e testi. Mann Whitney testi kasutati juhul, kui võrreldi omavahel kahte gruppi kuuluvaid tüvesid, Kruskal Wallis'e testi kasutati siis, kui võrreldi omavahel kolme või nelja gruppi kuuluvaid tüvesid. Kasutati olulisusnivood $\alpha=0,05$. Kõigi testide puhul, kus võrreldi omavahel kolme või nelja gruppi kuuluvaid tüvesid tehti Bonferroni korrektsiooni: kolme gruppi kuuluvate tüvede võrdlemisel kasutati olulisusnivood $\alpha=0,017$, nelja gruppi kuuluvate tüvede võrdlemiseks olulisusnivood $\alpha=0,0083$. Joonised tehti programmiga Microsoft Office Exel 2010.

2.3. Tulemused

2.3.1. Virulentsusgeenide esinemissagedused *E. coli* tüvedel

E. coli 757 tüvel uuriti 23 virulentsusfaktori (VF) geeni olemasolu. Virulentsusgeenide esinemissagedused jäid 0% ja 95% vahele. Kõige sagedamini esinesid *fimH* (95%), *fyuA* (81%) ja *traT* (77%). Kõige harvemini esinesid *bmaE*, mida leiti ainult ühel tüvel ning *nfaE*, mida leiti kahel tüvel. *PapG* varianti I ei leitud ühelgi tüvel. Kõikide geenide esinemissagedused on toodud tabelis 5.

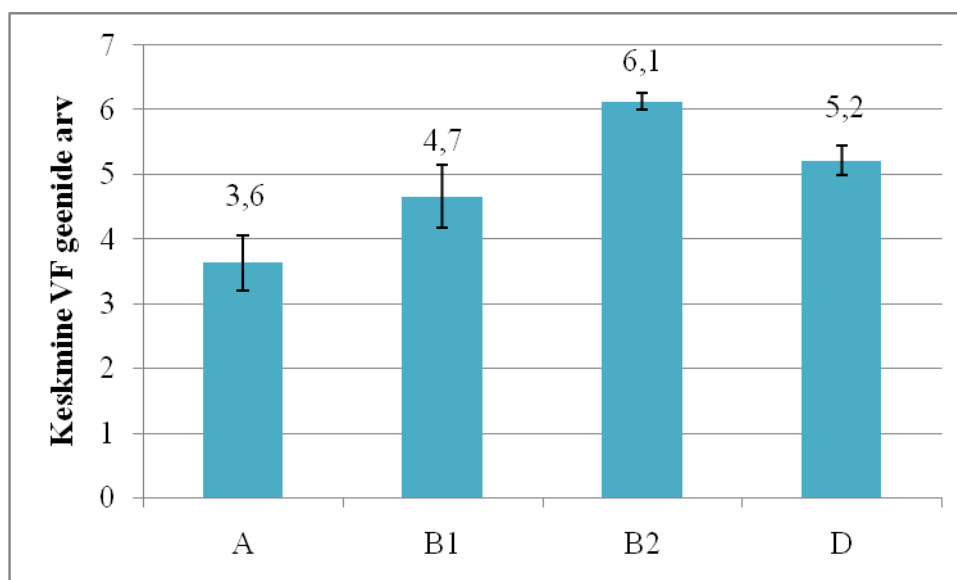
Tabel 5. 23 virulentsusfaktori geeni esinemissagedused 757 *E. coli* tüvel.

virulentsusfaktorid	VF geen	Esinemissagedus (%) n=757
adhesiinid	<i>papAH</i>	27,0
	<i>papEF</i>	27,3
	<i>papC</i>	33,3
	<i>papGI</i>	0,0
	<i>papGII</i>	25,1
	<i>papGIII</i>	4,5
	<i>fimH</i>	94,7
	<i>sfa/focDE</i>	21,4
	<i>focG</i>	9,1
	<i>nfaE</i>	0,3
	<i>bmaE</i>	0,1
toksiinid	<i>hlyA</i>	17,4
	<i>cvaC</i>	16,0
	<i>cdtB</i>	0,8
kapsli süntees	<i>kpsMTII</i>	53,8
	<i>kpsMTIII</i>	46,5
	<i>kpsMT K1</i>	14,5
	<i>rfc</i>	1,2
siderofoorid	<i>fyuA</i>	80,6
	<i>iutA</i>	74,6
invasiin	<i>ibeA</i>	10,3
seerumresistentsus	<i>traT</i>	76,8
patogeensussaareke	<i>PAI</i>	42,4

2.3.2. Virulentsusgeenide seos *E. coli* fülogeneetiliste gruppidega

Võrreldi keskmist VF geenide hulka ning VF geenide esinemissagedusi erinevatesse fülogeneetilistesse gruppidesse kuuluvatel tüvedel. Kristel Parve töö tulemustest selgub, et 757 tüve jaotusid fülogeneetilistesse gruppidesse järgnevalt: fülogeneetilisse gruppi A kuulus 60 tüve (7,9%), gruppi B1 35 tüve (4,6%), gruppi B2 498 tüve (65,8%) ning gruppi D 164 tüve (21,7%). Keskmise VF geenide hulga arvutamisel ühe bakteritüve kohta võeti uuritud geenidest arvesse vaid mitteredundantsed geenid – välja jäeti *papAH*, *papEF*, *papC*, *kpsMTK1* ja *focG*. Erinevatest *pap* geenidest arvestati keskmise arvutamisel ainult *papGII* ja *papGIII*, sest need geenid kodeerivad P-fimbria tipuadhesiine, mis otseselt seonduvad retseptoritele, milleks on P-veregrupi spetsiifilised glükosfingolipiididid. *KpsMT K1* jäeti välja sel põhjusel, et K1 kapsel kuulub grupp II kapslite hulka ning kõikide gruppi II kuuluvate kapslite süntees detekteeritakse praimeripaariga, mis seondub *kpsMTII*-le. *FocG* jäeti välja, kuna antud geeni saab kindlaks teha ka *sfa/focDE* praimeripaariga, mis seondub nii *sfa* kui *foc* operonide geenidele.

Erinevatesse fülogeneetilistesse gruppidesse kuuluvate tüvede keskmine VF geenide arv on toodud joonisel 1. Statistiline erinevus leiti järgnevate paaride vahel: B2 grupis oli rohkem VF geene kui A, B1 ja D gruppides ($P<0,001$; $P<0,001$; $P<0,001$); A grupis oli vähem VF geene kui B1 ja D gruppides ($P=0,005$; $P<0,001$).



Joonis 1. Keskmine VF geenide arv *E. coli* tüvedel ($n=757$), mis kuuluvad erinevatesse fülogeneetilistesse gruppidesse: A ($n=60$), B1 ($n=35$), B2 ($n=498$), D ($n=164$). Toodud on aritmeetilised keskmised ja 95% usalduspiirid.

Samuti leiti, et erinevatesse fülogeneetilistesse gruppidesse kuuluvatel *E. coli* tüvedel on erinevad virulentsusfaktoreid kodeerivate geenide esinemissagedused. B2 ja D fülogeneetilistesse gruppidesse kuuluvatel tüvedel leiti enam P-fimbriate geene (*pap*), gruppi II kuuluvate kapslite sünteesis osalevat geeni *kpsMTII* ning siderofooride geene *iutA* ja *fyuA*. B1 ja B2 gruppi kuuluvatel tüvedel leiti rohkem S-/F1C-fimbriate geene *sfa/focDE*. B2 fülogruppi kuuluvatel tüvedel leiti enam P-fimbria tipuadhesiini geeni *papGIII*, hemolüsiini geeni *hlyA*, patogeensussaarekese markerit *PAI* ning invasiini geeni *ibeA*. D gruppi kuuluvatel tüvedel leiti enam K1 kapsli sünteesis osalevat geeni *kpsMT K1* (Tabel 6).

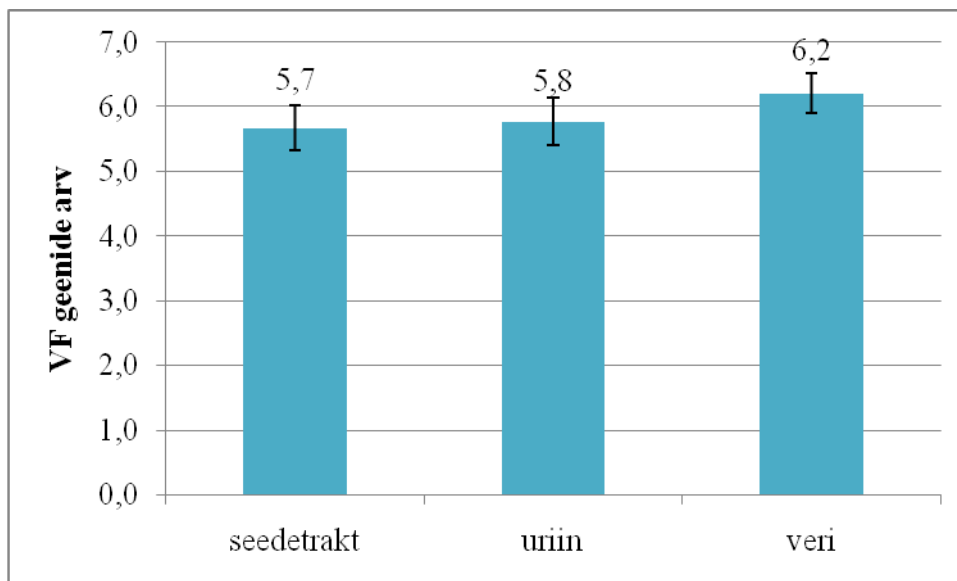
Tabel 6. VF geenide esinemissagedused, mille puhul leiti statistiline erinevus erinevatesse fülogeneetilistesse gruppidesse kuuluvatel *E. coli* tüvedel.

Virulentsus-faktorid	VF geen	A ^a n=60 (%)	B1 ^b n=35 (%)	B2 ^c n=498 (%)	D ^d n=164 (%)	P väärtused
adhesiinid	<i>papAH</i>	13,3	0,0	29,3	32,9	ab, ac P≤0,02 ad, bc, bd P≤0,004*
	<i>papEF</i>	6,7	2,9	28,7	36,0	ac, ad, bc, bd P≤0,001*
	<i>papC</i>	15,0	0,0	37,1	35,4	ab P≤0,02; ac, ad, bc, bd P≤0,003*
	<i>papGII</i>	3,3	2,9	26,9	32,3	ac, ad, bc, bd P≤0,001*
	<i>papGIII</i>	0,0	0,0	6,4	1,2	ac P=0,04; cd P=0,01
	<i>focG</i>	1,7	2,9	12,4	3,0	ac, cd P≤0,007*
	<i>sfa/focDE</i>	3,3	37,1	26,7	8,5	ab, ac, bd, cd P≤0,001*
	<i>fimH</i>	81,7	94,3	96,4	94,5	ac, ad P≤0,006*
toksiin	<i>hlyA</i>	1,7	14,3	21,9	10,4	ab, ad P≤0,05 ac, cd P≤0,001*
kapsel	<i>kpsMTII</i>	11,7	17,1	62,7	50,0	bd, cd P≤0,004* ac, ad, bc P≤0,001*
	<i>kpsMTIII</i>	58,3	74,3	43,0	47,0	ac P=0,03; bc, bd P≤0,005*
	<i>kpsMT K1</i>	5,0	5,7	13,7	22,6	bd, cd P≤0,02 ad P=0,001*
siderofoorid	<i>fyuA</i>	55,0	54,3	87,1	75,6	bd P=0,02; ad P=0,005*; ac, bc, cd P≤0,001*
	<i>iutA</i>	51,7	57,1	76,5	81,1	bc P≤0,01 ac, ad, bd P≤0,004*
invasiin	<i>ibeA</i>	1,7	5,7	13,3	5,5	ac, cd P≤0,005*
patogeensussaa- reke	<i>PAI</i>	10,0	17,1	54,8	22,0	ac, bc, cd P≤0,001*
seerum- resistentsus	<i>traT</i>	61,7	74,3	77,9	79,3	ad P=0,01

*Toodud erinevused jäävad statistiliselt oluliseks ka peale Bonferroni korrektsiooni

2.3.3. Seedetraktist, uriinist ja verest isoleeritud ESBL-negatiivsete *E. coli* tüvede virulentsusfaktorid

Võrreldi virulentsusfaktorite keskmist arvu ja esinemissagedusi vere, uriini ning seedetrakti mikrofloora tüvedel, mis olid isoleeritud Eestis. Keskmine VF geenide arv seedetrakti, uriini ning vere tüvedel on toodud joonisel 2. Vere tüvedel leiti enam virulentsusgeene võrreldes seedetrakti mikrofloorast isoleeritud tüvedega ($P=0,007$).



Joonis 2. Keskmine VF geenide arv normaalsest seedetrakti mikrofloorast ($n=130$), uriinist ($n=92$) ja verest ($n=112$) isoleeritud *E. coli* tüvedel. Toodud on aritmeetilised keskmised ja 95% usalduspiirid.

Leiti erinevusi ka seedetrakti mikrofloorast ja kliinilistest materjalidest isoleeritud *E. coli* tüvede VF geenide esinemissagedustes. Uriinist ja verest isoleeritud tüvedel leiti rohkem tüüp II kapsli sünteesis osalevat geeni *kpsMTII*. Vere tüvedel leiti rohkem P-, S- ja F1C-fimbriate geene (*pap*, *focG*, *sfa/focDE*) ning siderofoor aerobaktiini geeni *iutA*. Soole mikrofloora tüvedel leiti rohkem tüüp III kapslite sünteesis osalevat geeni *kpsMTIII* (Tabel 7).

Tabel 7. VF geenide esinemissagedused, mille puhul leiti statistiline erinevus uriinist, verest ja seedetrakti mikrofloorast isoleeritud *E. coli* tüvedel.

Virulentsus-faktorid	VF geen	uriini tüved ^a n=92 (%)	vere tüved ^b n=112 (%)	seedetrakti tüved ^c n=130 (%)	P väärtused
adhesiinid	<i>papAH</i>	37,0	64,3	28,5	ab, bc $P \leq 0,001$ *
	<i>papEF</i>	31,5	66,1	28,5	ab, bc $P \leq 0,001$ *
	<i>papC</i>	39,1	68,8	29,2	ab, bc $P \leq 0,001$ *
	<i>papGII</i>	27,2	63,4	17,7	ab, bc $P \leq 0,001$ *
	<i>focG</i>	15,2	35,7	7,7	ab, bc $P \leq 0,001$ *
	<i>sfa/focDE</i>	30,4	46,4	28,5	ab $P=0,02$; bc $P=0,005$ *
kapsel	<i>kpsMTII</i>	68,5	70,5	46,9	ac, bc $P \leq 0,002$ *
	<i>kpsMTIII</i>	10,9	16,1	56,2	ac, bc $P \leq 0,001$ *
	<i>kpsMT K1</i>	25,0	19,6	33,1	bc $P=0,02$
siderofoorid	<i>fyuA</i>	82,6	82,1	69,2	ac, bc $P \leq 0,03$
	<i>iutA</i>	64,1	82,1	56,2	ab, bc $P \leq 0,004$ *
seerum-resistentsus	<i>traT</i>	70,7	55,4	69,2	ab, bc $P \leq 0,03$

*Toodud erinevused jäävad statistiliselt oluliseks ka peale Bonferroni korrektsiooni

2.3.4. Erinevate riikide kliinilistest materjalidest isoleeritud ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede virulentsusfaktorid

Võrreldi virulentsusfaktorite keskmist arvu ja esinemissagedusi ESBL-positiivsetel Eesti, Läti, Leedu ja Venemaa tüvedel, mis olid isoleeritud erinevatest kliinilistest materjalidest: uriinist, verest, haavaeritisest ja hingamisteede eritisest.

Erinevates riikides isoleeritud ESBL-positiivseid tüvesid võrreldi omavahel (1) lähtuvalt kliinilisest materjalist, (2) lähtuvalt päritoluriigist. Kliinilisest materjalist isoleeritud tüvede virulentsusgeenide keskmine arv ei olnud statistiliselt erinev, kuid leiti mõned erinevused VF geenide esinemissagedustes. Hingamisteede eritisest isoleeritud tüvedel leiti P-

fimbria tipuadhesiini geeni *papGII* rohkem kui uriinist isoleeritud tüvedel ning tüüp II kapsli süneesis osalevat geeni *kpsMTII* rohkem kui vere tüvedel (Tabel 8).

Tabel 8. VF geenide esinemissagedused, mille puhul leiti statistiline erinevus eri kliinilistest materjalidest isoleeritud ESBL-positiivsetel *E. coli* tüvedel.

Virulentsus-faktorid	VF geen	uriin ^a n=226 (%)	veri ^b n=27 (%)	haavaeritis ^c n=92 (%)	Hingamisteede eritis ^d n=38 (%)	P väärtused
adhesiin	<i>papGII</i>	14,3	14,8	17,4	34,2	^{ad} p=0,004*
kapsel	<i>kpsMTII</i>	47,0	29,6	52,2	60,5	^{bd} p=0,002*
siderofoor	<i>iutA</i>	77,8	70,4	90,2	84,2	^{ac, bc} p≤ 0,02

*Toodud erinevused jäävad statistiliselt oluliseks ka peale Bonferroni korrektsiooni

Päritoluriigist ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede virulentsusgeenide keskmine arv samuti ei sõltunud, aga leiti erinevusi virulentsusgeenide esinemissagedustes. Eesti tüvedel leiti S-/F1C-fimbriate geene *sfa/focDE* rohkem kui Venemaa tüvedel ning invasiini geeni *ibeA* rohkem kui Läti ja Venemaa tüvedel. Seerumresistentsusega seotud geeni *traT* leiti Eesti tüvedel vähem kui teistes riikides isoleeritud tüvedel. Läti tüvedel leiti tüüp II kapsli süneesis osalevat geeni *kpsMTII* rohkem kui teistes riikides isoleeritud tüvedel. Leedu tüvedel leiti kolitsiini geeni *cvaC* ning tüüp III kapsli süneesis osalevat geeni *kpsMTIII* rohkem kui Venemaa tüvedel. Venemaa tüvedel leiti P-fimbriate geene (*pap*) rohkem kui teistest riikidest isoleeritud tüvedel (Tabel 9).

Tabel 9. VF geenide esinemissagedused, mille puhul leiti statistiline erinevus eri riikidest isoleeritud ESBL-positiivsetel *E. coli* tüvedel.

Virulentsus-faktorid	VF geen	Eesti ^a n=149 (%)	Läti ^b n=112 (%)	Leedu ^c n=35 (%)	Venemaa ^d n=127 (%)	P väärtused
adhesiinid	<i>papAH</i>	9,4	7,1	14,3	29,9	ad, bd $P \leq 0,001^*$
	<i>papEF</i>	8,7	8,9	8,6	32,3	ad, cd $P \leq 0,001^*$; bd $P = 0,005^*$
	<i>papC</i>	13,4	25,9	17,1	36,2	ab, cd $P \leq 0,05$; ad $P = 0,001^*$
	<i>papGII</i>	2,0	21,4	11,4	31,5	ac, cd $P \leq 0,02$ ab, ad $P \leq 0,001^*$
	<i>sfa/focDE</i>	18,8	8,0	14,3	2,4	ab, cd $P \leq 0,02$; ad $P = 0,001^*$
	<i>focG</i>	1,3	0,9	5,7	0,0	cd $P = 0,05$
toksiinid	<i>hlyA</i>	16,1	10,7	11,4	22,0	bd $P = 0,02$
	<i>cvaC</i>	12,1	11,6	28,6	6,3	ac, bc $P \leq 0,03$ cd $P \leq 0,001^*$
kapsel	<i>kpsMTII</i>	52,3	68,8	25,7	31,5	ab, ac, ad $P \leq 0,008^*$; bc, bd $P \leq 0,001^*$
	<i>kpsMTIII</i>	54,4	71,4	77,1	49,6	ac $P = 0,01$; ab, bd, cd $P \leq 0,007^*$
	<i>rfc</i>	0,0	0,0	2,9	3,1	ad $P = 0,04$
siderofoorid	<i>fyuA</i>	83,9	80,4	71,4	88,2	cd $P = 0,03$
	<i>iutA</i>	71,1	90,2	74,3	85,0	bc $P = 0,02$; ab, ad $P \leq 0,001^*$
invasiin	<i>ibeA</i>	18,1	2,7	11,4	2,4	cd $P = 0,04$; ab, ad $P \leq 0,001^*$
seerum-resistentsus	<i>traT</i>	73,8	98,2	94,3	87,4	ac, ad, bd $P \leq 0,007^*$ ab $P = 0,001^*$

*Toodud erinevused jäävad statistiliselt oluliseks ka peale Bonferroni korrektsiooni

2.3.5. ESBL-positiivsete ja ESBL-negatiivsete uriinist isoleeritud *E. coli* tüvede virulentsusfaktorid

Võrreldi virulentsusfaktorite keskmist arvu ja esinemissagedusi ESBL-positiivsetel ja ESBL-negatiivsetel Eestis isoleeritud uriini tüvedel. Keskmine VF geenide arv ESBL-positiivsetel ja negatiivsetel tüvedel statistiliselt ei erinenud.

Tabelis 10 on ära toodud VF geenide esinemissagedused, mille korral leiti statistiline erinevus ESBL-positiivsete ja -negatiivsete uriinist isoleeritud tüvede vahel. ESBL-positiivsetel tüvedel leiti rohkem tüüp III kapsli sünteesis osalevat geeni *kpsMTIII* ja patogeensussaarekete markerit *PAI*. ESBL-negatiivsetel tüvedel leiti rohkem P-, S- ja F1C-fimbriate geene (*pap*, *sfa/focDE*, *focG*), kolitsiini geeni *cvaC* ning gruppi II kuuluvate kapslite sünteesis osalevaid geene *kpsMTII* ja *kpsMT K1*.

Tabel 10. VF geenide esinemissagedused, mille puhul leiti statistiline erinevus ESBL-positiivsetel ja negatiivsetel uriinist isoleeritud *E. coli* tüvedel.

Viruletsus-faktorid	VF geen	ESBL-negatiivsed n=92 (%)	ESBL-positiivsed n=110 (%)	P väärtus
adhesiinid	<i>papAH</i>	37,0	8,2	P<0,001
	<i>papEF</i>	31,5	5,5	P<0,001
	<i>papC</i>	39,1	10,9	P<0,001
	<i>papGII</i>	27,2	2,7	P<0,001
	<i>papGIII</i>	6,5	0,9	P=0,049
	<i>sfa/focDE</i>	30,4	18,2	P=0,047
	<i>focG</i>	15,2	0,0	P<0,001
toksiin	<i>cvaC</i>	25,0	9,1	P=0,004
kapsel	<i>kpsMTII</i>	68,5	50,9	P=0,015
	<i>kpsMTIII</i>	10,9	55,5	P<0,001
	<i>kpsMT K1</i>	25,0	7,3	P<0,001
patogeensussaareke	<i>PAI</i>	32,6	58,2	P< 0,001

2.4. Arutelu

E. coli põhjustatud haigused on otseselt seotud virulentsusgeenide olemasoluga, mis kodeerivad erinevaid virulentsusfaktoreid. ExPEC infektsioonide puhul peetakse oluliseks adhesiine, kapslit, toksine, siderofoore, invasiine, seerumresistentsust ja resistentsust antibiootikumidele (Kohler ja Dobrindt, 2011; Pitout, 2012).

Käesolevas magistritöös uuriti 757 *E. coli* tüvel 23 virulentsusfaktorit määrava geeni esinemist. Tüved olid isoleeritud normaalsest seedetrakti mikrofloorast, verest, uriinist, haava- ja hingamisteede eritistest. Tüved olid pärit Eestis, Lätis, Leedus ja Venemaal elavatelt inimestelt. Eestis isoleeritud kliiniliste tüvede seas oli nii ESBL-positiivseid kui negatiivseid tüvesid, teistest riikidest pärit kliinilised tüved olid kõik ESBL-positiivsed.

Virulentsusgeenide üldised esinemissagedused kõikide tüvede seas jäid 0% ja 95% vahele (Tabel 5). Uuritud geenidest kõige sagedamini esines tüüp 1 fimbria tipuadhesiini kodeerivat geeni *fimH*, mida leiti 95% tüvedel. Varasemates uuringutes on samuti leitud *fimH* kõrge esinemissagedus nii kommensaalsetel kui patogeensetel *E. coli* tüvedel. Johnson jt (2001) läbi viidud uuringus leiti, et *fimH* esineb 94% tüvedest. Suurem osa tüvesid oli isoleeritud inimese ja loomade kommensaalsest mikrofloorast, väike osa oli pärit uroinfektsiooniga patsientidelt (Johnson jt, 2001). Ramos jt (2010) ning Johnson ja Stell (2000) leidsid *fimH* 89% ja 100% vereinfektsioone põhjustanud tüvedel (Johnson ja Stell, 2000; Ramos jt, 2010). Kuigi tüüp 1 fimbriaid peetakse ExPEC tüvede virulentsusfaktoriks, esineb neid sama tihti ka kommensaalsetel tüvedel. Tõenäoliselt on tüüp 1 fimbriatel oluline roll soole koloniseerimisel.

Uuritud geenidest kõige harvemini esinesid M-fimbria subühikut kodeeriv *bmaE* (0,1%) ning mittefimbrialise adhesiini NfaI kokkupanekus osalev *nfaE* (0,3%). P-fimbria tipuadhesiini I varianti kodeerivat *papGI* geeni ei leitud ühelgi tüvel. Kirjanduse andmed *bmaE* kohta on vasturääkivad. Ramos jt (2010) leidsid geeni 99% uuritud tüvedel, samas kui Johnson ja Stell (2000) 5% (Johnson ja Stell, 2000; Ramos jt, 2010). *PapGI* on ka varasemate uuringute andmetel harvaesinev ning mitmed autorid ei ole seda leidnud ühelgi uuritud tüvel (Mitsumori jt, 1998; Johnson jt, 2005; Cooke jt, 2010). Võib järeldada, et *bmaE*, *papGI* ning *nfaE* ei ole levinud virulentsusgeenid käesolevas uuringus vaadeldud geograafilises piirkonnas ning tõenäoliselt ei ole neil erilist tähtsust käsitletud infektsioonide põhjustamisel.

Varasematest uuringutest on teada, et fülogeneetilistesse gruppidesse A ja B1 kuuluvad põhiliselt kommensaalsed tüved, millel on vähe virulentsusgeene ning tervetel inimestel nad haiguseid ei tekita. B2 ja D gruppidesse kuuluvad tavaliselt patogeensed tüved, mis põhjustavad infektsioone. Kõige rohkem VF geene on leitud B2 gruppi, kõige vähem A

gruppi kuuluvatel tüvedel (Picard jt, 1999; Johnson jt, 2001; Rijavec jt, 2008). Käesoleva töö tulemused olid kooskõlas varasemate uuringute tulemustega: kõige rohkem virulentsusgeene leiti gruppi B2 kuuluvatel tüvedel, järgnesid grupid D ja B1 ning kõige vähem VF geene leiti gruppi A kuuluvatel tüvedel (Joonis 1).

Antud töös võrreldi erinevate VF geenide esinemissagedusi eri fülogeneetilistesse gruppidesse kuuluvatel tüvedel (Tabel 6). Mõned geenid olid assotsieerunud ainult ühe fülogeneetilise grupiga, teised mitme erinevaga. Johnson ja Stell (2000) ning Ramos jt (2010) leidsid, et B2 grupiga on assotsieerunud P-, S- ja F1C-fimbriate geenid, *hlyA*, *kpsMTII*, *PAI* ning *traT*. Johnson jt (2001) leidsid lisaks eelmainitud seostele, et P-fimbriate geenid, tüüp II kapsli geenid ning seerumresistentsuse geen *traT* on assotsieerunud D grupiga. Gruppidesse A ja B1 kuuluvatel tüvedel ei olnud ühegi uuritud VF geeni esinemissagedus kõrgem kui B2 või D grupi tüvedel (Johnson ja Stell, 2000; Johnson jt, 2001; Ramos jt, 2010). Antud töö tulemused on enamjaolt vastavuses varasemates uuringutes leitud seostele virulentsusfaktorite ja fülogeneetiliste gruppide vahel. Erinevus leiti ainult B1 grupi puhul, S-/F1C- fimbriate geene esines sagedamini B1 grupi tüvedel võrreldes teiste fülogruppidega. Tulemustest võib järeldada, et virulentsusgeenide esinemine bakteri genoomis on tugevasti seotud fülogeneetilise kuuluvusega.

ESBL-negatiivsete Eesti patsientide verest, uriinist ja tervete inimeste seedetrakti mikrofloorast isoleeritud *E. coli* tüvede VF geenide võrdlusel leiti, et vere tüvedel on keskmine VF geenide arv suurem kui soole mikrofloora tüvedel (Joonis 2). Samuti leiti erinevusi virulentsusfaktorite geenide esinemissagedustes (Tabel 7). Tüüp II kapsli kõrgem esinemissagedus vere ja uriini tüvedel on ootuspärane, seda on kirjeldatud ExPEC tüvede tüüpilise kapslina (Whitfield, 2006). Siderofooride kõrgem esinemissagedus kliinilistel tüvedel on samuti põhjendatud, kuna uriin ja veri on keskkonnad, kus raua kättesaadavus on halb. Huvitaval kombel leiti vere tüvedel vähem seerumresistentsusega seotud geeni *traT* (55%) kui uriini (71%) ja soole mikrofloora tüvedel (69%). TraT lipoproteiini on kirjeldatud komplemendi süsteemi ning fagotsütoosi eest kaitsva faktorina, mis peaks olema kasulik just veres ellujäämiseks. TraT kõrget esinemissagedust uroinfektsioone põhjustavatel tüvedel on täheldatud ka varem, kuid soole mikrofloora tüvede puhul on *traT* esinemissagedus varasemate uuringute andmetel madalam (Johnson jt, 2001; Sannes jt, 2004; Kudinha jt, 2013). Võimalik, et vere tüvedel kompenseerib *traT* madalama esinemissageduse tüüp II kapsel, millel on samuti leitud seerumresistentsust andev ning fagotsütoosi eest kaitsev toime (Leying jt, 1990; Buckles jt, 2009). Käesolevas uuringus leiti, et verest isoleeritud tüvedel on rohkem P- ja S-/F1C-fimbriate geene, kui uriinist ning seedetrakti mikrofloorast isoleeritud tüvedel. P-fimbriate kõrget esinemissagedust vere tüvedel on täheldanud mitmed autorid

(Ananias ja Yano, 2008; Cooke jt, 2010). Otto jt (1993) jõudsid järeldusele, et P-fimbriate olemasolu uroinfektsioone põhjustavatel tüvedel on sepsise riskifaktor (Otto jt, 1993). *E. coli* vereringesse tungimise mehhanism ei ole täpselt teada, kuid arvatakse, et oluline roll on adhesiinidel (Conceicao jt, 2012). Sannes jt (2004) võrdlesid bakterieemiat põhjustanud tüvesid normaalse mikrofloora tüvedega ning leidsid, et pea kõiki uuritud virulentsusfaktoreid (sh P- ja S-/F1C-fimbriad) on rohkem verest isoleeritud tüvedel (Sannes jt, 2004). Qin jt (2013) leidsid, et P-fimbriate geene on rohkem uriinist isoleeritud tüvedel, kui soole mikrofloora tüvedel (Qin jt, 2013). Käesolevas uuringus nende kahe grupi puhul statistilist erinevust välja ei tulnud. Antud uuringus leiti soole mikrofloora tüvedel ainult ühe VF geeni suurem esinemissagedus kui vere ja uriini tüvedel, milleks oli tüüp III kapsli sünteesis osalev *kpsMTIII* (56,2%). See tulemus on vasturääkiv varasemate uuringute tulemustega, millest selgub et *kpsMTIII* esinemissagedus soole mikrofloora tüvedel on nullilähedane (Sannes jt, 2004; Kudinha jt, 2013). Antud uuringus tüüp III kapsli kõrgest esinemissagedusest kommensaalsetel tüvedel võib järeldada, et see annab eelise ka soole koloniseerimisel. Käesoleva töö ning varasemate uuringute tulemuste põhjal on P-, F1C- ja S-fimbriad vajalikud bakteri tungimiseks vereringesse. Uriinist ning soole mikrofloorast isoleeritud tüved on VF geenide osas omavahel üsna sarnased. Võimalik, et seedetrakt on uroinfektsioone põhjustavate tüvede reservuaariks. Kõljalg jt (2009) andmetel põhjustab lastel suurema osa korduvatest uroinfektsioonidest sama *E. coli* tüvi, mis tõenäoliselt persisteerib seedetraktis (Koljalg jt, 2009).

Erinevates riikides isoleeritud ESBL-positiivseid tüvesid võrreldi omavahel lähtuvalt (1) kliinilisest materjalist, (2) päritoluriigist. Võrreldes tüvesid kliinilistest materjalidest lähtuvalt leiti huvitaval kombel ainult mõned üksikud erinevused (Tabel 8). Kirjanduses on vähe andmeid virulentsusfaktoritest *E. coli* tüvedel, mis põhjustavad muid infektsioone kui uroinfektsioonid, baktereemia ja vastsündinute meningiit. Mõned autorid on leidnud, et hingamisteid ja muid keha piirkondi koloniseerivad tüved võivad olla sarnased urotraktist ja verest isoleeritud tüvedega (Johnson jt, 2002a; Johnson ja Russo, 2002). Samas on verest ja uriinist isoleeritud tüvede võrdlusel leitud üsna mitmeid erinevusi, ka käesolevas uuringus. ESBL-positiivsete tüvede puhul võib väheste erinevuste põhjuseks olla tüvede antibiootikumresistentsus, mis on oluline virulentsusfaktor ning teised virulentsusfaktorid ei pruugi mängida enam nii suurt rolli infektsiooni tekitamisel.

Võrreldes tüvesid lähtudes päritoluriigist leiti rohkem erinevusi (Tabel 9). Kirjanduse andmetel on erinevatest piirkondadest isoleeritud tüvedel erinev jaotumine fülogeneetilistesse gruppidesse ning arvatakse, et geograafilised ja kliima tingimused mõjutavad *E. coli* populatsioonide struktuuri (Escobar-Paramo jt, 2004). Kuna virulentsusfaktorid ei ole

fülogeneetiliste gruppide vahel võrdselt jaotunud, võib järeldada, et sõltuvalt geograafilisest asukohast esineb *E. coli* tüvedel erinevusi ka virulentsusfaktorite osas. Käesolevas uuringus vaadeldav geograafiline piirkond on üsna väike ning hõlmab riike sarnaste keskkonnatingimustega. Kristel Parve bakalaureusetöö tulemustest aga selgus, et vaadeldud piirkonna bakteritüvede jaotumine fülogeneetilistesse gruppidesse ei ole ühesugune ning see võibki seletada leitud erinevusi virulentsusfaktorite esinemise osas (Parv, 2013). Kirjanduses on vähe andmeid *E. coli* tüvede piirkondlikest VF profiilide erinevustest. Grude jt (2004) võrdlesid Norrast ja Venemaalt uroinfektsiooniga patsientidelt isoleeritud tüvesid. Erinevus leiti ainult *papC* geeni puhul, mida leiti rohkem Norra tüvedel (77% vs 48%). Käesoleva uuringu käigus leiti 36% Venemaalt isoleeritud tüvedel *papC* geeni, mis on sarnane eelnevalt saadud tulemustele (Grude jt, 2007). Antud uuringu tulemused näitavad, et virulentsusfaktorite esinemissagedused erinevates riikides isoleeritud tüvedel ei ole ühesugused. Võib järeldada, et virulentsusfaktorite esinemissageduste uurimine lähtuvalt infektsioonist ei ole piisav, vaid on oluline võrrelda ka erinevates riikides isoleeritud tüvesid.

ESBL-positiivsete ja ESBL-negatiivsete Eesti patsientide uriinist isoleeritud tüvede võrdlusel selgus, et statistilist erinevust VF geenide keskmises arvus ei ole. Kirjanduses on üsna vähe andmeid ESBL-positiivsete ja -negatiivsete *E. coli* tüvede virulentsusfaktorite erinevusest. Lee jt (2010) uurisid ESBL-tootvaid ning -mittetootvaid kliinilistest materjalidest isoleeritud *E. coli* tüvesid 9 VF geeni osas. Statistilist erinevust VF geenide arvus ja geenide esinemissagedustes ei leitud (Lee jt, 2010). Lavigne jt (2006) andmetel on ESBL-positiivsetel tüvedel keskmine VF arv väiksem, mis käesolevas uuringus välja ei tulnud (Lavigne jt, 2006). Käesolevas uuringus leiti ESBL-positiivsetel tüvedel vähem P-, S-/F1C-fimbriate ja kolitsiini geene võrreldes ESBL-negatiivsete tüvedega. Qin jt (2013) ning Lavigne (2006) andmetel on ESBL-positiivsetel uriini tüvedel samuti vähem adhesiinide geene (Lavigne jt, 2006; Qin jt, 2013). Antud uuringus leiti ESBL-positiivsetel tüvedel rohkem patogeensussaarekese markerit *PAI*. On võimalik, et osad ESBL ensüümide geenid asuvad patogeensussaaarel. Töö tulemustest selgub, et uroinfektsiooni põhjustavatel ESBL-positiivsetel ning ESBL-negatiivsetel tüvedel on virulentsusfaktorid erinevad. Seetõttu on VF geenide esinemissageduste võrdlemisel oluline silmas pidada ka antibiootikumresistentsust.

Virulentsusfaktorite profiili uurimine on oluline mitme meditsiinilise aspekti perspektiivist. Virulentsusfaktorid on võimalikud märklauad uutele antimikroobsetele preparaatidele. On vajalik otsida uusi märklaua, sest resistentsus antibiootikumidele kasvab pidevalt. Uuemad väljapakutud antimikroobsete ainete toimestrateegiad keskenduvad pigem virulentsuse, kui rakkude kasvu ja jagunemise inhibeerimisele, hõlmates näiteks toksiinide kokkupakkimise, toksiinide transpordi, hulgatunnetuse ja fimbriate formeerumise häirimist

(Clatworthy jt, 2007). *E. coli* virulentsusfaktoreid on vaadeldud ka vaktsiinikandidaadidena uroinfektsioonide ennetamiseks. Kuna uroinfektsioonid on väga levinud ning tihti korduvad, on vajalik luua vaktsiin uropatogeense *E. coli* vastu. Vaktsiiniks sobiks hästi struktuurid, mida bakter ekspresseerib raku pinnal ning mis on kõrgelt immunogeensed (Brumbaugh ja Mobley, 2012).

Selleks, et leida vaktsiiniks või antimikroobse preparaadi märklauaks sobiv kandidaat, on vaja hästi tunda patogeensete tüvede virulentsusfaktoreid. Kirjanduses on palju andmeid sagedasemaid sooleväliseid infektsioone põhjustavate *E. coli* tüvede virulentsusgeenidest, kuid on vähe informatsiooni piirkondlikest erinevustest. Antud uuringus selgus, et eri riikides isoleeritud tüvedel ei ole VF geenide esinemissagedused ühesugused. Samuti leiti erinevusi ESBL-positiivsete ja ESBL-negatiivsete tüvede vahel. Seetõttu on tulevikus vajalik lisaks erinevaid infektsioone põhjustavate tüvede võrdlemisele keskenduda rohkem ka eri geograafilistest regioonidest pärit tüvedele ning antibiootikumresistentsetele ja -tundlikele tüvedele.

Tõenäoliselt ei ole võimalik virulentsusfaktoreid märklauana kasutades luua sama laiatoimelisi preparaate, nagu antibiootikumid, sest VF profiilid on niivõrd varieeruvad. Arvatavasti on mikroobivastaste ravimite väljatöötamisel mõistlik keskenduda igale infektsioonile eraldi ning tuleks arvestada ka geograafilisi erinevusi. Samuti peaks vaatlema eraldi gruppina ESBL-positiivseid ja -negatiivseid bakteritüvesid.

Uute ravimite arendamisel tuleb arvestada, et need ei kahjustaks normaalset soole mikrofloorat. Seetõttu sobiksid märklauaks virulentsusfaktorid, mille esinemissagedus patogeensetel tüvedel on palju suurem kui kommensaalsetel tüvedel. Antud töös vaadeldud virulentsusgeenidest võiksid Eesti patsientide vereinfektsioonide ennetamisel märklauaks sobida P-fimbriad, uro- ning vereinfektsioonide profülaktikaks tüüp II kapsel ning siderofooride süsteemid. Samas ei pruugi P-fimbriaid inhibeerivad ained sobida ESBL-positiivsete tüvede põhjustatud infektsioonide raviks, sest ESBL-positiivsetel tüvedel leiti käesolevas uuringus tunduvalt vähem P-fimbriate geene, kui ESBL-negatiivsetel tüvedel. Teiste riikide kohta järelduste tegemiseks oleks vajalik koguda ESBL-negatiivseid kliinilisi ja kommensaalse mikrofloora tüvesid ning võrrelda neil virulentsusfaktorite geenide esinemist.

Käesolev uurimistöö kirjeldab tuntud virulentsusfaktorite esinemist erinevatest kliinilistest materjalidest ja geograafilistest piirkondadest isoleeritud *E. coli* tüvedel. Võrreldes varasemate uuringute tulemustega saadi nii vasturääkivaid kui kinnitavaid andmeid. Eesti, Läti, Leedu ja Venemaa kliiniliste ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede virulentsusfaktorite võrdlus on esmakordne ning annab võrdlusmaterjali tulevaste uurimuste jaoks.

Antud töö edasiarenduseks võib olemasolevatel *E. coli* tüvedel määrata veel teisigi levinuid virulentsusega seotud geene, otsida assotsiatsioone virulentsusfaktorite vahel ning vaadata, kui tugevasti on leitud erinevused seotud tüvede erineva jaotumisega fülogeneetilistesse gruppidesse. Samuti oleks huvitav uurida virulentsusfaktoreid mRNA või valgu tasemel, et teada saada, kas kõik olemasolevad virulentsusfaktorite geenid ekspresseeruvad ning millistes infektsioonietappides milline virulentsusfaktor vajalik on.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli võrrelda *E. coli* tüvede virulentsusfaktoreid kodeerivate geenide esinemist: (1) erinevatesse fülogeneetilistesse gruppidesse kuuluvatel tüvedel, (2) patogeensetel ja kommesaalsetel tüvedel, (3) ESBL-positiivsetel ja ESBL-negatiivsetel tüvedel ning (4) Eestis, Lätis, Leedus ja Venemaal isoleeritud ESBL-positiivsetel tüvedel.

E. coli tüvedel (n=757) määrati *multiplex*-PCR-iga 23 virulentsusfaktori geeni esinemist. Tüvedel võrreldi virulentsusfaktorite geenide keskmist arvu ja esinemissagedusi. Antud töös tehtud katsed näitasid järgmist:

- Fülogeneetilisse gruppi B2 kuuluvatel tüvedel on kõige rohkem ning gruppi A kuuluvatel tüvedel kõige vähem virulentsusfaktorite geene, osad virulentsusfaktorid on assotsieerunud erinevate fülogeneetiliste gruppidega.
- Kliiniliste ja seedetrakti mikrofloorast isoleeritud tüvede võrdlemisel leiti, et vere tüvedel on keskmine virulentsusgeenide arv suurem kui normaalse mikrofloora tüvedel. Uriinist ja verest isoleeritud tüvedel leiti rohkem tüüp II kapsli geene. Vere tüvedel leiti rohkem fimbriate geene ning siderofoor aerobaktiini geeni. Soole mikrofloora tüvedel leiti rohkem tüüp III kapsli geeni.
- ESBL-positiivsete tüvede puhul on riikidevahelised erinevused suuremad kui materjalide vahelised erinevused. Eesti tüvedel leiti enam S-/F1C-fimbriate geene ja invasiini geeni; Läti tüvedel leiti enam tüüp II kapslite geene; Leedu tüvedel leiti enam kolitsiini geeni ja tüüp III kapsli geeni; Vene tüvedel leiti enam P-fimbriate geene.
- ESBL-positiivsete ja negatiivsete uriinist isoleeritud tüvede võrdlusel selgus, et keskmine virulentsusgeenide arv ei erine. ESBL-negatiivsetel tüvedel leiti rohkem adhesiine ja grupp II kapsli geene. ESBL-positiivsetel tüvedel leiti rohkem tüüp III kapsli geene ja patogeensussaarekesi.

**Virulence factor genes of *E. coli* strains, isolated from clinical samples and gut
microbiota**

Jana Lillo

SUMMARY

Escherichia coli is a rod-shaped Gram-negative bacterium that is common inhabitat of the intestine of human and other warm-blooded organisms. Most *E. coli* strains are commensal, but some strains can cause serious intestinal and extraintestinal infections.

Extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) strains are a frequent cause of extraintestinal diseases, such as bacteremia and urinary tract infections. These strains possess different virulence factors, which give them the potential to cause infections.

Virulence factors of ExPEC include different adhesins, toxins, capsules, siderophores, invasins and antibiotic resistance. These virulence factors contribute to colonization and invasion of the host tissues, avoidance of immune responses and acquiring nutrients from the host. According to previous studies *E. coli* virulence factors could be associated with infection sites, but no geographical differences have been described.

The aim of this study was to compare the prevalence of 23 virulence factor genes in *E. coli* strains: (1) belonging to different phylogenetic groups, (2) clinical and commensal strains, (3) ESBL (Extended Spectrum Beta Lactamase) positive and negative *E. coli* strains, (4) ESBL-positive *E. coli* strains isolated from Estonia, Latvia, Lithuania and Russia (St. Petersburg). The results of this study are following:

- There are more virulence factor genes in strains belonging to phylogenetic group B2 and less virulence factor genes in strains belonging to phylogenetic group A than in strains belonging to other groups.
- There are more virulence factor genes in blood strains than in strains isolated from urine and gut microbiota. In strains from blood and urine, type II capsular gene (*kpsMTII*) was more prevalent. In strains from blood, fimbrial genes and siderophore aerobactin (*iutA*) gene were more prevalent. In strains from gut, type III capsular gene (*kpsMTIII*) was more prevalent.
- In ESBL producing *E. coli* strains isolated from different countries, more inter-country differences than inter-material differences were found: there are more S-/F1C-fimbrial

genes (*sfa/focDE*) and invasins (*ibeA*) in Estonian strains, more type II capsular gene (*kpsMTII*) in Latvian strains, more colicin V (*colV*) and type III capsular gene (*kpsMTIII*) in Lithuanian strains, and more P-fimbrial genes in Russian strains.

- Comparing ESBL-positive and negative strains isolated from urine, it was found that in ESBL-positive strains, type III capsular gene (*kpsMTIII*) and pathogenicity island marker (*PAI*) were more prevalent, in ESBL-negative strains adhesin genes and type II capsular genes (*kpsMTII*) were more prevalent.

- Aguero, M. E., Aron, L., DeLuca, A. G., Timmis, K. N. and Cabello, F. C. (1984) A plasmid-encoded outer membrane protein, TraT, enhances resistance of *Escherichia coli* to phagocytosis. *Infect Immun* 46: 740-746.
- Ahrens, R., Ott, M., Ritter, A., Hoschutzky, H., Buhler, T., Lottspeich, F., Boulnois, G. J., Jann, K. and Hacker, J. (1993) Genetic analysis of the gene cluster encoding nonfimbrial adhesin I from an *Escherichia coli* uropathogen. *Infect Immun* 61: 2505-2512.
- Allen, P. M., Roberts, I., Boulnois, G. J., Saunders, J. R. and Hart, C. A. (1987) Contribution of capsular polysaccharide and surface properties to virulence of *Escherichia coli* K1. *Infect Immun* 55: 2662-2668.
- Ananias, M. and Yano, T. (2008) Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Braz J Med Biol Res* 41: 877-883.
- Antao, E. M., Wieler, L. H. and Ewers, C. (2009) Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog* 1: 22.
- Backhed, F., Alsen, B., Roche, N., Angstrom, J., von Euler, A., Breimer, M. E., Westerlund-Wikstrom, B., Teneberg, S. and Richter-Dahlfors, A. (2002) Identification of target tissue glycosphingolipid receptors for uropathogenic, F1C-fimbriated *Escherichia coli* and its role in mucosal inflammation. *J Biol Chem* 277: 18198-18205.
- Bahrani-Mougeot, F. K., Buckles, E. L., Lockett, C. V., Hebel, J. R., Johnson, D. E., Tang, C. M. and Donnenberg, M. S. (2002) Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. *Mol Microbiol* 45: 1079-1093.
- Bailey, J. K., Pinyon, J. L., Anantham, S. and Hall, R. M. (2011) Distribution of the blaTEM gene and blaTEM-containing transposons in commensal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 66: 745-751.
- Bauer, R. J., Zhang, L., Foxman, B., Siitonen, A., Jantunen, M. E., Saxen, H. and Marrs, C. F. (2002) Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-*usp*, *iha*, and *iroN*(*E. coli*). *J Infect Dis* 185: 1521-1524.
- Bhakdi, S., Mackman, N., Nicaud, J. M. and Holland, I. B. (1986) *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect Immun* 52: 63-69.
- Bhattacharya, S. and Bhattacharya, B. (2007) Studies on siderophore production of different diarrhoeagenic *Escherichia coli*. *J Indian Med Assoc* 105: 110, 112, 114-118.
- Bister, B., Bischoff, D., Nicholson, G. J., Valdebenito, M., Schneider, K., Winkelmann, G., Hantke, K. and Sussmuth, R. D. (2004) The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of *Salmonella enterica*. *Biometals* 17: 471-481.
- Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschape, H. and Hacker, J. (1994) Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect Immun* 62: 606-614.
- Brumbaugh, A. R. and Mobley, H. L. (2012) Preventing urinary tract infection: progress toward an effective *Escherichia coli* vaccine. *Expert Rev Vaccines* 11: 663-676.
- Buckles, E. L., Wang, X., Lane, M. C., Lockett, C. V., Johnson, D. E., Rasko, D. A., Mobley, H. L. and Donnenberg, M. S. (2009) Role of the K2 capsule in *Escherichia coli* urinary tract infection and serum resistance. *J Infect Dis* 199: 1689-1697.

- Budic, M., Rijavec, M., Petkovsek, Z. and Zgur-Bertok, D. (2011) *Escherichia coli* bacteriocins: antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia. PLoS One 6: e28769.
- Burns, S. M. and Hull, S. I. (1998) Comparison of loss of serum resistance by defined lipopolysaccharide mutants and an acapsular mutant of uropathogenic *Escherichia coli* O75:K5. Infect Immun 66: 4244-4253.
- Burns, S. M. and Hull, S. I. (1999) Loss of resistance to ingestion and phagocytic killing by O(-) and K(-) mutants of a uropathogenic *Escherichia coli* O75:K5 strain. Infect Immun 67: 3757-3762.
- Caugant, D. A., Levin, B. R. and Selander, R. K. (1981) Genetic diversity and temporal variation in the *E. coli* population of a human host. Genetics 98: 467-490.
- Cavalieri, S. J., Bohach, G. A. and Snyder, I. S. (1984) *Escherichia coli* alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. Microbiol Rev 48: 326-343.
- Chakraborty, R., Storey, E. and van der Helm, D. (2007) Molecular mechanism of ferricsiderophore passage through the outer membrane receptor proteins of *Escherichia coli*. Biometals 20: 263-274.
- Chang, C. J., Chang, W. N., Huang, L. T., Huang, S. C., Chang, Y. C., Hung, P. L., Lu, C. H., Chang, C. S., Cheng, B. C., Lee, P. Y., Wang, K. W. and Chang, H. W. (2004a) Bacterial meningitis in infants: the epidemiology, clinical features, and prognostic factors. Brain Dev 26: 168-175.
- Chang, D. E., Smalley, D. J., Tucker, D. L., Leatham, M. P., Norris, W. E., Stevenson, S. J., Anderson, A. B., Grissom, J. E., Laux, D. C., Cohen, P. S. and Conway, T. (2004b) Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 7427-7432.
- Chung, J. W., Hong, S. J., Kim, K. J., Goti, D., Stins, M. F., Shin, S., Dawson, V. L., Dawson, T. M. and Kim, K. S. (2003) 37-kDa laminin receptor precursor modulates cytotoxic necrotizing factor 1-mediated RhoA activation and bacterial uptake. J Biol Chem 278: 16857-16862.
- Clarke, S. C. (2001) Diarrhoeagenic *Escherichia coli*-an emerging problem? Diagn Microbiol Infect Dis 41: 93-98.
- Clarke, T. E., Tari, L. W. and Vogel, H. J. (2001) Structural biology of bacterial iron uptake systems. Curr Top Med Chem 1: 7-30.
- Clatworthy, A. E., Pierson, E. and Hung, D. T. (2007) Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. Nat Chem Biol 3: 541-548.
- Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E. (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl Environ Microbiol 66: 4555-4558.
- Clermont, O., Olier, M., Hoede, C., Diancourt, L., Brisse, S., Keroudean, M., Glodt, J., Picard, B., Oswald, E. and Denamur, E. (2011) Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. Infect Genet Evol 11: 654-662.
- Conceicao, R. A., Ludovico, M. S., Andrade, C. G. and Yano, T. (2012) Human sepsis-associated *Escherichia coli* (SEPEC) is able to adhere to and invade kidney epithelial cells in culture. Braz J Med Biol Res 45: 417-424.
- Contamin, S., Galmiche, A., Doye, A., Flatau, G., Benmerah, A. and Boquet, P. (2000) The p21 Rho-activating toxin cytotoxic necrotizing factor 1 is endocytosed by a clathrin-independent mechanism and enters the cytosol by an acidic-dependent membrane translocation step. Mol Biol Cell 11: 1775-1787.
- Cooke, N. M., Smith, S. G., Kelleher, M. and Rogers, T. R. (2010) Major differences exist in frequencies of virulence factors and multidrug resistance between community and nosocomial *Escherichia coli* bloodstream isolates. J Clin Microbiol 48: 1099-1104.

- Crepin, S., Houle, S., Charbonneau, M. E., Mourez, M., Harel, J. and Dozois, C. M. (2012) Decreased expression of type 1 fimbriae by a pst mutant of uropathogenic *Escherichia coli* reduces urinary tract infection. *Infect Immun* 80: 2802-2815.
- Datta, S., Wattal, C., Goel, N., Oberoi, J. K., Raveendran, R. and Prasad, K. J. (2012) A ten year analysis of multi-drug resistant blood stream infections caused by *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care hospital. *Indian J Med Res* 135: 907-912.
- Davies, D. L., Falkiner, F. R. and Hardy, K. G. (1981) Colicin V production by clinical isolates of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 31: 574-579.
- de Lorenzo, V., Bindereif, A., Paw, B. H. and Neilands, J. B. (1986) Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 165: 570-578.
- Diekema, D. J., Beekmann, S. E., Chapin, K. C., Morel, K. A., Munson, E. and Doern, G. V. (2003) Epidemiology and outcome of nosocomial and community-onset bloodstream infection. *J Clin Microbiol* 41: 3655-3660.
- Escobar-Paramo, P., Grenet, K., Le Menac'h, A., Rode, L., Salgado, E., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., Rahimy, M. C., Andremont, A., Denamur, E. and Ruimy, R. (2004) Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol* 70: 5698-5700.
- Fernandez-Beros, M. E., Kissel, V., Lior, H. and Cabello, F. C. (1990) Virulence-related genes in ColV plasmids of *Escherichia coli* isolated from human blood and intestines. *J Clin Microbiol* 28: 742-746.
- Flatau, G., Lemichez, E., Gauthier, M., Chardin, P., Paris, S., Fiorentini, C. and Boquet, P. (1997) Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* 387: 729-733.
- Flo, T. H., Smith, K. D., Sato, S., Rodriguez, D. J., Holmes, M. A., Strong, R. K., Akira, S. and Aderem, A. (2004) Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432: 917-921.
- Foxman, B. (2003) Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis Mon* 49: 53-70.
- Foxman, B., Barlow, R., D'Arcy, H., Gillespie, B. and Sobel, J. D. (2000) Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Ann Epidemiol* 10: 509-515.
- Frick, K. K., Quackenbush, R. L. and Konisky, J. (1981) Cloning of immunity and structural genes for colicin V. *J Bacteriol* 148: 498-507.
- Gadeberg, O. V., Orskov, I. and Rhodes, J. M. (1983) Cytotoxic effect of an alpha-hemolytic *Escherichia coli* strain on human blood monocytes and granulocytes in vitro. *Infect Immun* 41: 358-364.
- Gao, Q., Wang, X., Xu, H., Xu, Y., Ling, J., Zhang, D., Gao, S. and Liu, X. (2012) Roles of iron acquisition systems in virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: salmochelin and aerobactin contribute more to virulence than heme in a chicken infection model. *BMC Microbiol* 12: 143.
- Germani, Y., Begaud, E., Duval, P. and Le Bouguenec, C. (1997) An *Escherichia coli* clone carrying the adhesin-encoding afa operon is involved in both diarrhoea and cystitis in twins. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91: 573.
- Gilson, L., Mahanty, H. K. and Kolter, R. (1987) Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity. *J Bacteriol* 169: 2466-2470.
- Giske, C. G., Sundsfjord, A. S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D. L., Canton, R. and Walsh, T. R. (2009) Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother* 63: 1-4.
- Goldhar, J., Perry, R., Golecki, J. R., Hoschutzky, H., Jann, B. and Jann, K. (1987) Nonfimbrial, mannose-resistant adhesins from uropathogenic *Escherichia coli* O83:K1:H4 and O14:K?:H11. *Infect Immun* 55: 1837-1842.

- Goluszko, P., Moseley, S. L., Truong, L. D., Kaul, A., Williford, J. R., Selvarangan, R., Nowicki, S. and Nowicki, B. (1997) Development of experimental model of chronic pyelonephritis with *Escherichia coli* O75:K5:H-bearing Dr fimbriae: mutation in the dra region prevented tubulointerstitial nephritis. *J Clin Invest* 99: 1662-1672.
- Grude, N., Potaturkina-Nesterova, N. I., Jenkins, A., Strand, L., Nowrouzian, F. L., Nyhus, J. and Kristiansen, B. E. (2007) A comparison of phylogenetic group, virulence factors and antibiotic resistance in Russian and Norwegian isolates of *Escherichia coli* from urinary tract infection. *Clin Microbiol Infect* 13: 208-211.
- Guyer, D. M., Henderson, I. R., Nataro, J. P. and Mobley, H. L. (2000) Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 38: 53-66.
- Guyer, D. M., Radulovic, S., Jones, F. E. and Mobley, H. L. (2002) Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infect Immun* 70: 4539-4546.
- Hacker, J., Bender, L., Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marre, R. and Goebel, W. (1990) Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb Pathog* 8: 213-225.
- Hamelin, K., Bruant, G., El-Shaarawi, A., Hill, S., Edge, T. A., Fairbrother, J., Harel, J., Maynard, C., Masson, L. and Brousseau, R. (2007) Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas. *Appl Environ Microbiol* 73: 477-484.
- Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W. and Winkelmann, G. (2003) Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3677-3682.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. and Ala'Aldeen, D. (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 692-744.
- Horwitz, M. A. and Silverstein, S. C. (1980) Influence of the *Escherichia coli* capsule on complement fixation and on phagocytosis and killing by human phagocytes. *J Clin Invest* 65: 82-94.
- Huang, S. H., Wan, Z. S., Chen, Y. H., Jong, A. Y. and Kim, K. S. (2001) Further characterization of *Escherichia coli* brain microvascular endothelial cell invasion gene *ibeA* by deletion, complementation, and protein expression. *J Infect Dis* 183: 1071-1078.
- Huang, S. H., Wass, C., Fu, Q., Prasadara, N. V., Stins, M. and Kim, K. S. (1995) *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo: molecular cloning and characterization of invasion gene *ibe10*. *Infect Immun* 63: 4470-4475.
- Hung, C. S., Bouckaert, J., Hung, D., Pinkner, J., Widberg, C., DeFusco, A., Auguste, C. G., Strouse, R., Langermann, S., Waksman, G. and Hultgren, S. J. (2002) Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Mol Microbiol* 44: 903-915.
- Hunstad, D. A. and Justice, S. S. (2010) Intracellular lifestyles and immune evasion strategies of uropathogenic *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* 64: 203-221.
- Ishii, S. and Sadowsky, M. J. (2008) *Escherichia coli* in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health. *Microbes Environ* 23: 101-108.
- Jakobsen, L., Spangholm, D. J., Pedersen, K., Jensen, L. B., Emborg, H. D., Agerso, Y., Aarestrup, F. M., Hammerum, A. M. and Frimodt-Moller, N. (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.
- Jaureguy, F., Carbonnelle, E., Bonacorsi, S., Clec'h, C., Casassus, P., Bingen, E., Picard, B., Nassif, X. and Lortholary, O. (2007) Host and bacterial determinants of initial severity and outcome of *Escherichia coli* sepsis. *Clin Microbiol Infect* 13: 854-862.
- Johnson, J. R. (1991) Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 4: 80-128.
- Johnson, J. R., Delavari, P., Kuskowski, M. and Stell, A. L. (2001) Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 183: 78-88.
- Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Gajewski, A., Soto, S., Horcajada, J. P., Jimenez de Anta, M. T. and Vila, J. (2005) Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J Infect Dis* 191: 46-50.
- Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., O'Bryan, T. T. and Maslow, J. N. (2002a) Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. *J Infect Dis* 185: 1439-1447.
- Johnson, J. R., Oswald, E., O'Bryan, T. T., Kuskowski, M. A. and Spanjaard, L. (2002b) Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal bacterial meningitis in the Netherlands. *J Infect Dis* 185: 774-784.
- Johnson, J. R., Owens, K., Gajewski, A. and Clabots, C. (2008) *Escherichia coli* colonization patterns among human household members and pets, with attention to acute urinary tract infection. *J Infect Dis* 197: 218-224.
- Johnson, J. R. and Russo, T. A. (2002) Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary tract extraintestinal infections. *J Infect Dis* 186: 859-864.
- Johnson, J. R. and Stell, A. L. (2000) Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 181: 261-272.
- Johnson, T. J., Siek, K. E., Johnson, S. J. and Nolan, L. K. (2006) DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* 188: 745-758.
- Kallenius, G., Mollby, R., Svenson, S. B., Helin, I., Hultberg, H., Cedergren, B. and Winberg, J. (1981) Occurrence of P-fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections. *Lancet* 2: 1369-1372.
- Keane, W. F., Welch, R., Gekker, G. and Peterson, P. K. (1987) Mechanism of *Escherichia coli* alpha-hemolysin-induced injury to isolated renal tubular cells. *Am J Pathol* 126: 350-357.
- Khan, N. A., Wang, Y., Kim, K. J., Chung, J. W., Wass, C. A. and Kim, K. S. (2002) Cytotoxic necrotizing factor-1 contributes to *Escherichia coli* K1 invasion of the central nervous system. *J Biol Chem* 277: 15607-15612.
- Kim, K. S. (2001) *Escherichia coli* translocation at the blood-brain barrier. *Infect Immun* 69: 5217-5222.
- Kim, K. S. (2006) Microbial translocation of the blood-brain barrier. *Int J Parasitol* 36: 607-614.
- Klemm, P., Orskov, I. and Orskov, F. (1982) F7 and type 1-like fimbriae from three *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections: protein chemical and immunological aspects. *Infect Immun* 36: 462-468.
- Kohler, C. D. and Dobrindt, U. (2011) What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *Int J Med Microbiol* 301: 642-647.

- Koljalg, S., Truusalu, K., Vainumae, I., Stsepetova, J., Sepp, E. and Mikelsaar, M. (2009) Persistence of *Escherichia coli* clones and phenotypic and genotypic antibiotic resistance in recurrent urinary tract infections in childhood. *J Clin Microbiol* 47: 99-105.
- Konig, B., Konig, W., Scheffer, J., Hacker, J. and Goebel, W. (1986) Role of *Escherichia coli* alpha-hemolysin and bacterial adherence in infection: requirement for release of inflammatory mediators from granulocytes and mast cells. *Infect Immun* 54: 886-892.
- Korhonen, T. K., Parkkinen, J., Hacker, J., Finne, J., Pere, A., Rhen, M. and Holthofer, H. (1986) Binding of *Escherichia coli* S fimbriae to human kidney epithelium. *Infect Immun* 54: 322-327.
- Korhonen, T. K., Vaisanen-Rhen, V., Rhen, M., Pere, A., Parkkinen, J. and Finne, J. (1984) *Escherichia coli* fimbriae recognizing sialyl galactosides. *J Bacteriol* 159: 762-766.
- Korhonen, T. K., Vaisanen, V., Saxen, H., Hultberg, H. and Svenson, S. B. (1982) P-antigen-recognizing fimbriae from human uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* 37: 286-291.
- Kroghfelt, K. A., Bergmans, H. and Klemm, P. (1990) Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infect Immun* 58: 1995-1998.
- Kudinha, T., Johnson, J. R., Andrew, S. D., Kong, F., Anderson, P. and Gilbert, G. L. (2013) Distribution of phylogenetic groups, sequence type ST131, and virulence-associated traits among *Escherichia coli* isolates from men with pyelonephritis or cystitis and healthy controls. *Clin Microbiol Infect* 19: E173-180.
- Kumpf, O. and Schumann, R. R. (2008) Genetic influence on bloodstream infections and sepsis. *Int J Antimicrob Agents* 32 Suppl 1: S44-50.
- Lane, M. C. and Mobley, H. L. (2007) Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int* 72: 19-25.
- Langermann, S., Palaszynski, S., Barnhart, M., Auguste, G., Pinkner, J. S., Burlein, J., Barren, P., Koenig, S., Leath, S., Jones, C. H. and Hultgren, S. J. (1997) Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science* 276: 607-611.
- Lara-Tejero, M. and Galan, J. E. (2000) A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science* 290: 354-357.
- Lavigne, J. P., Blanc-Potard, A. B., Bourg, G., Moreau, J., Chanal, C., Bouziges, N., O'Callaghan, D. and Sotto, A. (2006) Virulence genotype and nematode-killing properties of extra-intestinal *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 12: 1199-1206.
- Lee, R. B., Hassane, D. C., Cottle, D. L. and Pickett, C. L. (2003) Interactions of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin subunits CdtA and CdtC with HeLa cells. *Infect Immun* 71: 4883-4890.
- Lee, S., Yu, J. K., Park, K., Oh, E. J., Kim, S. Y. and Park, Y. J. (2010) Phylogenetic groups and virulence factors in pathogenic and commensal strains of *Escherichia coli* and their association with *bla*CTX-M. *Ann Clin Lab Sci* 40: 361-367.
- Leying, H., Suerbaum, S., Kroll, H. P., Stahl, D. and Opferkuch, W. (1990) The capsular polysaccharide is a major determinant of serum resistance in K-1-positive blood culture isolates of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 58: 222-227.
- Litwin, C. M. and Calderwood, S. B. (1993) Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* 6: 137-149.
- Lund, B., Lindberg, F., Marklund, B. I. and Normark, S. (1987) The PapG protein is the alpha-D-galactopyranosyl-(1----4)-beta-D-galactopyranose-binding adhesin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 5898-5902.

- Maltby, R., Leatham-Jensen, M. P., Gibson, T., Cohen, P. S. and Conway, T. (2013) Nutritional basis for colonization resistance by human commensal *Escherichia coli* strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157:H7 in the mouse intestine. *PLoS One* 8: e53957.
- Marschall, J., Zhang, L., Foxman, B., Warren, D. K. and Henderson, J. P. (2012) Both host and pathogen factors predispose to *Escherichia coli* urinary-source bacteremia in hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 54: 1692-1698.
- Maruvada, R. and Kim, K. S. (2012) IbeA and OmpA of *Escherichia coli* K1 exploit Rac1 activation for invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* 80: 2035-2041.
- Menestrina, G., Mackman, N., Holland, I. B. and Bhakdi, S. (1987) *Escherichia coli* haemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 905: 109-117.
- Mills, M., Meysick, K. C. and O'Brien, A. D. (2000) Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. *Infect Immun* 68: 5869-5880.
- Mitsumori, K., Terai, A., Yamamoto, S. and Yoshida, O. (1998) Identification of S, F1C and three PapG fimbrial adhesins in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* 21: 261-268.
- Mokady, D., Gophna, U. and Ron, E. Z. (2005) Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 43: 66-73.
- Moll, A., Manning, P. A. and Timmis, K. N. (1980) Plasmid-determined resistance to serum bactericidal activity: a major outer membrane protein, the *traT* gene product, is responsible for plasmid-specified serum resistance in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 28: 359-367.
- Montenegro, M. A., Bitter-Suermann, D., Timmis, J. K., Aguero, M. E., Cabello, F. C., Sanyal, S. C. and Timmis, K. N. (1985) *traT* gene sequences, serum resistance and pathogenicity-related factors in clinical isolates of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *J Gen Microbiol* 131: 1511-1521.
- Nataro, J. P. and Kaper, J. B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11: 142-201.
- Negre, V. L., Bonacorsi, S., Schubert, S., Bidet, P., Nassif, X. and Bingen, E. (2004) The siderophore receptor IroN, but not the high-pathogenicity island or the hemin receptor ChuA, contributes to the bacteremic step of *Escherichia coli* neonatal meningitis. *Infect Immun* 72: 1216-1220.
- Nicolle, L. E. (2008) Short-term therapy for urinary tract infection: success and failure. *Int J Antimicrob Agents* 31 Suppl 1: S40-45.
- Nowicki, B., Labigne, A., Moseley, S., Hull, R., Hull, S. and Moulds, J. (1990) The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. *Infect Immun* 58: 279-281.
- Nowicki, B., Moulds, J., Hull, R. and Hull, S. (1988) A hemagglutinin of uropathogenic *Escherichia coli* recognizes the Dr blood group antigen. *Infect Immun* 56: 1057-1060.
- Nowrouzian, F., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegard, I. L., Aberg, N., Wold, A. E. and Adlerberth, I. (2003) *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatr Res* 54: 8-14.
- Oliveira, F. A., Paludo, K. S., Arend, L. N., Farah, S. M., Pedrosa, F. O., Souza, E. M., Surek, M., Picheth, G. and Fadel-Picheth, C. M. (2011) Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Genet Mol Res* 10: 4114-4125.
- Opal, S., Cross, A. and Gemski, P. (1982) K antigen and serum sensitivity of rough *Escherichia coli*. *Infect Immun* 37: 956-960.

- Opal, S. M., Cross, A. S., Gemski, P. and Lyhte, L. W. (1990) Aerobactin and alpha-hemolysin as virulence determinants in *Escherichia coli* isolated from human blood, urine, and stool. *J Infect Dis* 161: 794-796.
- Orskov, F. and Orskov, I. (1992) *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol* 38: 699-704.
- Ott, M., Hoschutzky, H., Jann, K., Van Die, I. and Hacker, J. (1988) Gene clusters for S fimbrial adhesin (*sfa*) and F1C fimbriae (*foc*) of *Escherichia coli*: comparative aspects of structure and function. *J Bacteriol* 170: 3983-3990.
- Otto, G., Sandberg, T., Marklund, B. I., Ulleryd, P. and Svanborg, C. (1993) Virulence factors and *pap* genotype in *Escherichia coli* isolates from women with acute pyelonephritis, with or without bacteremia. *Clin Infect Dis* 17: 448-456.
- Parkkinen, J., Rogers, G. N., Korhonen, T., Dahr, W. and Finne, J. (1986) Identification of the O-linked sialyloligosaccharides of glycophorin A as the erythrocyte receptors for S-fimbriated *Escherichia coli*. *Infect Immun* 54: 37-42.
- Parv, K. (2013) Bakalaureusetöö. Inimese kliinilistest materjalidest ja seedetrakti mikrobiootast isoleeritud *Escherichia coli* tüvede jaotumine fülogeneetilistesse gruppidesse
- Pelludat, C., Rakin, A., Jacobi, C. A., Schubert, S. and Heesemann, J. (1998) The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation. *J Bacteriol* 180: 538-546.
- Peres, S. Y., Marches, O., Daigle, F., Nougayrede, J. P., Herault, F., Tasca, C., De Rycke, J. and Oswald, E. (1997) A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol Microbiol* 24: 1095-1107.
- Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K. M. and Bonomo, R. A. (2007) The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol* 7: 459-469.
- Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J. and Denamur, E. (1999) The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* 67: 546-553.
- Pitout, J. D. (2012) Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. *Front Microbiol* 3: 9.
- Poulsen, L. K., Lan, F., Kristensen, C. S., Hobolth, P., Molin, S. and Krogfelt, K. A. (1994) Spatial distribution of *Escherichia coli* in the mouse large intestine inferred from rRNA in situ hybridization. *Infect Immun* 62: 5191-5194.
- Prasadarao, N. V., Wass, C. A., Huang, S. H. and Kim, K. S. (1999) Identification and characterization of a novel Ibe10 binding protein that contributes to *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* 67: 1131-1138.
- Qin, X., Hu, F., Wu, S., Ye, X., Zhu, D., Zhang, Y. and Wang, M. (2013) Comparison of Adhesin Genes and Antimicrobial Susceptibilities between Uropathogenic and Intestinal Commensal *Escherichia coli* Strains. *PLoS One* 8: e61169.
- Ramos, N. L., Saayman, M. L., Chapman, T. A., Tucker, J. R., Smith, H. V., Faoagali, J., Chin, J. C., Brauner, A. and Katouli, M. (2010) Genetic relatedness and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and uroseptic patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29: 15-23.
- Rennie, R. P. and Arbuthnott, J. P. (1974) Partial characterisation of *Escherichia coli* haemolysin. *J Med Microbiol* 7: 179-188.
- Rhen, M. and Sukupolvi, S. (1988) The role of the *traT* gene of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid for serum resistance and growth within liver macrophages. *Microb Pathog* 5: 275-285.
- Rhen, M., Vaisanen-Rhen, V., Saraste, M. and Korhonen, T. K. (1986) Organization of genes expressing the blood-group-M-specific hemagglutinin of *Escherichia coli*:

- identification and nucleotide sequence of the M-agglutinin subunit gene. *Gene* 49: 351-360.
- Rijavec, M., Muller-Premru, M., Zakotnik, B. and Zgur-Bertok, D. (2008) Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. *J Med Microbiol* 57: 1329-1334.
- Russo, T. A. and Johnson, J. R. (2000) Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* 181: 1753-1754.
- Russo, T. A. and Johnson, J. R. (2003) Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect* 5: 449-456.
- Russo, T. A., Sharma, G., Brown, C. R. and Campagnari, A. A. (1995a) Loss of the O4 antigen moiety from the lipopolysaccharide of an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* has only minor effects on serum sensitivity and virulence in vivo. *Infect Immun* 63: 1263-1269.
- Russo, T. A., Stapleton, A., Wenderoth, S., Hooton, T. M. and Stamm, W. E. (1995b) Chromosomal restriction fragment length polymorphism analysis of *Escherichia coli* strains causing recurrent urinary tract infections in young women. *J Infect Dis* 172: 440-445.
- Sannes, M. R., Kuskowski, M. A., Owens, K., Gajewski, A. and Johnson, J. R. (2004) Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. *J Infect Dis* 190: 2121-2128.
- Schlager, T. A., Hendley, J. O., Bell, A. L. and Whittam, T. S. (2002) Clonal diversity of *Escherichia coli* colonizing stools and urinary tracts of young girls. *Infect Immun* 70: 1225-1229.
- Schubert, S., Cuenca, S., Fischer, D. and Heesemann, J. (2000) High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in enterobacteriaceae isolated from blood cultures and urine samples: prevalence and functional expression. *J Infect Dis* 182: 1268-1271.
- Schubert, S., Picard, B., Gouriou, S., Heesemann, J. and Denamur, E. (2002) *Yersinia* high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Infect Immun* 70: 5335-5337.
- Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E. and Heesemann, J. (1998) Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect Immun* 66: 480-485.
- Scott, D. A. and Kaper, J. B. (1994) Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. *Infect Immun* 62: 244-251.
- Shin, S., Lu, G., Cai, M. and Kim, K. S. (2005) *Escherichia coli* outer membrane protein A adheres to human brain microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 330: 1199-1204.
- Silva, M., Jr., Marra, A. R., Pereira, C. A., Medina-Pestana, J. O. and Camargo, L. F. (2010) Bloodstream infection after kidney transplantation: epidemiology, microbiology, associated risk factors, and outcome. *Transplantation* 90: 581-587.
- Skogberg, K., Lyytikainen, O., Ruutu, P., Ollgren, J. and Nuorti, J. P. (2008) Increase in bloodstream infections in Finland, 1995-2002. *Epidemiol Infect* 136: 108-114.
- Skurnik, D., Bonnet, D., Bernede-Bauduin, C., Michel, R., Guette, C., Becker, J. M., Balaire, C., Chau, F., Mohler, J., Jarlier, V., Boutin, J. P., Moreau, B., Guillemot, D., Denamur, E., Andremont, A. and Ruimy, R. (2008) Characteristics of human intestinal *Escherichia coli* with changing environments. *Environ Microbiol* 10: 2132-2137.
- Stins, M. F., Prasadara, N. V., Ibric, L., Wass, C. A., Luckett, P. and Kim, K. S. (1994) Binding characteristics of S fimbriated *Escherichia coli* to isolated brain microvascular endothelial cells. *Am J Pathol* 145: 1228-1236.

- Zhang, L. H., Fath, M. J., Mahanty, H. K., Tai, P. C. and Kolter, R. (1995) Genetic analysis of the colicin V secretion pathway. *Genetics* 141: 25-32.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B. and Denamur, E. (2010) The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 8: 207-217.
- Teng, C. H., Cai, M., Shin, S., Xie, Y., Kim, K. J., Khan, N. A., Di Cello, F. and Kim, K. S. (2005) *Escherichia coli* K1 RS218 interacts with human brain microvascular endothelial cells via type 1 fimbria bacteria in the fimbriated state. *Infect Immun* 73: 2923-2931.
- Toth, I., Nougayrede, J. P., Dobrindt, U., Ledger, T. N., Boury, M., Morabito, S., Fujiwara, T., Sugai, M., Hacker, J. and Oswald, E. (2009) Cytolethal distending toxin type I and type IV genes are framed with lambdoid prophage genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 77: 492-500.
- Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., Calteau, A., Chiapello, H., Clermont, O., Cruveiller, S., Danchin, A., Diard, M., Dossat, C., Karoui, M. E., Frapy, E., Garry, L., Ghigo, J. M., Gilles, A. M., Johnson, J., Le Bouguenec, C., Lescat, M., Mangenot, S., Martinez-Jehanne, V., Matic, I., Nassif, X., Oztas, S., Petit, M. A., Pichon, C., Rouy, Z., Ruf, C. S., Schneider, D., Turret, J., Vacherie, B., Vallenet, D., Medigue, C., Rocha, E. P. and Denamur, E. (2009) Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet* 5: e1000344.
- Uslan, D. Z., Crane, S. J., Steckelberg, J. M., Cockerill, F. R., 3rd, St Sauver, J. L., Wilson, W. R. and Baddour, L. M. (2007) Age- and sex-associated trends in bloodstream infection: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Arch Intern Med* 167: 834-839.
- Waldor, M. K. and Mekalanos, J. J. (1996) Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 272: 1910-1914.
- Walsh, C. (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406: 775-781.
- Valvano, M. A. (1992) Pathogenicity and molecular genetics of O-specific side-chain lipopolysaccharides of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 38: 711-719.
- Watts, R. E., Totsika, M., Challinor, V. L., Mabbett, A. N., Ulett, G. C., De Voss, J. J. and Schembri, M. A. (2012) Contribution of siderophore systems to growth and urinary tract colonization of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli*. *Infect Immun* 80: 333-344.
- Venturini, C., Beatson, S. A., Djordjevic, S. P. and Walker, M. J. (2010) Multiple antibiotic resistance gene recruitment onto the enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence plasmid. *FASEB J* 24: 1160-1166.
- Vermeulen, C., Cross, A., Byrne, W. R. and Zollinger, W. (1988) Quantitative relationship between capsular content and killing of K1-encapsulated *Escherichia coli*. *Infect Immun* 56: 2723-2730.
- Whitfield, C. (2006) Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem* 75: 39-68.
- Whitfield, C. and Roberts, I. S. (1999) Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 31: 1307-1319.
- Wright, K. J. and Hultgren, S. J. (2006) Sticky fibers and uropathogenesis: bacterial adhesins in the urinary tract. *Future Microbiol* 1: 75-87.
- Yang, C. C. and Konisky, J. (1984) Colicin V-treated *Escherichia coli* does not generate membrane potential. *J Bacteriol* 158: 757-759.

KASUTATUD VEEBIAADDRESS

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Jana Lillo

(sünnikuupäev: 04.01.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Inimese kliinilistest materjalidest ja normaalsest soole mikrofloorast isoleeritud *E. coli* tüvede virulentsusfaktorid

mille juhendajad on Epp Sepp ja Siiri Kõljalg

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2013