



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
DEPARTMAN ZA VETERINARSKU MEDICINU

**FENOTIPSKU I GENOTIPSKU
KARAKTERISTIKU *ESCHERICHIA
COLI* IZOLOVANIH IZ FECESA PASA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Prof. dr Aleksandar Potkonjak,
vanredni profesor
Prof. dr Ljubica Spasojević Kosić,
vanredni profesor

Kandidat:

Vuk Vračar, dr. vet. med.

Novi Sad, 2018. godine

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Vuk Vračar
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Aleksandar Potkonjak, vanredni profesor Dr Ljubica Spasojević Kosić, vanredni profesor
Naslov rada: NR	Fenotipske i genotipske karakteristike <i>Escherichia coli</i> izolovanih iz fecesa pasa
Jezik publikacije: JP	srpski
Jezik izvoda: JI	srpski /engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Autonomna Pokrajina Vojvodina
Godina: GO	2018
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8

Fizički opis rada: FO	(10 poglavlja / 100 stranica / 17 slika / 10 tabela / 5 grafikona / 194 reference / 2 priloga)
Naučna oblast: NO	Veterinarska medicina
Naučna disciplina: ND	Veterinarska mikrobiologija i zarazne bolesti životinja
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	<i>Escherichia coli</i> , STEC, psi, dijagnostika, antibiotska rezistencija, Republika Srbija
UDK	561.23:596.74(043.3)
Čuva se: ČU	Biblioteka Poljoprivrednog fakulteta, Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	<p>Šiga toksin produkujuće <i>Escherichia coli</i> (STEC) čine jednu od šest grupa dijarejagenih <i>E. coli</i>. Na svjetskom nivou, infekcija izazvana STEC najčešći je uzrok akutne renalne insuficijencije kod djece i starijih osoba. Kako su psi prepoznati kao rezervoari STEC, blizak kontakt ljudi i pasa predstavlja rizik za zoonotsku transmisiju ovih bakterija.</p> <p>U Republici Srbiji, osim ograničenog broja istraživanja o prisustvu STEC kod domaćih životinja i ljudi nema dostupnih literaturnih podataka o istraživanjima ove grupe <i>E. coli</i> kod pasa. Stoga, cilj ove doktorske disertacije bio je da se dokaže prisustvo i utvrdi prevalencija STEC u populaciji pasa s teritorije grada Novog Sada, izvrši tipizacija i molekularna karakterizacija sojeva <i>E. coli</i> izolovanih iz fecesa pasa i utvrdi prisustvo rezistentnih sojeva <i>E. coli</i>.</p> <p>U ovo istraživanje bio je uključen 101 pas s teritorije Novog Sada, a kao materijal korišćeni su uzorci fecesa pasa. U cilju izolacije <i>E. coli</i> iz fecesa pasa primijenjeni su standardni bakteriološki metodi izolacije i biohemijske identifikacije, a potvrda pripadnosti vrsti izvršena je korišćenjem matricom potpomognute laserske desorpcije/ionizacije-vrijeme preleta masene spektrometrije (MALDI-TOF MS). Za utvrđivanje prisustva STEC kod pasa primijenjeni su metodi lateks aglutinacije za serogrupu O157, direktne aglutinacije za serogrupe "velike šestorke" O26, O45, O103, O111, O121 i O145, test verocitotoksičnosti (VCA), imunoenzimski test (ELISA), kao i lančana reakcija polimeraze (PCR). Antibiotska rezistencija utvrđena je disk difuzionim metodom prema standardima EUCAST i CLSI.</p> <p>U ovom istraživanju, po prvi put u Republici Srbiji, dokazano je prisustvo STEC u populaciji pasa. Primjenom VCA metoda ustanovljena je prevalencija od 1,98%, dok je primjenom ELISA i PCR metoda ustanovljena prevalencija od 5,94% odnosno 4,95%. Dva izolata <i>E. coli</i> pripadala su nekoj od serogrupa "velike šestorke" STEC, dok prisustvo sojeva iz serogrupe O157 nije utvrđeno. U ispitivanoj populaciji pasa utvrđeno je prisustvo sojeva <i>E. coli</i> rezistentnih na jedan ili više korišćenih antibiotika, kao i jednog multirezistentnog izolata. Najviše izolata <i>E. coli</i> pokazalo je rezistenciju na ampicilin (22,5%), dok nijedan izolat nije pokazao rezistenciju na gentamicin. Pozitivna</p>

povezanost utvrđena je između stila života psa i prisustva STEC. Naime, značajno veća prevalencija STEC, u odnosu na vlasničke pse, zabilježena je kod pasa lotalica, što je vjerovatno posljedica neograničene slobode kretanja, a time i češćeg kontakta s kontaminiranom hranom i vodom kao izvorom STEC.

Nalaz STEC i izolata *E. coli* rezistentnih na antibiotike kod pasa od značaja je kako s aspekta male kliničke prakse tako i s aspekta javnog zdravlja u Republici Srbiji.

Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	08. mart 2018. godine
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>Mentor: _____</p> <p>dr Aleksandar Potkonjak, vanredni profesor Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>Mentor: _____</p> <p>dr Ljubica Spasojević Kosić, vanredni profesor Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>Predsjednik: _____</p> <p>dr Vesna Lalošević, redovni profesor Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>Član: _____</p> <p>dr Dragan Rogan, redovni profesor Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>Član: _____</p> <p>dr Dušan Mišić, vanredni profesor Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Doctoral dissertation
Author: AU	Vuk Vračar
Mentor: MN	Dr Aleksandar Potkonjak, Associate professor Dr Ljubica Spasojević Kosić, Associate professor
Title: TI	Phenotypic and genotypic characteristics of <i>Escherichia coli</i> isolated from faeces of dogs
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	english / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2018
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8

Physical description: PD	10 chapters / 100 pages / 17 figures / 10 tables / 5 charts / 194 references / 2 appendices
Scientific field SF	Veterinary medicine
Scientific discipline SD	Veterinary microbiology and infectious diseases of animals
Subject, Key words SKW	<i>Escherichia coli</i> , STEC, dogs, diagnostic, antibiotic resistance, Republic of Serbia
UC	561.23:596.74(043.3)
Holding data: HD	Library, Faculty of Agriculture, Novi Sad
Note: N	None
Abstract: AB	<p>Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> (STEC) strains constitute one of six groups of diarrheagenic <i>E. coli</i>. Infection caused by STEC is the most common cause of acute renal failure in young children and elderly people worldwide. As dogs are recognized as a reservoir for STEC, the close contact between humans and dogs poses a risk for zoonotic transmission of these bacteria.</p> <p>Except scarce studies of STEC in humans and domestic animals, there are no available data about this <i>E. coli</i> group in dogs in the Republic of Serbia. Therefore the aim of this doctoral dissertation was to determine the presence and prevalence of STEC in the dog population in the area of Novi Sad, to perform typing and molecular characterization of <i>E. coli</i> strains isolated from faeces of dogs, as well to determine the presence of antibiotic resistant <i>E. coli</i> strains.</p> <p>In total 101 dogs from the area of Novi Sad was included in this research. As the material fecal samples of dogs were used. In order to isolate <i>E. coli</i> strains from faeces standard methods of bacterial isolation and biochemical identification were used, and for the confirmation of species identity matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) was used. In order to determine the presence of STEC in dogs latex agglutination for the serogroup O157, direct agglutination for “big six” serogroups (O26, O45, O103, O111, O121 and O145), Vero cell cytotoxicity assay (VCA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR) were used. Antibiotic resistance was determined by disc diffusion method according to the EUCAST and CLSI guidelines.</p> <p>In this research, for the first time in the Republic of Serbia, the presence of STEC has been proven in the dog population. By VCA method the prevalence of 1,98% was determined, while by ELISA and PCR the determined prevalence was 5,94% and 4,95% respectively. Two <i>E. coli</i> isolates belonged to some of the STEC “big six” serogroups, while none of the isolates belonged to O157 serogroup. Furthermore, in the dog population included in this research, the presence of strains resistant to one or more of used antibiotics was determined, as well as the presence of one multiresistant strain.</p>

Most of the *E coli* isolates showed resistance to ampicillin (22,5%), while every of the isolates showed susceptibility to gentamicin. In this research significant association between lifestyle of dogs and STEC harbouring. That is to say, significantly higher STEC prevalence was noticed in stray dogs in comparison to pet dogs, what is likely due to unlimited freedom of movement and thereby more frequent contact with contaminated water and food as sources of STEC.

Finding of STEC and *E. coli* strains resistant to antibiotics in dog population is of importance not just in small animal practice, but also in terms of public health in the Republic of Serbia.

Accepted on Senate on:
AS

8 March 2018

Defended:
DE

Thesis Defend Board:
DB

Mentor: _____

Dr Aleksandar Potkonjak, Associate professor
Faculty of Agriculture, University of Novi Sad

Mentor: _____

Dr Ljubica Spasojević Kosić, Associate professor
Faculty of Agriculture, University of Novi Sad

President: _____

Dr Vesna Lalošević, Full professor
Faculty of Agriculture, University of Novi Sad

Member: _____

Dr Dragan Rogan, Full professor
Faculty of Agriculture, University of Novi Sad

Member: _____

Dr Dušan Mišić, Associate professor
Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade

SPISAK SKRAĆENICA

A/E – histopatološke lezije koje se ogledaju u izmjeni oblika enterocita i gubitku mikrovila

AK – amino kiselina

BHI – moždano-srčani infuzioni bujon

cfu/g – colony forming jedinica po gramu

cfu/ml – jedinica koje formiraju kolonije u mililitru

CI – interval povjerenja

DAEC – difuzno adherentne *Escherichia coli*

DEC – dijarejagene *Escherichia coli*

EA – Endo agar

EAggEC – enteroagregativne *Escherichia coli*

ECP – uobičajeni *Escherichia coli* pilus

Efa1 – faktor adherencije enterohemoragičnih *Escherichia coli*

EHEC – enterohemoragične *Escherichia coli*

Ehx – enterohemolizin

EIEC - enteroinvazivne *Escherichia coli*

ELISA – imunoenzimski test

EPEC – enteropatogene *Escherichia coli*

ESLB – beta-laktamaze proširenog spektra

ETEC – enterotoksične *Escherichia coli*

g – sila ubrzanja

Gb3 – globotriaosilceramid

GIT – gastrointestinalni trakt

GMEM - Glasgow's Minimum Essential Medium ()

HBI – hronična bubrežna insuficijencija

HK – hemoragični kolitis
HUS – hemolitičko uremični sindrom
IBD – inflamatorna bolest crijeva
Iha – protein koji obezbjeđuje adherenciju,
KA – krvni agar
LEE – lokus za gubitak enterocita
Lpf – duge polarne fimbrije
LPS – lipopolisaharid
MALDI-TOF – matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija-vrijeme preleta
masena spektrometrija
MR – metil-crveno test
non-O157 – sojevi koji ne pripadaju serograpi O157 *Escherichia coli*
PAI – hromozomsko patogeno ostrvo
PCR – lančana reakcije polimeraze
PFGE – elektroforeza u pulsirajućem polju
PMF – proteinski maseni otisak
RFLP – analiza polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata
rpm – rotacija po minutu
RTX – repeats-in toksini
Saa – aglutinirajući adhezin prepoznat kod LEE-negativnih sojeva
Sab – autotransporterni protein koji pomaže adherenciju i formiranje biofilma
Sfp – fimbrije sobitol-fermentirajućih enterohemoragičnih *Escherichia coli* O157
SMAC – sorbitol-MacConkey agar
STEC – šiga toksin produkujuće *Escherichia coli*
Stx – šiga toksin
TBE – pufer Tris/Borate/Etilendiaminotetrasirćetna kiselina
Tir – translocirani intiminski receptor
TISS – I tip sekretornog sistema
ToxB – protein kodiran na velikom pO157 plazmidu koji je neophodan za punu
ekspresiju adherencije O157:H7 Sakai soja
TSB – tripton soja bujon

TTSS – III tip sekretornog sistema

VCA – test verocitotoksičnosti

VP – Voges-Proskauer test

VT – Vero toksin

VTEC – verotoksin produkujuće *Escherichia coli*

SADRŽAJ

KRATAK SADRŽAJ	i
ABSTRACT	ii
1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Mikrobiom gastrointestinalnog trakta psa.....	3
2.2. Uloga <i>E.coli</i> u mikrobiomu gastrointestinalnog trakta psa.....	4
2.3. Faktori virulencije STEC.....	5
2.3.1. Šiga toksini.....	5
2.3.2. Lokus za gubitak enterocita.....	8
2.4. Epidemiologija STEC.....	11
2.5. Klinička slika STEC infekcija.....	15
2.6. Terapija i profilaksa STEC infekcija.....	16
2.7. Antibiotička rezistencija.....	18
2.8. Dijagnostika STEC.....	20
2.7.1. Izolacija i identifikacija.....	21
2.7.2. Test na Vero kulturi ćelija.....	22
2.7.3. Imunoenzimski testovi.....	22
2.7.4. Lančana reakcija polimeraze (PCR).....	23
2.7.5. Serotipizacija.....	23
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	25
4. HIPOTEZA	27
5. MATERIJAL I METODI	28
5.1. Materijal.....	28
5.1.1. Izbor i veličina uzorka.....	28

5.1.2. Prikupljanje uzoraka.....	29
5.2. Metodi	29
5.2.1. Izolacija i identifikacija	29
5.2.2. Serotipizacija za serogrupu O157.....	30
5.2.3. Biohemijska identifikacija.....	32
5.2.3.1. Indol test, pokretljivost i test produkcije sulfida	32
5.2.3.2. Metil-crveno i Voges Proskauer test	32
5.2.3.3. Test korišćenja citrata.....	33
5.2.3.4. Test fermentacije laktoze i glukoze uz produkciju gasa i H ₂ S na dvostrukom Kligler agaru.....	33
5.2.3.5. Interpretacija biohemijskih testova.....	34
5.2.4. Čuvanje sojeva.....	34
5.2.5. Osvježavanje sojeva	35
5.2.6. Matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija-vrijeme preleta masena spektrometrija (MALDI-TOF)	35
5.2.7. Aglutinacija	36
5.2.8. Dokazivanje produkcije toksina na Vero kulturi ćelija	36
5.2.9. Dokazivanje produkcije toksina imunoezimskim testom (ELISA).....	38
5.2.10. Ekstrakcija DNK iz kultura	40
5.2.11. Ekstrakcija DNK iz fecesa.....	41
5.2.12. Dokazivanje posjedovanja gena virulencije Stx1, Stx2 i eae	43
5.2.13. Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti	44
5.2.14. Statistička analiza podataka.....	46
6. REZULTATI.....	47
6.1. Rezultati epidemiološke ankete.....	47
6.2. Rezultati izolacije i identifikacije.....	51
6.3. Rezultati biohemijske identifikacije.....	52
6.4. Rezultati matricom potpomognute laserske desorpcije /ionizacije-vrijeme preleta masene spektrometrije (MALDI-TOF)	54
6.5. Rezultati očitavanja stvaranja hemolize	55
6.6. Rezultati lateks aglutinacije	56
6.7. Rezultati aglutinacije.....	56

6.8. Rezultati testa verocitotoksičnosti (VCA).....	57
6.9. Rezultati imunoenzimskog testa (ELISA).....	59
6.10. Rezultati testa lančane reakcije polimeraze (PCR)	60
6.11. Rezultati antimikrobne rezistencije	61
6.12. Rezultati statističke analize	64
7. DISKUSIJA	66
8. ZAKLJUČCI.....	80
9. LITERATURA.....	81
10. PRILOZI.....	96

KRATAK SADRŽAJ

Šiga toksin produkujuće *Escherichia coli* (STEC) čine jednu od šest grupa dijarejaganih *E. coli*. Na svjetskom nivou, infekcija izazvana STEC najčešći je uzrok akutne renalne insuficijencije kod djece i starijih osoba. Kako su psi prepoznati kao rezervoari STEC, blizak kontakt ljudi i pasa predstavlja rizik za zoonotsku transmisiju ovih bakterija.

U Republici Srbiji, osim ograničenog broja istraživanja o prisustvu STEC kod domaćih životinja i ljudi nema dostupnih literaturnih podataka o istraživanjima ove grupe *E. coli* kod pasa. Stoga, cilj ove doktorske disertacije bio je da se dokaže prisustvo i utvrdi prevalencija STEC u populaciji pasa s teritorije grada Novog Sada, izvrši tipizacija i molekularna karakterizacija sojeva *E. coli* izolovanih iz fecesa pasa i utvrdi prisustvo rezistentnih sojeva *E. coli*.

U ovo istraživanje bio je uključen 101 pas s teritorije Novog Sada, a kao materijal korišćeni su uzorci fecesa pasa. U cilju izolacije *E. coli* iz fecesa pasa primijenjeni su standardni bakteriološki metodi izolacije i biohemijske identifikacije, a potvrda pripadnosti vrsti izvršena je korišćenjem matricom potpomognute laserske desorpcije/ionizacije-vrijeme preleta masene spektrometrije (MALDI-TOF MS). Za utvrđivanje prisustva STEC kod pasa primijenjeni su metodi lateks aglutinacije za serogrupu O157, direktne aglutinacije za serogrupe “velike šestorke” O26, O45, O103, O111, O121 i O145, test verocitotoksičnosti (VCA), iminoenzimski test (ELISA), kao i lančana reakcija polimeraze (PCR). Antibiotiska rezistencija utvrđena je disk difuzionim metodom prema standardima EUCAST i CLSI.

U ovom istraživanju, po prvi put u Republici Srbiji, dokazano je prisustvo STEC u populaciji pasa. Primjenom VCA metoda ustanovljena je prevalencija od 1,98%, dok je primjenom ELISA i PCR metoda ustanovljena prevalencija od 5,94% odnosno 4,95%. Dva izolata *E. coli* pripadala su nekoj od serogrupa “velike šestorke” STEC, dok prisustvo sojeva iz serogrupe O157 nije utvrđeno. U ispitivanoj populaciji pasa utvrđeno je prisustvo sojeva *E. coli* rezistentnih na jedan ili više korišćenih antibiotika, kao i jednog multirezistentnog izolata. Najviše izolata *E. coli* pokazalo je rezistenciju na ampicilin (22,5%), dok nijedan izolat nije pokazao rezistenciju na gentamicin. Pozitivna povezanost utvrđena je između stila života psa i prisustva STEC. Naime, značajno veća prevalencija STEC, u odnosu na vlasničke pse, zabilježena je kod pasa lualica, što je vjerovatno posljedica neograničene slobode kretanja i time i češćeg kontakta s kontaminiranom hranom i vodom kao izvorom STEC.

Nalaz STEC i izolata *E. coli* rezistentnih na antibiotike kod pasa od značaja je kako s aspekta male kliničke prakse tako i s aspekta javnog zdravlja u Republici Srbiji.

ABSTRACT

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains constitute one of six groups of diarrheagenic *E. coli*. Infection caused by STEC is the most common cause of acute renal failure in young children and elderly people worldwide. As dogs are recognized as a reservoir for STEC, the close contact between humans and dogs poses a risk for zoonotic transmission of these bacteria.

Except scarce studies of STEC in humans and domestic animals, there are no available data about this *E. coli* group in dogs in the Republic of Serbia. Therefore the aim of this doctoral dissertation was to determine the presence and prevalence of STEC in the dog population in the area of Novi Sad, to perform typing and molecular characterization of *E. coli* strains isolated from faeces of dogs, as well to determine the presence of antibiotic resistant *E. coli* strains.

In total of 101 dogs from the area of Novi Sad was included in this research. As the material fecal samples of dogs were used. In order to isolate *E. coli* strains from faeces standard methods of bacterial isolation and biochemical identification were used, and for the confirmation of species identity matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) was used. In order to determine the presence of STEC in dogs latex agglutination for the serogroup O157, direct agglutination for “big six” serogroups (O26, O45, O103, O111, O121 and O145), Vero cell cytotoxicity assay (VCA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR) were used. Antibiotic resistance was determined by disc diffusion method according to the EUCAST and CLSI guidelines.

In this research, for the first time in the Republic of Serbia, the presence of STEC has been proven in the dog population. By VCA method the prevalence of 1,98% was determined, while by ELISA and PCR the determined prevalence was 5,94% and 4,95% respectively. Two *E. coli* isolates belonged to some of the STEC “big six” serogroups, while none of the isolates belonged to O157 serogroup. Furthermore, in the dog population included in this research, the presence of strains resistant to one or more of used antibiotics was determined, as well as the presence of one multiresistant strain. Most of the *E. coli* isolates showed resistance to ampicillin (22,5%), while every of the isolates showed susceptibility to gentamicin. In this research significant association between lifestyle of dogs and STEC harbouring. That is to say, significantly higher STEC prevalence was noticed in stray dogs in comparison to pet dogs, what is likely due to unlimited freedom of movement and thereby more frequent contact with contaminated water and food as sources of STEC.

Phenotypic and genotypic characteristics of Escherichia coli isolated from faeces of dogs

Finding of STEC and *E. coli* strains resistant to antibiotics in dog population is of importance not just in small animal practice, but also in terms of public health in the Republic of Serbia.

1. UVOD

U svojoj publikaciji iz 1885. godine, Theodor Escherich prvi je prijavio izolaciju i karakterizaciju tankih, kratkih štapića iz stolice odojčeta, koje je nazvao *Bacterium coli commune* (Escherich, 1988). Kasnije je ovaj mikroorganizam, od strane drugih istraživača opisivao pod velikim brojem sinonima, a od 1954. godine priznat je pod nazivom *Escherichia coli* (Cowan, 1954). *Escherichia coli* je Gram negativna, nesporulišuća, pokretna ili nepokretna bakterija, iz familije *Enterobacteriaceae*. Malo je mikroorganizama koji se kao *E. coli* mogu prilagoditi na promjene u okruženju, a upravo ta prilagodljivost omogućava im da prežive kao benigna komensalna flora u mnogim organskim sistemima sisara, kao što su gastrointestinalni i distalni urogenitalni trakt (Croxen i sar., 2013; Kaper i sar., 2004). Ipak, postoji i druga strana *E. coli* koja nastaje sticanjem novih faktora virulencije kroz dobijanje i gubitak gena koji im omogućava da postanu veoma različiti i visoko adaptivni uzročnici širokog spektra oboljenja (Croxen i sar., 2013). Ovi faktori virulencije često su kodirani genetskim elementima koji mogu biti prenešeni na različite sojeve kako bi se stvorile nove kombinacije faktora virulencije, ili na genetske elemente koji su možda jednom bili prenosivi, ali kada su evoluirali ostali su "zaključani" u genomu. Samo najuspješnije kombinacije faktora virulencije opstanu da bi postale specifični patotipovi *E. coli* koji su sposobni izazvati oboljenja kod zdravih jedinki (Kaper i sar., 2004). Osim bakterijskih faktora virulencije ulogu u nastanku infekcije imaju i slabljenje lokalnog i sistemskog imuniteta domaćina. Tri opšta klinička sindroma mogu nastati kao rezultat infekcije nekim od ovih patotipova i to su enterična odnosno dijarejalna oboljenja, infekcije urinarnog trakta, ali i sepsa i meningitis (Beutin, 1999; Kaper i sar., 2004; Marks i sar., 2011). Kod dijarejagenih *E. coli* (DEC) se na osnovu različitih epidemioloških i kliničkih osobina i specifičnih virulentnih determinanti, najčešće razlikuje 6 grupa i to: enteropatogene *E. coli* (EPEC),

enterotoksične *E. coli* (ETEC), enteroinvazivne *E. coli* (EIEC), šiga toksin produkujuće *E. coli* (STEC), enteroagregativne *E. coli* (EAaggEC) i difuzno adherentne *E. coli* (DAEC) (Gomes i sar., 2016; Kaper i sar., 2004; Taniuchi i sar., 2012). Na svjetskom nivou, infekcija izazvana STEC najčešći je uzrok akutne renalne insuficijencije kod djece i starijih osoba (Teel i sar., 2003). Domaće životinje uključujući i pse označene su kao rezervoari STEC za ljude (Croxen i sar., 2013; Sancak i sar., 2004).

U Republici Srbiji, osim ograničenog broja istraživanja o prisustvu STEC kod domaćih životinja i ljudi nema dostupnih literaturnih podataka o istraživanjima ove grupe *E. coli* kod pasa. Stoga, cilj ove doktorske disertacije bio je da se izvrši tipizacija i molekularna karakterizacija sojeva *E. coli* izolovanih iz fecesa pasa, dokaže prisustvo i utvrdi prevalencija STEC u populaciji pasa sa teritorije grada Novog Sada, kao i utvrdi prisustvo rezistentnih sojeva.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. MIKROBIOM GASTROINTESTINALNOG TRAKTA PSA

Mikrobiom gastrointestinalnog trakta (GIT) uključuje sva tri domena života odnosno arheje, bakterije i eukariote, pri čemu bakterije čine najzastupljeniju i metabolički najaktivniju grupu mikroorganizama. Metagenomska studija koju su sproveli Swanson i saradnici pokazala je da bakterije mogu činiti i 98% fekalnih mikrobiota psa, dok arheje, eukariote i virusi predstavljaju svega 2% (Swanson i sar., 2011). Sastav intestinalne bakterijske flore važan je faktor u nastanku infektivnih dijareja. Pored direktnog kompetitivnog isključivanja vezujućih mjesta za potencijalno patogene mikroorganizme, komensalne bakterije oblikuju intestinalnu mikrofloru njihovom kompleksnom i dinamičnom interakcijom s imunološkim sistemom domaćina (Viswanathan i sar., 2009). Normalna crijevna mikroflora obezbjeđuje i nutritivne benefite domaćinu, kroz recimo proizvodnju masnih kiselina kratkog lanca i vitamina B12, ali i igra ulogu u metabolizmu žučne kiseline i u fermentaciji ugljenih hidrata. Nasuprot tome, mikrobiotska disbioza prepoznata je kod pasa s gastrointestinalnim oboljenjima poput infektivnih dijareja (Suchodolski, 2011; Viswanathan i sar., 2009).

Razvoj molekularnih metoda unaprijedio je identifikaciju mikrobioma, pa je posljednjih godina nekoliko istraživanja bilo usmjereno na ispitivanje filogeneske strukture i funkcionalnog kapaciteta mikrobioma pasa, a poređenjem rezultata ovih studija uočava se da su se bakterijske populacije razlikovale u različitim uzorcima (uzorak mukoze, sadržaj crijeva i feces), različitim djelovima gastrointestinalnog trakta, ali i kod različitih starosnih kategorija pasa. Uglavnom, broj bakterija i njihov diverzitet rastu postepeno duž gastrointestinalnog trakta (Masuoka i sar., 2017; Schmitz i Suchodolski, 2016). Tako, broj bakterija najveći je u kolonu i kod zdravih pasa kreće se od 10^9 i 10^{11} CFU/g ili ml sadržaja crijeva, a *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus*

spp., *Bifidobacterium* spp., i *Enterobacteriaceae* najzastupljenije su bakterije izolovane iz crijeva zdravih pasa (Suchodolski, 2011).

2.2. ULOGA *E. COLI* U MIKROBIOMU GASTROINTESTINALNOG TRAKTA PSA

Escherichia coli, bakterija iz familije *Enterobacteriaceae*, sastavni je dio normalne crijevne mikroflore ljudi i toplokrvnih životinja. Kao i kod svih sisara, kolonizacija ovom bakterijom kod pasa dešava se već u prvim danima života (Beutin, 1999). Iako komensal, određeni sojevi *E. coli* dovode se u vezu s enteričnim i ekstraintestinalnim infekcijama koje se javljaju uslijed prisustva bakterijskih faktora virulencije i slabljenja lokalnog i sistemskog imuniteta domaćina omogućavajući nastanak oportunističkih infekcija (Beutin, 1999; Marks i sar., 2011). Ovi sojevi *E. coli* horizontalnim transferom stiču gene koji kodiraju faktore virulencije i povećavaju sposobnost bakterije da se adherira na ćelije domaćina, kolonizuje, produkuje toksine, iskoristi nutrijente domaćina i izbjegne njegov imunološki sistem (Johnson, 1991). Tri glavna patotipa *E. coli* koja se razlikuju komparativnom genomskom analizom su komensalne, dijarejagene i ekstraintestinalne patogene *E. coli* (Vila i sar., 2016).

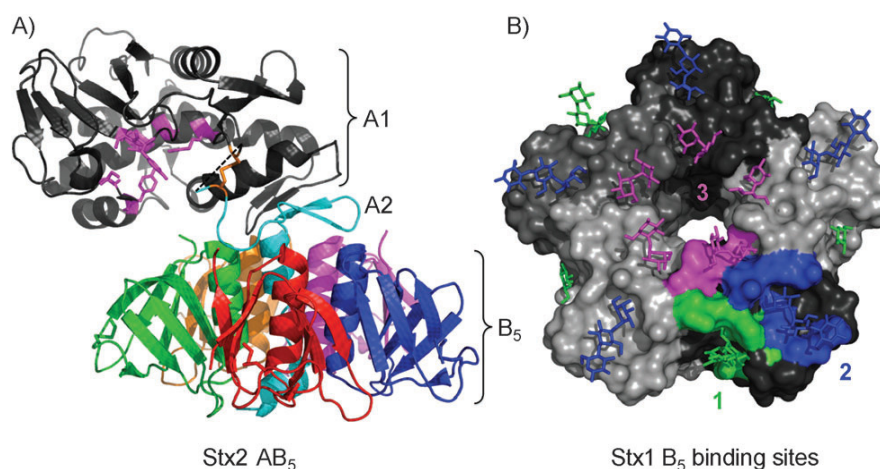
Većina istraživanja o *E. coli* bila je usmjerena na karakterizaciju sojeva povezanih s intestinalnim oboljenjima kod ljudi i farmskih životinja: goveda, svinja, ovaca i živine, međutim posljednjih godina pažnju istraživača privlače i *E. coli* koje izazivaju dijareju kod pasa. Prema markerima virulencije koji se dovode u vezu s dijarejagenim *E. coli* kod pasa, *E. coli* se dijele na enteropatogene *E. coli* (EPEC), enterotoksične *E. coli* (ETEC), enteroinvazivne *E. coli* (EIEC), šiga toksin produkujuće *E. coli* (STEC) i enteroagregativne *E. coli* (EAaggEC) (Puno-Sarmiento i sar., 2013).

Sojevi STEC, ili kako se još nazivaju verotoksin produkujuće *E. coli* (VTEC) mogu biti uzročnici dijareje kod pasa, a dokazana je i uloga pasa kao rezervoara ovih uzročnika (Garcia i sar., 2010; Sancak i sar., 2004).

2.3. FAKTORI VIRULENCIJE STEC

2.3.1. Šiga toksini

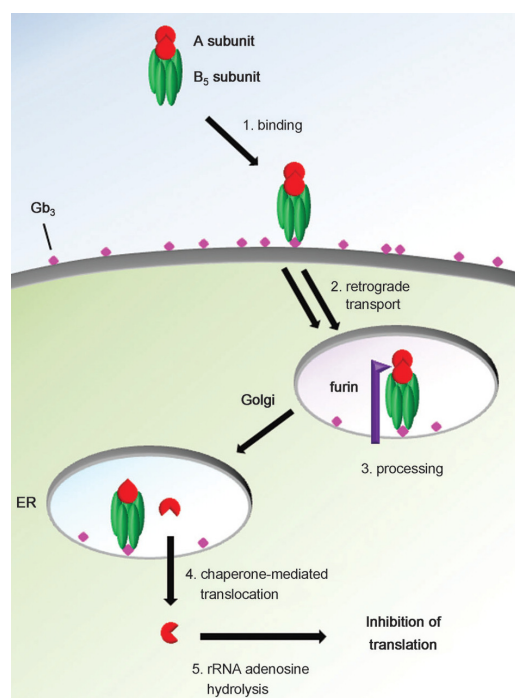
Osobinu koja razlikuje STEC od ostalih grupa patogenih *E. coli* prijavili su Konowalchuk i saradnici još 1977. godine, a odnosila se na produkciju toksina koji imaju dubok i ireverzibilan citopatogeni efekat na Vero ćelije (Konowalchuk i sar., 1977). Ovi toksini ujedno su i primarni faktori virulencije koji se dovode u vezu s ozbiljnim posljedicama STEC infekcije i zovu se Shiga-like toksini (Stx) (Thorpe, 2004). Bakterije otpuštaju Stx u lumen gastrointestinalnog trakta izazivajući dijareju, a zatim penetriraju intestinalnu submukozu i ulaze u sistemsku cirkulaciju što može dovesti do promjena na bubrezima i sistemskih komplikacija na centralnom nervnom sistemu (Ivarsson i sar., 2012). STEC mogu proizvoditi dva toksina nazvana Shiga-like toksini 1 i 2 (Stx1 i Stx2). Uslijed izrazitog toksičnog efekta na Vero ćelijama ovi toksini se još nazivaju verotoksini odnosno verocitotoksini (VT1 i VT2). Za razliku od Shiga toksina (ST), koji proizvodi *Shigella dysenteriae* tip 1, a koji je hromozomski kodiran, Stx su kodirani u profagima i stoga, osim što se direktno nasljeđuju, mogu biti prenešeni i horizontalnom transmisijom na druge bakterije. Toksin Stx1 je gotovo identičan ST i razlika postoji samo u jednoj amino kiselini, dok Stx2 ima 60% homologije sa Stx1. Razlike u građi i strukturi ovih toksina ogledaju se u njihovoj različitoj interakciji s ćelijom i razvoju oboljenja. Nadalje, poznate su i sekventne varijante Stx, naime Stx1 ima tri varijante (Stx1a, Stx1c i Stx1d), dok Stx2 ima sedam varijanti (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f i Stx2g), a utvrđeno je da jedna STEC bakterija može proizvoditi multiple varijante toksina (Sandvig, 2006; Scheutz i sar., 2012)..



Slika 1. Struktura Stx toksina (Ivarsson i sar., 2012)

Shiga toksini su AB₅ toksini što će reći da se sastoje od jedne enzimski aktivne A subjediniice, koja remeti ćelijsku homeostazu i odgovorna je za toksičnu aktivnost i od pentamerne B subjediniice, koja posreduje vezivanju za ciljnu ćeliju i translokaciji toksina (**Slika 1**) (Bryan i sar., 2015; Garred i sar., 1995). Subjediniica A je specifična N-glikozidaza koja se sastoji iz dva dijela, odnosno N-terminalnog A1 domena koji je enzimski domen koji biva otpušten proteazom s C-terminalnog A2 domena koji je u interakciji s subjediniicom B koja se sastoji od 5 identičnih B lanaca (Garred i sar., 1995).

Šiga toksini se vezuju za ciljnu ćeliju koja nosi odgovarajuće receptore, a sami receptori su neutralni glikolipidi koji nose terminalnu polovinu galaktoza- α 1,4-galaktoze. Glavni receptor za oba Stx je globotriaosilceramid, ili Gb₃, ali mogu postojati i drugi važni receptori. Kada se vežu, Stx bivaju preuzeti od strane ćelije i transportovani do ribozoma gdje subjediniica A otcjepljuje adenin od 28S rRNK, nepovratno inhibirajući sintezu proteina i dovodeći do apoptoze endotelinih ćelija (**Slika 2**) (Thorpe, 2004).



Slika 2. Molekulski mehanizmi djelovanja Stx *E coli*. Subjediniica B₃ s vezuje se za receptor na površini ćelije. Toksin prolazi retrogradni transport do endoplazmatkog retikuluma, tokom kog biva obrađen furinom, oslobađajući enzimsku subjediniicu A1 od A2-B₅ kompleksa. Subjediniica A1 zatim biva translocirana u citosol u kome naposljetku inhibira sintezu proteina (Ivarsson i sar., 2012)

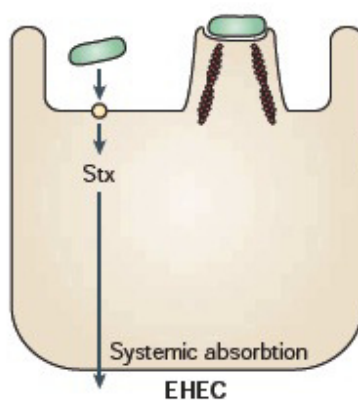
Rezultati epidemioloških studija, kao i ispitivanja na kulturi ćelija i životinjskim modelima, uključujući i primata, ukazuju na to da je od ova dva toksina Stx2 toksin virulentniji i samim time odgovoran za ozbiljnije kliničke slučajeve oboljenja (McGannon i sar., 2010; Siegler i sar., 2003; Smith i sar., 2014). Nadalje, Hammermueller i saradnici navode da je upravo Stx2 češće nađen kod pasa s dijarejom (Hammermueller i sar., 1995).

Mehanizmi kojima Stx1 i Stx2 bivaju stvoreni i otpušteni od strane STEC nijesu još uvijek u potpunosti ispitani. Ipak, poznato je da su produkcija i oslobađanje Stx kod sojeva STEC povezani s promotorima i njima udruženim genima lambda profagnih genoma u koje su oni ugrađeni. Većina sojeva koji stvaraju Stx1 i/ili Stx2 bivaju isprovocirani različitim okidačima iz spoljašnje sredine kao što su mala koncentracija gvožđa u okruženju, stresori iz spoljašnje sredine i najozbiljniji - antibiotici, naročito oni koji inhibiraju sintezu DNK. Obzirom da su promoteri operona, koji posreduju odgovorima na promjene u spoljašnjoj sredini, ugrađeni u profagni genom, dugo godina pretpostavljalo se da je liza bakterijske ćelije jedini način otpuštanja toksina (Bryan i sar., 2015). Naime, ovi profagi kodiraju proteine odgovorne za replikaciju virusa i lizu domaćinske *E. coli*. Ovi geni "uspavani" su tokom lizogenog ciklusa, a do njihove ekspresije dolazi tokom litičkog ciklusa kada bivaju oslobođeni kako Stx tako i nove virusne partikule (McGannon i sar., 2010). Međutim, rezultati novijih istraživanja sugerisali su da Stx mogu biti oslobođeni i putem spoljnomembranskih vezikula. Pored toga što je poznato da Stx mogu biti otpušteni u ekstracelularni prostor različitim mehanizmima, cjelokupna slika otpuštanja toksina koji nije posredovan lizom ćelije i dalje ostaje nejasna (Bryan i sar., 2015).

Hipoteza da su Stx, prije nego same bakterije, glavni faktori virulencije i uzrok sistemskog oboljenja podržana je činjenicom da je bakterijemija kod STEC infekcija rijetka. Opšte je prihvaćeno mišljenje da krvava dijareja, ali i dijareja uopšte, nastaju kao posljedica mikrovaskularnih oštećenja koje iniciraju Stx, koji se diseminuju kroz cirkulaciju vjerovatno vezani za polimorfonuklearne leukocite, a ciljaju endotelne ćelije želuca, bubrega, mozga i crijevnog epitela (Serna i Boedeker, 2008).

2.3.2. Lokus za gubitak enterocita

Iako su Stx neophodan faktor virulencije STEC i upravo ono što ih razlikuje od drugih grupa *E. coli*, adhezija za intestinalnu mukozu je prvi korak u patogenezi STEC. Tako pojedini sojevi STEC posjeduju i drugi važan faktor virulencije sposobnost prisne adhezije bakterija za epitelne ćelije domaćina čime dovode do karakterističnih histopatoloških lezija koje se ogledaju u izmjeni oblika enterocita i gubitku mikrovila (attaching and effacing lezije, A/E) (Etcheverria i Padola, 2013; Montero i sar., 2017). Lezije A/E karakterišu se prisnom adherencijom bakterija za epitelne ćelije i znatnom reorganizacijom citoskeletne strukture unutar enterocita, što podrazumijeva i akumulaciju polimerizovanog aktina ispod adherirane bakterije. Mikrovili crijeva se degenerišu i gube, a na površinu epitelnih ćelija uzdižu se pijadestalima slične strukture na koje se bakterije prikače (**Slika 3**) (Kaper i sar., 2004; Law, 2000; Thorpe, 2004). Sposobnost stvaranja A/E lezija prvobitno je bila prepoznata i ispitana kod sojeva iz EPEC grupe, koji ne proizvode Stx, stoga su sojevi STEC koji imaju sposobnost stvaranja A/E lezija poput EPEC svrstani u posebnu podgrupu nazvanu enterohemoragične *E. coli* (EHEC).

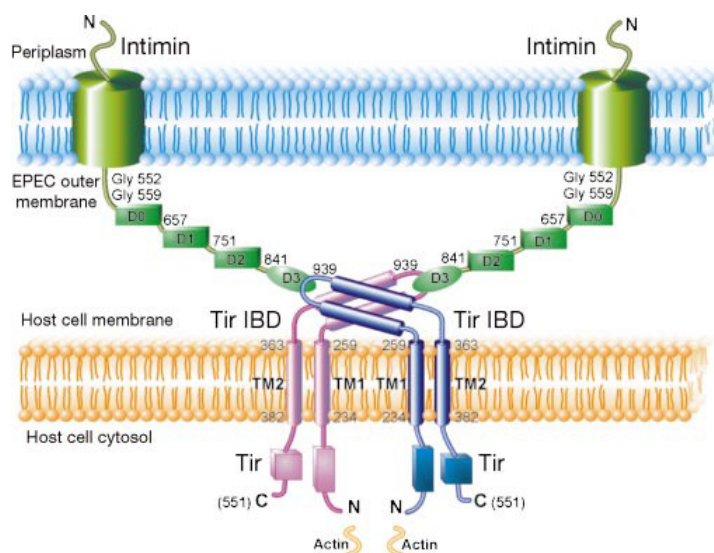


Slika 3. Stvaranje karakterističnih A/E lezija - citoskeletno restrukturiranje i gubitak mikrovila; sistemska apsorpcija Stx (Kaper i sar., 2004)

Geni koji upravljaju ovim patogenim procesom nalaze se na hromozomskom patogenom ostrvu (PAI), na lokusu koji se naziva lokus za gubitak enterocita (*locus for enterocyte effacement*, LEE) (Etcheverria i Padola, 2013). Ovaj lokus uključuje *eae* gen koji kodira intimin, protein spoljašnje membrane izgrađen od 939 amino kiselina, koji ne samo da posreduje u prisnoj adherenciji EHEC i EPEC za enterocite, već stimuliše Th1 imuni

odgovor u mukozi i hiperplaziju crijevnih kripti (Kaper i sar., 2004). Intimin se sastoji od N-terminalnog signalnog peptida, unutrašnjeg transmembranskog β -domena koji prolazi kroz spoljašnju membranu i C-terminalnog domena koji posreduje interakciji s ćelijom domaćina, odnosno na kom se dešava vezivanje za enterocite, odnosno translocirani intiminski receptor (Fairman i sar., 2012). Gen *iae*, porijeklom od EHEC i EPEC izolovanih od ljudi, goveda, pasa, svinja i zečeva, kloniran je i sekvenciran. Opšti obrazac ovih sekvenci pokazuje visoku konzervaciju N-terminalnog regiona, a visoku varijabilnost u posljednjih 280 AA C-terminalnog dijela intimina, što uslovljava definisanje većeg broja različitih suptipova intimina (Oswald i sar., 2000). Smatra se da postojanje upravo ovih razlika u aminokiselinskoj sekvenci intimina EHEC i EPEC uzrokuje različitu šemu kolonizacije i različit tropizam, iako su ove osobine u osnovi vjerovatno multifaktorijalne. Naime, dok EPEC kolonizuju tanko crijevo EHEC kolonizuju primarno debelo crijevo (Torres i sar., 2005).

Većinu LEE čini skupina gena koji kodiraju III tip sekretornog sistema (TTSS), kao i čaperone i efektorne proteine koji su povezani s TSS i uključeni u prenošenje signala u epitelnoj ćeliji domaćina (Kaper i sar., 2004; Law, 2000). Jedan od ovih efektornih proteina je i Tir (translocirani intiminski receptor) koji se umeće u membranu ćelije domaćina u kojoj funkcioniše kao receptor za intimin (**Slika 4**).



Slika 4. Mehanizam adhezije EPEC za ćeliju domaćina (Luo i sar., 2000)

Ovo predstavlja zanimljiv primjer patogene bakterije koja obezbjeđuje sopstveni receptor za vezivanje za eukariotsku ćeliju, iako je dokazano prisustvo dodatnih proteina eukariotskih ćelija koji služe kao receptor za intimin. Osim funkcije receptora za intimin, Tir ima važnu funkciju u slanju signala unutar epitelne ćelije koji rezultira grupisanjem aktinskih filamenata i formiranjem karakterističnih pijadestalnih kompleksa (Kaper i sar., 2004).

Pretpostavlja se da LEE obezbjeđuje pojačanu virulenciju obzirom da se LEE-pozitivni STEC serotipovi mnogo češće dovode u vezu s epidemijama hemolitičko uremičnog sindroma (HUS), nego LEE-negativni serotipovi. Međutim, prisustvo LEE nije neophodno za patogenezu obzirom da je veliki broj ozbiljnih STEC infekcija, uključujući i HUS, kao i povremene epidemije, bilo izazvano LEE-negativnim sojevima. Dodatni faktori virulencije kao što su adhezini kodirani izvan LEE i plazmidski kodirani enterohemolizin mogu igrati ulogu u patogenizi STEC. S porastom broja prijavljenih LEE-negativnih STEC sojeva i uz činjenicu da je adhezija STEC za ćelije domaćina inicijalni korak u patogenezi, raslo je i interesovanje za adhezine koji su kodirani izvan LEE i nekoliko proteina predloženi su kao novi adhezivni faktori (Toma i sar., 2004). Ovi adhezini kodirani su ili u velikom plazmidu koji nose STEC sojevi ili na jedinstvenom DNK segmentu *E. coli* EDL933 koji se naziva O ostrvo (OIs) i uključuju: ToxB (protein kodiran na velikom pO157 plazmidu koji je neophodan za punu ekspresiju adherencije O157:H7 Sakai soja), Saa (aglutinirajući adhezin prepoznat kod LEE-negativnih sojeva), Sab (autotransporterni protein koji pomaže adherenciju i formiranje biofilma), Sfp (fimbrije sobitol-fermentirajućih EHEC O157), Iha (protein koji obezbjeđuje adherenciju, homolog s IrgA kod *Vibrio cholerae*), Efa1 (faktor adherencije EHEC), Lpf1 i 2 (duge polarne fimbrije, kodirane na dvoma neidentičnim *lpf* lokusima, homologim s lokusima za Lpf koji posjeduje *Salmonella enterica* serovar Typhimurium) i ECP (uobičajeni *E. coli* pilus) (Brunder i sar., 2001; Doughty i sar., 2002; Herold i sar., 2009; Paton i sar., 2001; Rendon i sar., 2007; Tarr i sar., 2000; Tatsuno i sar., 2001; Torres i sar., 2002).

Veliki broj LEE pozitivnih i LEE negativnih sojeva STEC produkuje plazmidski kodirani enterohemolizin Ehx. Iako mu uloga nije još uvijek razjašnjena, Ehx se često koristi kao fenotipski marker za detekciju STEC sojeva, karakterisan produkcijom male, mutne zone hemolize nakon 18 do 24 časa inkubacije na krvnom agaru, za razliku od α

hemilizina *E. coli* koji formira velike zone hemolize vidljive nakon 4 časa inkubacije (Law, 2000; Lorenz i sar., 2016). Exh pripada RTX (repeats-in toxins) toksinima, velikoj porodici toksina koje proizvode G-negativne bakterije, koju karakterišu dvije glavne osobine, odnosno ponavljanje sekvenci bogatih glicinom i aspartatom, kao i jedinstvenim načinom sekrecije kroz I tip sekrecionog sistema (TISS) (Linhartova i sar., 2010). Do danas je opisano 6 različitih suptipova Ehx (od A do F), ali njihova uloga u humanim infekcijama nije poznata (Law, 2000; Lorenz i sar., 2016). Iako rezultati Lawa i saradnika ukazuju da Exh može biti važan faktor u nastanku HUSa kod ljudi, broj ispitanih uzoraka je mali, a vrlo je vjerovatno da ovaj toksin ima značajniju ulogu u nastanku infekcija kod životinja (Law, 2000; Schmidt i Karch, 1996).

2.4. EPIDEMIOLOGIJA STEC

Zdrava goveda, kako mliječna, tako i toвна, glavni su rezervoar STEC, a više od 435 serotipova STEC izolovano je iz goveda (Croхen i sar., 2013; Gyles, 2007). STEC su izolovane i iz drugih životinja kao što su domaće i divlje svinje, ovce, jeleni, zečevi, ptice, psi, glodari, pa čak i insekti (Byrne i sar., 2015; Chandran i Mazumder, 2013; Croхen i sar., 2013). U Sjevernoj Americi i Evropi goveda imaju najveći značaj kao rezervoari STEC, međutim u Australiji ovce, kao dominantnije zastupljena vrsta, imaju veći značaj (Gyles, 2007). Goveda su česte kliconoše EHEC, a oko 75% epidemija kod ljudi povezano je upravo s govedima, odnosno konzumacijom kontaminiranih proizvoda govedeg porijekla (Nguyen i Sperandio, 2012). Nedostatak receptora za Stx na vaskularnom endotelu je ono što čini goveda idealnim kandidatom za rezervoar STEC. Naime, nemogućnost STEC da kod goveda izazovu sistemsko oboljenje, a opet sposobnost da izvrše imunomodulaciju i intestinalnu kolonizaciju omogućava im da prežive i da se razmnožavaju u intestinalnom traktu domaćina. Meta-analitička studija svih radova objavljenih u periodu od 1951. do 2013. godine, a koji se odnose na prijavu prisustva faktora povezanih s virulencijom *E. coli* kod goveda, pokazuje da je prevalencija STEC veća kod zdravih goveda (19,4%) nego kod goveda s dijarejom (18,2%) (Kolenda i sar., 2015). U Republici Srbiji, STEC su čest nalaz kod domaćih

životinja, ali ipak su rijedak uzročnik sporadičnih enterokolitisa, dok epidemijske pojave oboljenja nijesu registrovane (Lazić i sar., 2010). Naime, u istraživanju koje su sproveli Lazić i saradnici utvrđeno je prisustvo STEC kod goveda, ovaca, koza, svinja i živine, s ukupnom prevalencijom od 16,2% (Lazic i sar., 2006).

Sporadični slučajevi HUS kod ljudi mogu biti posljedica transmisije STEC s kućnih ljubimaca. Naime, većina sojeva STEC izolovanih od pasa, u studiji koju su sproveli Bentacor i saradnici, pokazala je sličnost PFGE profila od 90 do 100% sa sojevima STEC izolovanih iz mesa, od goveda i od ljudi, ukazujući time na njihov visok zoonotski potencijal (Bentancor i sar., 2012). Prijavljene vrijednosti prevalencije STEC kod pasa, u svijetu, su različite i kreću se u opsegu od 1,1% u Argentini i Japanu, pa do vrlo visokih vrijednosti do 68,8% kod pasa s dijarejom u istraživanju sprovedenom u Iraku (Bentancor i sar., 2007; Hasan i sar., 2016; Kataoka i sar., 2010). Ipak, među kliničkim izolatima *E. coli* iz fecesa pasa, prema rezultatima studije iz Brazila i druge studije iz Argentine, nijedan nije okarakterisan kao STEC soj (Nakazato i sar., 2004; Zotta i sar., 2015).

Rezultati nekoliko studija ukazuju na to da bi psi mogli biti i važan rezervoar EHEC O157 sojeva, a time i potencijalni izvor zoonotske transmisije na ljude (Garcia i sar., 2010; Hancock i sar., 1998; Ojo. i sar., 2014; Sanchez i sar., 2002) Međutim, Kataoka i saradnici su mišljenja da EHEC soj O157:H7 nije sposoban kolonizovati intestinalni trakt psa te da se ove bakterije samo propasiraju kroz digestivni trakt i čak sugerišu mogućnost transmisije ovih sojeva s vlasnika na njihove pse (Kataoka i sar., 2010).

U Republici Srbiji do danas nijesu rađena istraživanja koja bi za cilj imala karakterizaciju sojeva *E. coli* izolovanih od pasa, stoga nema ni prijavljenih vrijednosti prevalencije STEC kod pasa.

Iako dijareja kod pasa nije primarno povezana s *E. coli* kao uzročnikom, patogenim sojevima *E. coli* često se pripisuje kauzalnost kod slučajeva dijareja kako ljudi tako i životinja. Kod mnogih kliničkih stanja pasa, kao što su štenećak, parvovirusni enteritis, koronavirusne infekcije, infestacija helmintima i mnoštvo neinfektivnih i toksičnih stanja, mijenja se integritet intestinalne mukoze, što dovodi do pojave enteritisa i dijareje. U ovakvim slučajevima, prateći pad imuniteta domaćina, javljaju se sekundarne

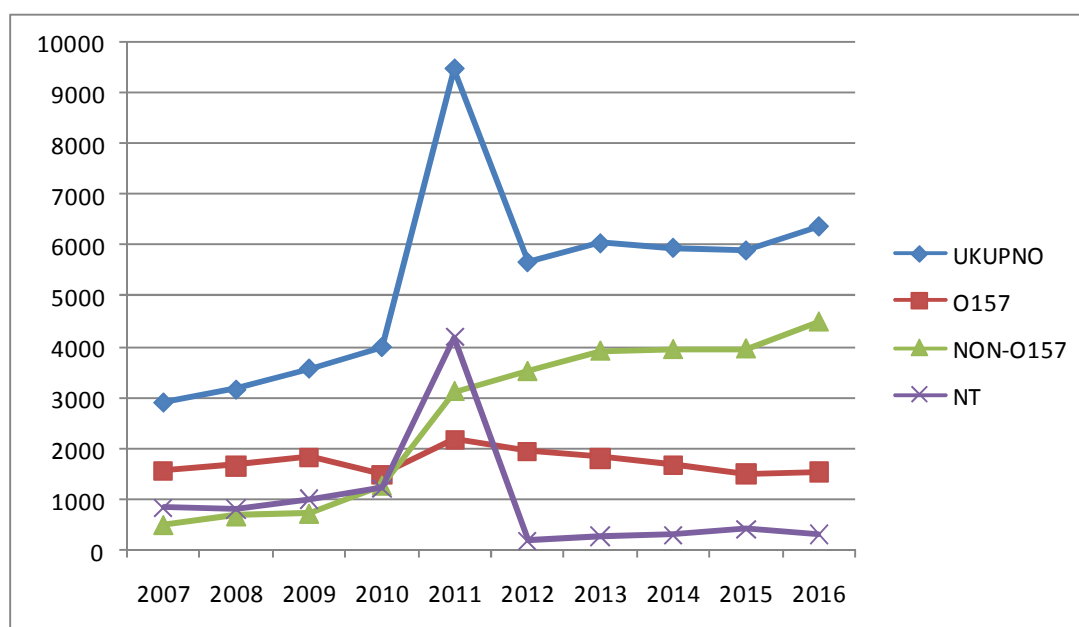
oportunističke infekcije izazvane patogenim *E. coli*, nakon čega preko dijaroičnog fecesa dolazi do njihove diseminacije u spoljašnju sredinu, a diseminacija *E. coli* fecesom kućnih ljubimaca važan je izvor kontaminacije životne sredine (Torkan i sar., 2016).

Značajan izvor infekcije STEC je izlaganje kontaminiranom okruženju. Sposobnost *E. coli* da preživi u spoljašnjoj sredini je kompleksna i uključuje više faktora kao što su temperatura, dostupnost hranljivih materija, osmomolarnost, pH, vlaga i sastav mikroflora. Dokazano je da STEC u zemljištu mogu opstati i po nekoliko mjeseci, a da u neaerisanom ovčijem stajnjaku preživljavaju i do godinu dana, a u fecesu goveda i svinja najmanje 3 sedmice. U laboratorijskim uslovima, STEC soj O157:H7 u uzorcima vode uzetim od različitih izvora može ostati vijabilan i do 2 mjeseca (Croxen i sar., 2013).

Godine 1982. STEC soj O157:H7 povezan je s hemoragičnim kolitisom i hemolitičko-uremičnim sindromom, čime je definisana nova zoonoza koja se prenosi hranom. Od tada, za veliki broj različitih O:H serotipova, koji ne pripadaju O157 (non-O157) serogrupi dokazano je da proizvode Stx, a serogrupe O26, O45, O103, O111, O121 i O145, nazvane "velika šestorka", povezane su sa epidemijama ili sporadičnim slučajevima humanih dijarejalnih oboljenja (Blanco i sar., 2004; Farfan i Torres, 2012; Johnson i sar., 2006). Transmisija na ljude ostvaruje se kroz konzumaciju ili kontaminirane hrane ili vode, ili ekspozicijom kontaminiranoj sredini, što uključuje kontakt s životinjama ili njihovim fecesom (Byrne i sar., 2015; Chandran i Mazumder, 2013). Procijenjena infektivna doza za ljude iznosi manje od 100 bakterija, a ovako niska infektivna doza STEC znači da kada se uzročnik nađe u populaciji čest način transmisije je i direktan kontakt, s osobe na osobu. Bakterije iz ove grupe *E. coli* izazivaju kako sporadične infekcije tako i epidemije, a dok se epidemije malih razmjera nastale direktnim kontaktom vezuju za zatvorene sisteme, naročito obdaništa, epidemije velikih razmjera često se dešavaju posredstvom hrane i u kontaktu s preživarima (Byrne i sar., 2015).

Procijenjeno je da na godišnjem nivou STEC kod ljudi izazovu 2.801.000 oboljenja, 3.890 slučajeva HUSa, 270 slučajeva hronične bubrežne insuficijencije (HBI) i 230 smrtnih slučajeva, širom svijeta (Majowicz i sar., 2014). Infekcije ljudi izazvane STEC smatraju se značajnim problemom za javno zdravlje u Evropi. Na godišnjem nivou, EU objavljuje podatke o STEC infekcijama koji podrazumijevaju informacije o

serogrupoj kojoj pripada soj koji je izazvao infekciju, ali i broj slučajeva HUS, prijavljenih Food and Waterborn Diseases and Zoonoses sistemu nadzora. U periodu od 2007. do 2016. godine evidentan je trend porasta prijavljenih slučajeva (EFSA, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015a, b, 2016, 2017). Ovo je vjerovatno posljedica poboljšanja sistema nadzora u zemljama članicama (Caprioli i sar., 2014). Osim serogrupa O157 i O104 koja 2011. godine je izazvala epidemiju u Njemačkoj i drugim zemljama EU, najčešće povezana sa STEC infekcijama, u istom vremenskom periodu, bila je serogrupa O26, praćena serogrupama O103, O91, O145 i O111 (**Slika 5**) (EFSA, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015a, b, 2016, 2017).



Slika 5. Broj STEC infekcija u periodu od 2007.-2016. godine u EU prijavljenih FDW (Food and Waterborn Diseases an Zoonoses) sistemu nadzora, koordinisanom od strane ECDCa. NT su slučajevi za koje nijesu dostupne podaci o serogrupoj koji je izazvao infekciju

Podaci o prevalenciji STEC kod ljudi u Republici Srbiji su oskudni, a rezultati svega dvije epidemiološke studije ukazale su na niske vrijednosti koje su se kretale između 0,3 i 0,6% (Cobeljic i sar., 1995; Lazić i sar., 2006). U Republici Srbiji, prvi slučaj humane infekcije izazvane sojem STEC iz serogrupe O157 opisali su Čobeljić i saradnici 2002. godine kod žene sa znacima hemoragijskog enterokolitisa (Cobeljic i sar., 2003).

2.5. KLINIČKA SLIKA STEC INFEKCIJA

Infekcije izazvane STEC O157 i sojevima koji ne pripadaju serogrupi O157 (non-O157) mogu dati sličnu kliničku sliku, ali jačina izraženih kliničkih simptoma i ozbiljnost oboljenja razlikuju se u zavisnosti od serotipa koji je izazvao oboljenje, te je predložena klasifikacija prema seropatotipovima. Inkubacioni period za STEC soj O157:H7 traje oko 3 dana, što je isti vremenski period prijavljen tokom epidemije koju je izazvala STEC O111:NM (Croxen i sar., 2013). Klinička slika STEC infekcija kreće se od blagih gastroenteritisa do ozbiljnih oboljenja ljudi, kao što su hemoragični kolitis (HK) i hemolitički uremični sindrom (HUS), koja mogu imati i smrtan ishod (Blanco i sar., 2004; Pedersen i sar., 2017). Infekcija koju izazivaju STEC, iako može biti i asimptomatska, uobičajeno počinje pojavom vodenaste dijareje koja je najčešće praćena abdominalnim bolom i povremeno mučninom i povraćanjem. Povišena tjelesna temperatura nije istaknut klinički znak ovog oboljenja, što je diferencijalno dijagnostički razlikuje od inflamatornog kolitisa koji se javlja kao rezultat infekcije organizmima poput *Salmonella* vrsta. Vodenasta dijareja za 1-2 dana može napreduje u krvavu dijareju odnosno HK. U svom najtežem obliku, dijareju koju uzrokuju STEC teško je klinički razlikovati od inflamatorne bolesti crijeva (inflammatory bowel disease, IBD). Približno 5-10% oboljelih osoba razvije HUS, oko 10% slučajeva HUSa imaće smrtan ishod ili će dovesti do permanentnih oštećenja bubrega, a i do 50% dovešće do nekog stepena oštećenja bubrega. Ove komplikacije javljaju se 2 do 14 dana od pojave dijareje (Thorpe, 2004). STEC infekcija koja napreduje u HUS ima bimodalnu distribuciju koja se ogleda u prijemčivosti za HUS pri čemu su djeca i starije osobe pod najvećim rizikom, sa stopom smrtnosti kod starijih osoba i do čak 86%, prijavljene od strane pojedinih istraživača (Azadi i sar., 2010; Thorpe, 2004). Jačina kliničke slike zavisi od soja koji je izazvao oboljenje. Podaci prikupljeni u Evropi 2007. i 2008. godine, gdje su non-O157 sojevi česti, ukazuju na to da klinička manifestacija s krvavom dijarejom mnogo je češća kod O157 sojeva (39%) nego kod drugih sojeva (7%) (Pennington, 2010). Nadalje rezultati nekih studija pokazuju i da se STEC sojevi koji nose samo *stx1* gen dovode u vezu s blažim oblicima oboljenja (Pedersen i sar., 2017).

Sojevi STEC igraju ulogu u razvoju akutnih i hroničnih dijareja kod pasa, (Sancak i sar., 2004; Staats i sar., 2003), ali isto tako psi mogu biti i asimptomatski nosioci STEC (Beutin i sar., 1993). Kao i kod ljudi, različiti serotipovi izazivaju klinički slična oboljenja, ali se ozbiljnost oboljenja i njegov ishod razlikuju (Wang i sar., 2006). STEC izolovane od pasa proizvode različite tipove Stx, a rezultati većine studija češće dovode Stx2 u vezu s pojavom dijareje kod pasa nego Stx1 (Bentancor i sar., 2012; Bentancor i sar., 2007; Hammermueller i sar., 1995; Ojo. i sar., 2014; Paula i Marin, 2008; Staats i sar., 2003; Torkan i sar., 2016). Drugog dana od infekcije izazvane STEC, kod pasa se javlja akutna, vodenasta ili mukozna dijareja. Klinička manifestacija praćena je i neznatno krvavom dijarejom, padom apetita, mučninom i povraćanjem. Jedan do dva dana kasnije, kod pasa može doći do oporavka bez primjene bilo kakve terapije (Sancak i sar., 2004; Wang i sar., 2006; Yousif i sar., 2016).

2.6. TERAPIJA I PROFILAKSA STEC INFEKCIJA

Za STEC infekciju ne postoji lijek, a cilj terapije koja se koristi je uglavnom da ublaži simptome oboljenja i zasnovana je na potpunoj terapiji, osobito na rehidraciji (Melton-Celsa i sar., 2012; Rahal i sar., 2012). Upotreba antidijarajika koji inhibiraju peristaltiku i odlažu čišćenje organizma nosi rizik od napredovanja oboljenja u HUS (Rahal i sar., 2012). Otkako su *in vitro* studije dokazale da STEC proizvode više toksina stimulirane neletalnim dozama antibiotika do danas nije postignut konsenzus oko njihove primjene u terapiji STEC infekcija. Naime, određeni antibiotici, poput hinolona, trimetoprima ili tetraciklina, dovode do aktivacije profaga i posljedične ekspresije i transkripcije gena za Stx, ali i povećanog otpuštanja Stx nakon indukovane lize bakterijske ćelije obzirom da se Stx1 skladišti u periplazmatskom prostoru STEC ćelija. Ovakav odgovor na antibiotike opisan je kako u uslovima *in vitro*, tako i na životinjskim modelima (Agger i sar., 2015; McGannon i sar., 2010; Melton-Celsa i sar., 2012; Rahal i sar., 2015; Rahal i sar., 2012; Scheiring i sar., 2008). Rezultati pažljivo dizajnirane prospektivne studije Wonga i saradnika dokazali su da antibiotska terapija povećava rizik od nastanka HUSa kod djece (Wong i sar., 2000). Nasuprot tome, u dvijema

retrospektivnim analizama slučajeva HUSa kod djece, nije ustanovljena uzročno-posljedična veza između primjene antibiotika i razvoja HUSa (Bell i sar., 1997; Martin i sar., 1990). Nadalje, japansko iskustvo ukazuje da primjena fosfomicina u terapiji STEC infekcija poboljšava prognozu i smanjuje očekivanu incidenciju HUSa (Ikeda i sar., 1999). Upotreba gentamicina u kombinaciji s rifampicinom na miševima inficiranim različitim serotipovima STEC pokazala je da različiti serotipovi, pa čak i različiti izolati istog serotipa drugačije reaguju na antibiotsku terapiju. Kao rezultat ovakvih diskrepantnih nalaza javilo se generalizovano stanovište o kontraindikovanoj primjeni antibiotika kod STEC infekcija (Rahal i sar., 2015).

Obzirom da su STEC neinvazivne jedan od mogućih načina preveniranja ili ublažavanja HUSa zasniva se na sprječavanju daljeg unosa Stx iz intestinalnog trakta. Razvijene su različite strategije kroz upotrebu liganada koji oponašaju receptor s najvišim afinitetom za Stx – Gb3, koji vezujući Stx u lumenu crijeva sprječavaju njihovo extraintestinalno širenje. Ipak, u kliničkoj praksi oštećenja izazvana Stx nastaju i prije nego li ligandi mogu ostvariti koristan efekat i prevenirati dalji unos Stx (Thorpe, 2004). Nekoliko grupa istraživača razvilo je i himerična antitjela za Stx1 i Stx2 koji su na životinjskim modelima pokazala protektivni efekat čak i kada se antitjela aplikuju nakon infekcije ili intoksikacije (Melton-Celsa i sar., 2012).

Više istraživanja baziralo se na upotrebi prirodnih medikamenata za prevenciju i terapiju STEC infekcije. Mnoga istraživanja, sprovedena u uslovima *in vitro* i na životinjskim modelima, pokazala su pozitivne efekte probiotika, pa tako istraživanje sprovedeno na novorođenim zečevima pokazalo je protektivan efekat *Lactobacillus casei* protiv toksina soja O157:H7, dok su se biljke poput *Cinnamomum cassia*, *Corydothymus capitatus* i *Camellia sinensis* takođe pokazale efikasnm protiv STEC (Rahal i sar., 2015; Rahal i sar., 2012).

Do danas, u prevenciji STEC infekcija, opisano je nekoliko vakcinalnih pristupa različitog uspjeha na različitim životinjskim modelima, s pojedinima koji su dali obećavajuće rezultate. Ovi pristupi podrazumijevali su korišćenje bakterijskih peptida i faktora virulencije (Allen i sar., 2011; Asper i sar., 2011; Mejias i sar., 2016; Paddock i sar., 2014; Rossi i sar., 2014; Rossi i sar., 2013; Sato i sar., 2013; Zhang i sar., 2012), atenuirane bakterijske ćelije (Fujii i sar., 2012; Gu i sar., 2011), bakterijske omotače –

bacterial ghosts (Choi i sar., 2014; Mayr i sar., 2012) i DNK vakcine (Ren i sar., 2013; Riquelme-Neira i sar., 2015).

2.7. ANTIBIOTSKA REZISTENCIJA

Antibiotici su okosnica javnog zdravlja i imaju glavnu ulogu u poboljšanju zdravlja i dobrobiti ljudi i životinja, pri čemu se često koriste u terapiji infekcija kao i u profilaksi i stimulaciji rasta životinja koje se gaje za proizvodnju hrane. Ipak, dok su antibiotici uspješno korišćeni u ograničavanju infektivnih oboljenja njihova upotreba je eksponencijalno rasla dovodeći do pojave i širenja antibiotske rezistencije (Rasheed i sar., 2014; Vila i sar., 2016). Razvoj bakterijske rezistencije na antibiotike uzrokovan je ubrzanom evolucijom bakterijskog genoma uslijed selektivnog antibiotskog pritiska i selektivnog pritiska okruženja. Rezistencija se može razviti na bilo koji antibiotik, a kontinuirani selektivni pritisak antibioticima koji se koriste u rutinskoj terapiji važan je preduslov za porast broja multirezistentnih sojeva. Rezistentni mutanti obično preživljavaju u sredini u kojoj je prisutno nekoliko antibiotika. Porast broja Gram negativnih štapića, koji produkuju β -laktamaze klase C, rezistentnih na cefalosporine treće generacije ozbiljan je problem današnjice, zajedno sa sve učestalijom pojavom Gram negativnih štapića rezistentnih na karbapeneme, fluorohinolone i aminoglikozide (Kolar i sar., 2001). Glavni mehanizam prenosa rezistencije kod vrsta iz familije *Enterobacteriaceae* je transfer plazmida rezistencije konjugacijom među sojevima. Ovi plazmidi su ekstrahromozomski DNK molekuli koji sadrže gene antibiotske rezistencije koji se razmjenjuju među bakterijama iste ili druge vrste (Warren i sar., 2001).

Antimikrobna rezistencija među bakterijama izolovanim od kućnih ljubimaca je rastući problem koji utiče na javno zdravlje i tretman pacijenata, ograničavajući terapijske opcije i povećavajući rizik od neuspjeha terapije. Nadalje, pojava bakterija rezistentnih na lijekove kod pasa predstavlja potencijalnu prijetnju po zdravlje ljudi. Rezultati istraživanja ukazuju da direktan kontakt među kućnim ljubimcima i ljudima može dovesti do interspecijske transmisije patogenih bakterija, uključujući i sojeve koji pokazuju antibiotsku rezistenciju (Cummings i sar., 2015). Komensalne bakterije

predstavljaju rezervoar gena rezistencije za (potencijalno) patogene bakterije, odnosno njihovi nivoi rezistencije smatraju se dobrim indikatorom antibiotskog selektivnog pritiska i problema rezistencije koji se očekuju kod uzročnika oboljenja (Rasheed i sar., 2014). Upravo se *E. coli* često koristi u genetskim i mikrobiološkim ispitivanjima u uslovima *in vitro* uključujući i istraživanja prisustva, rasprostranjenosti i načina prenošenja bakterijske rezistencije, kao pouzdan indikator upotrebe antibiotika kod životinja (Gavrović i sar., 2011). *E. coli* razvija rezistenciju na antibiotike tokom prolongirane izloženosti antibioticima, pogotovo pri supertapeutskim dozama, tako što prima gene antibiotske rezistencije od drugih komensalnih ili tranzitornih patogenih bakterija koje kolonizuju jedinku ili okolinu (Chandran i Mazumder, 2013). Takođe, antimikrobna rezistencija STEC serotipova je česta, a skorašnja istraživanja ukazuju na prisustvo i širenje sojeva rezistentnih na tetracikline, sulfonamide, cefalosporine i peniciline, kao i na porast njihove rezistencije tokom vremena (Karmali i sar., 2010; Schroeder i sar., 2002). Iako oskudni, rezultati istraživanja antibiotske rezistencije izolata *E. coli* ukazuju da su farmske životinje u Srbiji važan rezervoar sojeva rezistentnih na antibiotike starijih generacija (Ašanin i sar., 2009; Gavrovic i sar., 2011; Knezevic i Petrovic, 2008).

Životinje s kliničkim stanjima kao što je dijareja često su imunosuprimirane, što podspješuje povećanu fekalnu diseminaciju *E. coli*. Takođe životinje koje imaju dijareju defeciraju češće i nekontrolisano i na taj način šire *E. coli* mnogo češće nego životinje koje nemaju dijareju. Obzirom da su kako patogeni tako i nepatogeni sojevi *E. coli* potencijalni rezervoari za gene antibiotske rezistencije, njihovo prisustvo u dijareji pasa predstavlja ozbiljnu opasnost po javno zdravlje uslijed zoonotske transmisije, s vlasnicima pasa, djecom i veterinarima kao grupama pod najvećim rizikom (Chandran i Mazumder, 2013). Ovome u prilog govore rezultati studije koja se bavila ispitivanjem antibiotske rezistencije sojeva *E. coli* izolovanih od pasa i njihovih vlasnika. Naime, neki sojevi od pasa i ljudi iz istog domaćinstva imali su isti rezistencijski šablon, ESLB (beta-laktamaze proširenog spektra) gene, pripadale identičnoj filogenetskoj grupi i imale identične ili veoma slične PFGE profile. Ovi podaci ukazuju na visoku homologiju, a time i na mogućnost da rezistentni *E. coli* klonovi cirkulišu među ljudima i životinjama koji borave u istoj sredini (Carvalho i sar., 2016). Gavrović i saradnici u istraživanju

sprovedenom u Republici Srbiji, a koje je uključilo svega 5 izolata *E. coli* koje potiču od pasa, prijavljuju rezistenciju na sve korišćene antibiotike osim na ceftriakson i florfenikol, uz prisustvo jednog multirezistentnog soja, rezistentnog na 7 antibiotika i to na ampicilin, amoksicilin s klavulanskom kiselinom, tetraciklin, hloramfenikol, gentamicin, sulfametaksazol s trimetoprimom i ciprofloksacin) (Gavrovic i sar., 2011).

2.8. DIJAGNOSTIKA STEC

Laboratorijska dijagnostika STEC infekcija kod pacijenata s dijarejom zasniva se na mikroskopskom pregledu stolice kada je to neophodno (kako bi se isključili paraziti i vizualizovale vrste iz *Campylobacter*), koprokulturi, detekciji Stx imunološkim metodima i detekciji gena koji kodiraju Stx. Potvrda STEC kao etiološkog uzročnika dijareje zahtjeva izolaciju STEC u čistoj kulturi iz uzorka stolice pacijenta (Hunt, 2010). Brza i tačna dijagnoza STEC infekcija je važna kako bi se pacijentima obezbijedila adekvatna terapija, obzirom da se primjena antibiotika dovodi u vezu s ozbiljnim komplikacijama ovih infekcija, a isto tako odgovarajući tretman s parenteralnom nadoknadom tečnosti u ranim fazama oboljenja može smanjiti oštećenje bubrega i pozitivno uticati na ishod infekcije. Nadalje, laboratorijska identifikacija STEC sojeva je neophodna za primjenu kontrolnih mjera, za učinkovit i brz odgovor na epidemije, za detekciju novih emergentnih sojeva, kao i za praćenje širenja i kretanja oboljenja (Gould i sar., 2009). U dijagnostici STEC infekcija javljaju se i određene poteškoće. Naime, u ranim fazama infekcije u fecesu može biti veliki broj STEC, međutim kako oboljenje napreduje dolazi do dramatičnog pada u njihovoj brojnosti. Nadalje, do pojave ozbiljnijih kliničkih simptoma vezanih za komplikacije STEC infekcije obično dolazi nakon sedam ili više dana od pojave gastrointestinalnih simptoma, kada je broj STEC u fecesu mali, ili su bakterije već eliminisane iz gastrointestinalnog trakta. U nekim slučajevima dolazi i do prestanka dijareje, pa je moguće uzeti samo rektalni bris, čime je ograničena količina uzorka za analizu (Paton i Paton, 1998).

2.7.1. Izolacija i identifikacija

Kultivacija je i danas “zlatni standard” za detekciju STEC u kliničkim uzorcima i uzorcima iz spoljašnje sredine, te je i dalje metod izbora u mnogim dijagnostičkim laboratorijama. *Escherichia coli* se lako kultiviše na standardnim hranljivim podlogama, poput McConkey agara, u aerobnim uslovima i na temperaturi od 37°C, a identifikacija enterobakterija jednostavno se izvodi standardnim biohemijskim IMViC testom ili komercijalnim identifikacionim kitovima (De Boer i Heuvelink, 2000; Newell i La Ragione, 2018). Ipak, kultivacija ima brojne nedostatke, naime, kultivacijom je moguće otkriti samo vijabilne mikroorganizme, moguće je da normalna mikroflora zamaskira rast STEC, relativno je nizak stepen detekcije, a do uspostavljanja konačne dijagnoze i dobijanja podataka o serotipu ili antimikrobnoj rezistenciji, naročito kada se koriste podloge za obogaćenje, može proteći i do 5 dana (Newell i La Ragione, 2018). Pa ipak i pored ograničenja, izolacija STEC sojeva se smatra najcjenjenijom dijagnostičkom procedurom jer omogućava dodatnu karakterizaciju različitim metodima poput određivanja serotipa, fagotipizacije, lančane reakcije polimeraze (PCR), analize polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP) i elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE), koja iako ima ograničenu primjenu u kliničkoj praksi, od velikog je značaja s epidemiološkog aspekta (Paton i Paton, 1998).

Nemogućnost većine O157 sojeva da fermentuju sorbitol iskorišćena je u dijagnostičke svrhe, te je dugo godina kultivacija na sorbitol-MacConkey (SMAC) agaru bila je najčešće korišćen metod za izolaciju STEC, obzirom da su sojevi O157:H7 i O157:H najčešće bili dovođeni u vezu s humanim oboljenjima u Evropi i Sjevernoj Americi (Newell i La Ragione, 2018; Paton i Paton, 1998). Tako na SMAC agaru O157 sojevi stvaraju providne kolonije za razliku od non-O157 sojeva, kao i drugih kako komensalnih, tako i dijarejagenih *E. coli*, koje uslijed fermentacije sorbitola stvaraju kolonije ružičaste boje (Hughes i sar., 2006). Ipak, otkrivanje O157 sojeva koji ne fermentuju sorbitol, kao i porast svjesnosti o značaju non-O157 sojeva kao uzroka oboljenja čini fermentaciju sorbitola nepouzdanom fenotipskom karakteristikom za dijagnostiku STEC infekcija. SMAC agar s dodatkom cefiksima i kalijum-telurita korišćen je u cilju inhibicije rasta drugih Gram-negativnih bakterija, ali utvrđeno je da ove supstance sprječavaju rast i nekih STEC, te nijesu preporučljive za rutinsku

kultivaciju uzoraka fecesa (Hunt, 2010). Prijavljene su i druge selektivne podloge s dodatkom hromogenih supstrata, poput CHROMagara, Rainbow agara, Hicrome agara, ali njihova upotreba takođe je ograničena na detekciju O157 sojeva (Castro i sar., 2017; Kehl, 2002; Newell i La Ragione, 2018). Ne postoji jasna biohemijska karakteristika koja razlikuje STEC sojeve, osim O157, od komesalnih *E. coli* sojeva, što umnogome komplikuje izolaciju ovih bakterija (Hunt, 2010; Paton i Paton, 1998). Stoga, a imajući u vidu i mnogobrojnost non-O157 serogrupa, trenutno jedini praktičan pristup identifikaciji ovih STEC je direktna ili indirektna detekcija Stx koje proizvode ovi sojevi (Kehl, 2002).

2.7.2. Test na Vero kulturi ćelija

Zbog velike koncentracije Gb3 i Gb4 koji služe kao receptori za Stx, Vero ćelijske kulture veoma su osjetljive na Stx, a ova njihova osobina, još otkako su je prepoznali Konowalchuk i saradnici, tradicionalno se koristi u detekciji Stx (Gould i sar., 2009; Konowalchuk i sar., 1977). Test verocitotoksičnosti (VCA) se izvodi tako što se sterilni fekalni filtrati pripremljeni od svežih uzoraka stolice ili kultura odabranih kolonija u bujonu inokulišu u Vero ćelijsku kulturu i posmatra se pojava tipičnog citopatogenog efekta kroz 48 do 72 časa od inokulacije (Gould i sar., 2009). Iako se radi o vrijednom dijagnostičkom metodu koji odlikuje visoka osjetljivost, zbog niže specifičnosti, dugog vremena izvođenja testa i visoke cijene koštanja VCA se ne upotrebljava u rutinskoj dijagnostici STEC infekcija (Hughes i sar., 2006; Paton i Paton, 1998).

2.7.3. Imunoenzimski testovi

Primjenom imunoenzimskih testova (ELISA) može se dokazati prisustvo Stx direktno u uzorcima stolice ili u 24-oročasnim kulturama u bujonu. Većina opisanih ELISA testova za dijagnostiku Stx zasniva se na sendvič tipu ELISA-e s monoklonskim ili poliklonskim antitijelima pričvršćenim za dno mikrotitar ploča koja služe kao ligand za Stx. Nakon inkubacije s tečnom kulturom, vezani Stx se detektuju sekundarnim antitijelima specifičnim za Stx uz pomoć anti-Ig konjugovanih antitijela i enzim supstrata (Paton i Paton, 1998). Metodi tipa ELISA-e osjetljiviji su u poređenju s kultivacijom na SMAC agaru dok u poređenju s testom verocitotoksičnosti na kulturi ćelija prijavljene

vrijednosti osjetljivosti kretale su se između 82 i 100% (Hughes i sar., 2006; Kehl, 2002). Utvrđeno je da neki sojevi STEC produkuju male količine Stx koje je nemoguće otkriti serološkim testovima ili na kulturi ćelija (Feng i sar., 2011). Proizvođači ELISA kitova sugerišu dodavanje mitomicina C ili polimiksina B u kulturu iz stolice kako bi se stimulisala produkcija i oslobađanje Stx i time povećala osjetljivost testa, međutim studija Willforda i saradnika pokazala je da dodatak mitomicina nije imao uticaja na osjetljivost primijenjenih ELISA kitova (Hughes i sar., 2006; Willford i sar., 2009). Prijavljeni rezultati o specifičnosti ELISA testa, u detekciji Stx u kulturama iz stolice, su u diskrepanci. Naime dok Law i saradnici prijavljuju visoku specifičnost od 99,7%, Ball i saradnici nalaze da je od 13 izolata pozitivnih na ELISA testu 6 bilo negativno na testu verocitotoksičnosti (Ball i sar., 1996; Law i sar., 1994).

2.7.4. Lančana reakcija polimeraze PCR

Lančana reakcija polimeraze (PCR) može biti korišćena kako za umnožavanje specifičnih djelova DNK tako i RNK. Ove sekvence umnožavaju se prajmerima uz pomoć enzima DNK polimeraze. Ova metoda zasniva se na detekciji ciljanih gena i odlikuje se visokom specifičnošću, osjetljivošću i upotrijebljivošću pri korišćenju različitih uzoraka, kao što su feces, hrana, voda i uzorci iz spoljašnje sredine (Castro i sar., 2017; Lopez-Saucedo i sar., 2003). Korišćenjem konvencionalnog PCR-a može se umnožiti dovoljno kopija jednog ili više ciljanih gena koji će biti vizuelno detektabilni gel elektroforezom. Za dijagnostiku STEC koristi se više gena koji su povezani s virulencijom, a geni *stx1* i *stx2*, koji kodiraju Stx1 odnosno Stx2, koriste se kao glavni markeri, kako u pojedinačnom tako i u multipleks PCR-u (Castro i sar., 2017; Paton i Paton, 1998). Upotreba PCR-a omogućava detekciju gena za Stx i u mikrobiološki kompleksnim uzorcima, uključujući i uzorke s nevijabilnim organizmima (Paton i Paton, 1998)

2.7.5. Serotipizacija

Klasifikacija STEC vrši se većim brojem metoda, uključujući i serotipizaciju koja je u širokoj upotrebi za kategorizaciju *E. coli*. Serotipizacija *E. coli* sojeva vrši se na osnovu O (Ohni) antigena koji je određen polisaharidnim dijelom lipopolisaharida (LPS)

ćelijskog zida i H (Hauch) antigena koji predstavlja flagelarni protein. U internacionalnoj shemi serotipizacije postoji 174 O antigena (od broja 1 do 181, pri čemu su brojevi 31, 47, 67, 72, 93 i 122 izbrisani) i 53 H antigena, pri čemu *E. coli* sojevi mogu imati različite kombinacije O i H antigena. Mnogi nepokretni sojevi (NM) su mutanti sojeva s H antigenom, a mnogi pak imaju O i/ili H antigen koji nijesu u internacionalnoj shemi te ih je nemoguće serotipizirati (Gyles, 2007). Najčešće korišćen metod za identifikaciju serotipa izolovanih sojeva je konvencionalna serotipizacija zasnovana na antigen-antitijelo aglutinaciji. Za detekciju sojeva iz “velike šestorke” kao i O157:H7 soja mogu se primijeniti konvencionalni ili real-time PCR metod, ali i drugi metodi poput lateks-aglutinacionih kitova za detekciju O157 serogrupe i ELISA testa takođe razvijenog za detekciju 6 glavnih non-O157 sojeva STEC (Castro i sar., 2017).

Uslijed ograničene upotrebe serotipizacije *E. coli* zasnovane na korišćenju antiseruma, razvijeni su genetski zasnovani metodi serotipizacije koji ciljaju grupno-specifične gene unutar *E.coli* O-antigen genskih klastera i H-antigen gena koji kodiraju različite tipove flagela. Ovakvi metodi su precizniji i imaju veću diskriminatornu moć (Fratamico i sar., 2016).

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na osnovu podataka iz literature i obrazloženim potrebama za izvođenje ovog istraživanja postavljeni su sljedeći ciljevi:

1. Tipizacija i molekularna karakterizacija sojeva *E. coli* izolovanih iz fecesa pasa U Republici Srbiji do sada nijesu rađena istraživanja koja bi za cilj imala karakterizaciju *E. coli* izolovanih od pasa, te je prvi cilj da se izvrši tipizacija i molekularna karakterizacija ovih izolata.

2. Utvrđivanje prisustva i određivanje prevalencije STEC
Do danas u literaturi nema podataka o prijavi prisustva STEC kod pasa na području Republike Srbije, te je jedan od ciljeva utvrđivanje prisustva i određivanje prevalencije STEC kod pasa s područja Novog Sada. Vrijednost očekivane prevalencije, izvedena na osnovu rezultata drugih autora, iznosi oko 7%. Očekivani rezultati doprinijeće razumijevanju etiologije dijarejalnog sindroma kod pasa.

3. Utvrđivanje potencijalno zoonoznih izolata STEC
Infekcije koje izazivaju STEC prepoznate su kao emergentne zoonoze koje imaju sve veći značaj za javno zdravlje. Ove infekcije vodeći su uzrok akutne bubrežne insuficijencije kod djece. Cilj istraživanja je da se utvrdi prisustvo potencijalno zoonoznih izolata, a dobijeni podaci pomoći će u razumijevanju uloge pasa u epidemiologiji STEC infekcija kod ljudi.

4. Utvrđivanje prisustva rezistentnih sojeva *E.coli*

Kako se zbog svoje specifične ekologije *E. coli* smatra markerom antibiotske rezistencije, a obzirom da su oskudni podaci o rezistenciji sojeva *E. coli* izolovanih od pasa s područja Republike Srbije, ali i izolata *E. coli* uopšte, cilj je da se utvrdi prisustvo rezistentnih sojeva. Dobijeni podaci pomoći će u rasvjetljavanju uloge pasa kao potencijalnog rezervoara rezistentnih sojeva *E. coli*.

4. HIPOTEZA

Postavljene su sljedeće hipoteze istraživanja:

1. Vrijednost prevalencije STEC u populaciji pasa s područja Novog Sada iznosi oko 7%
2. Psi mogu biti rezervoar STEC za ljude
3. Psi mogu biti rezervoar rezistentnih sojeva *E. coli*

5. MATERIJAL I METODI

5.1. MATERIJAL

5.1.1. Izbor i veličina uzorka

U ovo istraživanje bili su uključeni vlasnički psi i psi iz azila, klinički zdravi, kao i psi s dijarejom, s teritorije Novog Sada. Psi su odabrani metodom slučajnog izbora. Veličina uzorka je 100 i određena je na osnovu epidemiološke kalkulacije (procijenjena gustina populacije 10.000 pasa, očekivana prevalencija STEC 7%, nivo povjerenja 95%) korišćenjem OpenEpi calculatora (**Slika 6**). Za istraživanje su korišćeni uzorci fecesa u količini od 5 g, koji su uzorkovani u sterilne posude.

Sample Size for Frequency in a Population

Population size(for finite population correction factor or fpc)(N):	10000
Hypothesized % frequency of outcome factor in the population (p):	7%+/-5
Confidence limits as % of 100(absolute +/- %)(d):	5%
Design effect (for cluster surveys-DEFF):	1

Sample Size(n) for Various Confidence Levels

ConfidenceLevel(%)	Sample Size
95%	100
80%	43
90%	70
97%	122
99%	170
99.9%	275
99.99%	380

Equation

$$\text{Sample size } n = [\text{DEFF} * Np(1-p)] / [(d^2 / Z_{1-\alpha/2}^2 * (N-1) + p*(1-p)]$$

Slika 6. Izračunavanje veličine uzorka

5.1.2. Prikupljanje uzoraka

U periodu od 31. marta do 21. juna 2017. godine prikupljen je ukupno 101 pojedinačni uzorak fecesa pasa sa područja Novog Sada. Uzorci su prikupljeni su u sterilne plastične posude koje su obilježene rednim brojem uzorka i u najkraćem roku transportovane u laboratoriju. Uporedo s uzorkovanjem sačinjena je i epidemiološka anketa koja je sadržala podatke o rasi, polu, starosti i načinu držanja psa.

5.2. METODI

5.2.1. Izolacija i identifikacija

Po prijemu u laboratoriju uzorci fecesa su u posudama za prikupljanje fecesa, u kojima su i dopremljeni, homogenizovani sterilnim fiziološkim rastvorom, pomoću sterilnog drvenog štapića. Oko 1,5 ml homogenizovanog fecesa odvojeno je u sterilne i obilježene plastične epruvete od 1,5 ml i do dalje upotrebe ostavljeno na čuvanje na -80°C. Dnom sterilne serološke epruvete, metodom razmazivanja, uzorci su inokulisani na čvrstu hranljivu podlogu u adekvatno obilježenim Petri pločama. Kao hranljiva podloga za koprokulturu korišćena je selektivno-diferencijalna hranljiva podloga Endo agar (Biolife Italiana, Milan, Italy). Hranljiva podloga je prethodno pripremljena prema preporukama proizvođača i razlivena (po 20 ml) u sterilne, plastične Petri ploče. Kulture su zatim inkubirane tokom 18 do 24 časa, u aerobnim uslovima na temperaturi od 37°C. *Escherichia coli* na Endo agaru metaboliše laktozu uz produkciju kiseline i aldehida koji reaguje s sulfitnom i fuksinskom komponentom podloge, oslobađajući fuksin koji zatim kristališe i daje *E. coli* kolonijama metalno-zeleni sjaj. Nakon inkubacije kulture su očitane i izabrana je pojedinačna kolonija okruglog oblika s metalo-zelenim sjajem, koja fenotipski odgovara koloniji *E. coli*, koja je zatim supkultivisana u cilju dobijanja čiste kulture.

Supkultivacija je, pomoću bakteriološke eze metodom iscrpljivanja, izvršena na selektivno-diferencijalnu hranljivu podlogu SMAC agar (Biolife Italiana, Milan, Italy), u adekvatno obilježenim Petri pločama. Hranljiva podloga je prethodno pripremljena prema preporukama proizvođača i razlivena (po 20 ml) u sterilne, plastične Petri ploče. Kulture

su zatim inkubirane tokom 18 do 24 časa, u aerobnim uslovima na temperaturi od 37°C. Kako većina *E. coli* sojeva iz O157 serogrupe ne fermentuju sorbitol na SMAC agaru one formiraju bezbojne kolonije, dok sve ostale *E. coli* uslijed fermentacije formiraju kolonije ružičaste boje. Nakon inkubacije kulture su očitane i izabrane su pojedinačne kolonije za serotipizaciju za serogrupu O157 i za biohemijsku potvrdu identiteta izolata.

5.2.2. Serotipizacija za serogrupu O157

Za serotipizaciju za grupu O157 primijenjen je lateks aglutinacioni metod, a korišćen je *E. coli* O157 Rapid Latex Test Kit (Biolife Italiana, Milan, Italy). Obzirom i da neki izolati iz serogrupe O157 fermentišu sorbitol, za izvođenje ovog metoda birane su i ružičaste kolonije sorbitol fermentujućih *E. coli*. Kolonije svih izolata korišćenih u lateks aglutinacionom testu nijesu bile starije od 24 časa.

Prije izvođenja samog testa neophodno je izvršiti kontrolu kvaliteta kako bi se osiguralo da reagensi pravilno funkcionišu i ona uključuje kontrolu regenasa i pozitivnu kontrolu. Za kontrolu reagenasa neophodno je dodati jednu kap reagensa REAG TEST ESC1 i jednu kap reagensa REAG CONTROL u dva odvojena polja na aglutinacionoj ploči. U svaku kap lateksa dodaje se po jedna kap rastvarača uzorka, i promiješa se svaka smješa kako bi se tečnost razvukla preko cijele površine polja. Tokom 30 sekundi lagano se protresa aglutinaciona ploča i posmatra da li dolazi do pojave aglutinacije na oboma poljima. U slučaju pojave aglutinacije ili lateks ili rastvor daju nespecifičnu reakciju i treba da budu odbačeni. Za pozitivnu kontrolu pripremljena je suspenzija referentnog soja O157:H7 *E. coli* ATCC 35150 prema dolje navedenom protokolu testa. Aglutinaciona ploča se lagano protresa tokom 30 sekundi i posmatra da li dolazi do aglutinacije. Ako ne dolazi do aglutinacije dodaje se jedna kap reagensa REAG TEST ESC u jedno polje i jedna kap reagensa REAG CONTROL u drugo. Aglutinaciona ploča se lagano protresa tokom 2 minuta i posmatra se da li dolazi do aglutinacije. Na polju koji sadrži lateks trebalo bi da dođe do stvaranja aglutinata dok u polju koji sadrži kontrolni lateks ne bi trebalo da dođe do stvaranja aglutinata. U slučaju da se ne javi ovakav rezultat reagensi su ili propali ili je došlo do kontaminacije i reagensi treba da budu odbačeni.

Nakon potvrde kvaliteta reagenasa protokol je izveden prema uputstvu proizvođača, a obuhvata sljedeće korake:

1. Po jedna kap (oko 30 μ l) rastvarača uzorka stavi se na dva polja čiste i suve aglutinacione ploče.
2. Bakteriološkom ezom pokupi se nekoliko kolonija *E. coli* sa SMAC agara.
3. Kolonije se razmute u dvijema kapima rastvarača uzorka na aglutinacionoj ploči kako bi se dobile teške, glatke suspenzije preko cijele površine polja.
4. Tokom 30 sekundi aglutinaciona ploča se lagano protresa i posmatra da li dolazi do pojave aglutinata ili zgrušavanja. Ako suspenzija ostane glatka treba nastaviti proceduru sljedećim korakom. U slučaju da je suspenzija vlaknasta ili granulisana uzorak nije pogodan za dijagnostiku *E. coli* O157 Rapid Latex Kitom obzirom da može dati lažno pozitivnu aglutinaciju pri dodavanju lateksa. U ovom slučaju treba primijeniti alternativne dijagnostičke metode.
5. Lagano se promućka svaki lateks reagens kako bi se obezbijedila homogenost suspenzije.
6. Dodaje se jedna kap reagensa REAG TEST EC1 u jednu od bakterijskih suspenzija i jedna kap reagensa REAG CONTROL u drugu bakterijsku suspenziju, pri čemu se ne smije dozvoliti da lateks kapaljka dodirne bakterijsku suspenziju.
7. Bakterijska suspenzija se promiješa korišćenjem novog plastičnog štapića za svaku dobijenu smješu.
8. Tokom 2 minuta aglutinaciona ploča se lagano protresa i posmatra da li dolazi do pojave aglutinacije. Aglutinacija se karakteriše vidljivom agregacijom čestica lateksa.
9. Korišćeni štapići i aglutinacione ploče se zatim odbacuju u odgovarajući dezinficijens.

Interpretacija rezultata vršena je prema shemi prikazanoj u **Tabeli 1**

Tabela 1. Interpretacija rezultata lateks aglutinacionog testa

Test lateks	Kontrolni lateks	Interpretacija
+	-	<i>E. coli</i> O157 prisutna
-	-	<i>E. coli</i> O157 odsutna
+-	++	Nespecifična aglutinacija

5.2.3. Biohemijska identifikacija

Biohemijska identifikacija izolata vršena je određivanjem IMViC profila koji podrazumijeva test produkcije indola, metil-crveno (MR) test, Voges-Proskauer (VP) test i test korišćenja citrata, kao i testom fermentacije laktoze i glukoze uz produkciju gasa i H₂S na dvostrukom Kligler agaru i procjenom pokretljivosti.

5.2.3.1. Indol test, pokretljivost i test produkcije sulfida

U svrhu izvođenja indol testa, procjene pokretljivosti i proizvodnje H₂S dio kolonije je ubodnom ezom zasijan u polu-tečnu SIM podlogu (HiMedia, Mumbai, India), u adekvatno obilježenim epruvetama. Podloga je prethodno pripremljena prema preporukama proizvođača i razlivena (po 7 ml) u staklene epruvete, a zatim sterilisana u autoklavu u trajanju od 15 minuta na temperaturi od 121°C. Nakon inokulacije epruvete su zapušene metalnim čepom i kulture inkubirane tokom 18 do 24 časa, u aerobnim uslovima na temperaturi od 37°C. Triptofan je esencijalna aminokiselina čijom se oksidacijom od strane nekih bakterija stvaraju indol, piruvična kiselina i amonijak. Nakon inkubacije, na vrh podloge dodato je 5 kapi Kovacsevog reagensa (Reahem, Novi Sad, Srbija), a produkcija indola karakterisana je pojavom jarko crvene boje nakon 1 do 2 minuta od dodavanja reagensa. U slučaju negativnog nalaza boja reagensa ostala je žuta. Procjena pokretljivosti izvršena je na osnovu bakterijskog rasta, odnosno pokretni sojevi prorastaju kroz podlogu difuzno od linije uboda eze, dok nepokretni sojevi rastu duž linije uboda eze. Pozitivan H₂S test očitavan je kao pojava crne boje duž linije inokulacije, dok pri negativnom testu nema promjene boje podloge.

5.2.3.2. Metil-crveno i Voges-Proskauer test

U svrhu izvođenja MR i VP testa dio bakterijske kolonije inokulisan je bakteriološkom ezom u tečnu MR-VP (HiMedia, Mumbai, India) podlogu, u adekvatno obilježenim epruvetama. Podloga je prethodno pripremljena prema preporukama proizvođača i razlivena (po 7 ml) u staklene epruvete, a zatim sterilisana u autoklavu u trajanju od 15 minuta na temperaturi od 121°C. Nakon inokulacije epruvete su zapušene metalnim čepom i kulture inkubirane tokom 18 do 24 časa, u aerobnim uslovima na temperaturi od 37°C.

Pomoću MR testa dokazuje se produkcija stabilnih kiselina uslijed fermentacije šećera, na način što se u kulturu dodaje metil crveno kao indikator promjene pH podloge. Nakon inkubacije u kulturu je dodat metil crveno indikator, a pozitivan MR test okarakterisan je promjenom boje podloge u crvenu boju, dok je negativan test promjenom boje podloge u žutu boju.

Pomoću VP testa dokazuje se produkcija acetoina uslijed fermentacije šećera, dodavanjem α -naftola, a zatim i KOH u kulturu. Nakon inkubacije u kulturu su dodati α -naftol te KOH, a sadržaj epruvete je promućkan. Pojava ljubičasto-crvene boje označavala je pozitivnu reakciju, dok pri negativnoj reakciji nije dolazilo do promjene boje podloge.

5.2.3.3. Test korišćenja citrata

U svrhu izvođenja testa korišćenja citrata dio bakterijske kolonije inokulisan je ubodnom ezom u dno i po kosini čvrste hranljive podloge Simons citratnog agara (HiMedia, Mumbai, India), u adekvatno obilježenim epruvetama. Podloga je prethodno pripremljena prema preporukama proizvođača i razlivena (po 7 ml) u staklene epruvete, a zatim sterilisana u autoklavu u trajanju od 15 minuta na temperaturi od 121°C i stavljena na kosinu da se ohladi, kako bi se dobila kosa podloga. Nakon inokulacije epruvete su zapušene metalnim čepom i kulture inkubirane tokom 18 do 24 časa, u aerobnim uslovima na temperaturi od 37°C. Testom korišćenja citrata dokazuje se sposobnost bakterija da koriste citrat kao jedini izvor ugljenika. Nakon inkubacije vršeno je očitavanje, a pozitivan rezultat okarakterisan je promjenom boje podloge iz zelene u plavu, dok pri negativnom rezultatu nema promjene boje podloge.

5.2.3.4. Test fermentacije laktoze i glukoze uz produkciju gasa i H₂S na dvostrukom Kligler agaru

U svrhu izvođenja testa fermentacije laktoze i glukoze uz produkciju gasa i H₂S, dio bakterijske kolonije inokulisan je ubodnom ezom u dno i po kosini dvostrukog Kliglerovog agara (Biolofe Italiana, Milan, Italy), u adekvatno obilježenim epruvetama. Podloga je prethodno pripremljena prema preporukama proizvođača i razlivena (po 7 ml) u staklene epruvete, a zatim sterilisana u autoklavu u trajanju od 15 minuta na

temperaturi od 121°C i stavljena na kosinu da se ohladi, kako bi se dobila podloga koja ima duboki i kosi dio. Nakon inokulacije epruvete su zapečene metalnim čepom i kulture inkubirane tokom 18 do 24 časa, u aerobnim uslovima na temperaturi od 37°C. Ovaj test služi za sagledavanje sposobnosti mikroorganizma da fermentuju laktozu i glukozu, proizvode gas kroz fermentaciju šećera i proizvode H₂S. Nakon inkubacije vršeno je očitavanje. U slučaju fermentacije samo glukoze, kiseline se akumuliraju u dnu podloge što se očitava promjenom boje dna podloge iz crvene u žutu. U slučaju fermentacije laktoze, zbog njenog većeg udjela u podlozi od glukoze, velika produkcija kiselina dovede do promjene boje kako dubokog dijela, tako i kosine podloge iz crvene u žutu. Produkcija gasa karakteriše se pojavom mjehurića u podlozi i njenim cijepanjem, dok se produkcija H₂S karakteriše pojavom crne boje u dubokom dijelu podloge uslijed stvaranja FeSO₄.

5.2.3.5. Interpretacija biohemijskih testova

Vrstom *E. coli* smatrali su se oni izolati koji su bili indol pozitivni, MR pozitivni, VP negativni, citrat negativni, koji fermentiraju laktozu i glukozu do kiselina uz prisustvo gasa i bez produkcije H₂S.

5.2.4. Čuvanje sojeva

Od izolata *E. coli* čiji je identitet bio potvrđen biohemijskim testovima, s dvostrukog Kligler agara bakteriološkom ezom, uzet je dio bakterijske kolonije i inokulisan u tečnu podlogu tripton soja bujon (TSB) (HiMedia, Mumbai, India) u adekvatno obilježenim epruvetama. Podloga je prethodno pripremljena prema preporukama proizvođača i razlivena (po 7 ml) u staklene epruvete, a zatim sterilisana u autoklavu u trajanju od 15 minuta na temperaturi od 121°C. Nakon kultivacije epruvete su zapečene metalnim čepom i kulture inkubirane tokom 18 do 24 časa, u aerobnim uslovima na temperaturi od 37°C. Nakon inkubacije kulture su pregledane, a zamućenje bujona značilo je porast kultura. Po 850 µl tečne kulture uzeto je i prenešeno u adekvatno obilježene, sterilne, plastične epruvete od 1,5 ml u koje je zatim dodato po 150 µl glicerola. Sadržaj epruvete je promiješan na vorteksu Yellow line TTS 2 (IKA[®] Works

Inc., Wilmington, USA) pri brzini od 1000 rpm, a uzorci su zatim do dalje upotrebe ostavljeni na čuvanje na temperaturi od -80°C .

5.2.5. Osvježavanje sojeva

Sojevi koji su čuvani na temperaturi od -80°C osvježeni su kultivacijom na krvnom agaru (KA) (Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Novi Sad, Srbija), tako što je vrhom bakteriološke eze zagrebana zamrznuta tečna kultura i inokulisana na podlogu metodom iscrpljivanja u cilju dobijanja pojedinačnih kolonija. Kulture su zatim inkubirane tokom 18 do 24 časa u aerobnim uslovima, na temperaturi od 37°C . Nakon inkubacije kulture su očitane pri čemu je pažnja bila usmjerena na stvaranje hemolize.

5.2.6. Matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija-vrijeme preleta masena spektrometrija (MALDI-TOF)

Konačna potvrda identiteta izolovanih sojeva izvršena je primjenom matricom potpomognute laserske desorpcije/ionizacije-vrijeme preleta masenom spektrometrijom (MALDI-TOF MS) na automatizovanom sistemu Microflex LT (Bruker Daltonik, Bremen, Germany), a inicijalna analiza podataka izvršena je na softveru Biotyper 2.0 (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). Mali dio pojedinačne kolonije, ne starije od 24 časa, sa krvog agara je sterilnim drvenim štapićem nanešen na metalnu pločicu, a zatim preko njega nanešen matriks – mravlja kiselina u količini od $1\mu\text{l}$. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi i kristalizacije smješe matriksa i uzorka, metalna pločica je stavljena u aparat u kome dolazi do jonizacije uzorka pod dejstvom snopa laserskih zraka. Desorpcija i jonizacija laserskim zrakom dovodi do protonizacije jona u analitu. Ovi protonirani joni se zatim ubrzavaju i razdvajaju na osnovu mase i naboja, a analiti se zatim detektuju i mjere analizom vremena preleta, na osnovu čega se stvaraju karakteristični spektri nazvani peptide mass fingerprints (PMF). Dobijeni profili su analizirani i upoređeni s bazom podataka. Vrijednost identifikacionog skora jednaka ili veća od 2.0 bila je dovoljana za pouzdanu identifikaciju do nivoa vrste (**Tabela 2**).

Tabela 2. Interpretacija rezultata MALDI-TOF MS metoda

OPSEG	OPIS	SIMBOL
2.300 – 3.000	visoko pouzdana identifikacija vrste	(+++)
2.000 – 2.299	sigurna identifikacija roda i vjerovatna identifikacija vrste	(++)
1.700 – 1.999	vjerovatna identifikacija roda	(+)
0.000 – 1.699	nepouzdana identifikacija	(-)

5.2.7. Aglutinacija

Za serotipizaciju izolata *E. coli*, čiji je identitet bio potvrđen MALDI-TOF MS metodom, primijenjen je metod direktne aglutinacije za serogrupe O26, O45, O103, O111, O121 i O145, a korišćen je polivalentni serum *E. coli* OK O Pool Big Six (Statens Serum Institut, Hillerød, Denmark). Ispitivani izolati nijesu bili stariji od 24 časa, a izvođenje metoda obuhvata sljedeće korake:

1. Na čisto, suvo predmetno staklo stavi se jedna kap seruma
2. Bakteriološkom ezom sa KA agara pokupljene su dvije do tri kolonije *E. coli*
3. Kolonije se prenose u kap seruma i razmućvanjem pravi suspenzija
4. Laganim pokretima miješa se bakterijska suspenzija i posmatra da li se javlja aglutinacija. Pozitivna reakcija očitava se u roku od 10 sekundi i ogleda se jasnim izdvajanjem aglutinata u bakterijskoj suspenziji.

Proizvođač test kita navodi da, kako bi se očuvao visok titar antitijela specifičnih za serogrupe uključene u *E. coli* OK O Pool Big Six, ne može se isključiti unakrsna reaktivnost s O126 serogrupom koja pripada EPEC.

5.2.8. Dokazivanje produkcije toksina na Vero kulturi ćelija

Za dokazivanje produkcije toksina korišćen je test na Vero kulturi ćelija (VCA) prethodno opisan od strane Rahna i saradnika (Rahn i sar., 1996), uz određene modifikacije. U cilju izdvajanja Stx izolati *E. coli*, koji su čuvani na -80°C, a čiji je identitet potvrđen MALDI-TOF MS metodom, inokulsani su u prethodno obilježene epruvete s Brain Heart Infusion (BHI) tečnom podlogom (Biolofo Italiana, Milan, Italy) tako što je vrhom eze zagrebana zamrznuta tečna kultura i razmućena u podlogu. Podloga je prethodno pripremljena prema preporukama proizvođača i razlivena (po 5 ml) u staklene epruvete, a zatim sterilisana u autoklavu u trajanju od 15 minuta na temperaturi

od 121°C. Nakon inokulacije epruvete su zapečene metalnim čepom i kulture inkubirane tokom 18 do 24 časa, u aerobnim uslovima na temperaturi od 37°C. U cilju izdvajanja Stx, nakon inkubacije, kulture su centrifugirane u centrifugi Eppendorf™ 5702 Series (Fisher Scientific, New Jersey, USA) pri brzini od 5000 rpm u trajanju od 10 minuta. Nakon centrifugiranja po 1 ml supernatanta prenešen je u sterilne i propisno obilježene epruvete zapremine 1,5 ml, a uzorci su zatim stavljeni na -20°C do dalje upotrebe.

Izvođenje VCA testa obuhvatalo je sljedeće korake:

1. U prvom koraku po 200 µl Glasgow's Minimum Essential Medium (GMEM) podloge (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) s dodatkom 10% FBS dodato je u bunarčiče mikrotitar ploče s 96 polja (Sarsedt, Nümbrecht, Germany).
2. Po 50 µl uzoraka dodato je u prvi red bunarčića, a zatim su napravljena stepenasta razrjeđenja uzorka i to 1:25 u drugom redu i 1:125 u trećem redu mikrotitar ploče.
3. Nakon dodavanja uzorka, po 100 µl suspenzije Vero ćelija (4×10^5 ćelija po ml) dodato je u svaki bunarčić. Vero ćelije korišćene u ovom istraživanju bile su iz 59. pasaže i bile su stare 2 dana.
4. Ploče su zatim inkubirane tokom 48 časova u atmosferi 5% CO₂ na temperaturi od 37°C.
5. Po završenoj inkubaciji u cilju fiksiranja i bojenja ćelijskih kultura u svaki bunarčić je dodato po 10 µl rastvora Giemsa boje
6. Nakon 15-ominutnog bojenja rastvor boje je odličen iz bunarčića, a mikrotitar ploče su posmatrane invertnim mikroskopom u cilju procjene stepena citotoksičnosti.

Procjena stepena citotoksičnosti vršena je poređenjem s kontrolnim bunarčićima koji su sadržali samo čistu kulturu Vero ćelija. Pozitivnim uzorkom smatrani su oni u kojima je bio ispoljen gubitak od 50% ćelija u poređenju s kontrolom. Uzorci s razrjeđenjem 1:5 u kojima je ispoljen stepen citotoksičnosti manji od 50% okarakterisani su kao slabo pozitivni. Rezultati su interpretirani kao negativni, slabo pozitivni i pozitivni pri titru 1:5, 1:25 i 1:125. Za pozitivnu kontrolu korišćen je supernatant centrifugirane kulture *E. coli* soj ATCC 35150.

5.2.9. Dokazivanje produkcije toksina imunoenzimskim testom (ELISA)

Za dokazivanje produkcije toksina korišćen je imunoenzimski test RIDASCREEN® Verotoxin (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). Ovaj ELISA test zasniva se na upotrebi specifičnih antitijela u sendvič tipu ELISA testa.

U cilju izdvajanja Stx sojevi koji su čuvani na -80°C , a čiji je identitet potvrđen MALDI-TOF metodom, inokulsani su u prethodno obilježene epruvete s TSB tečnom podlogom (HiMedia, Mumbai, India), tako što je vrhom bakteriološke eze zagrebana zamrznuta tečna kultura i razmućena u podlogu. Podloga je prethodno pripremljena prema preporukama proizvođača i razlivena (po 5 ml) u staklene epruvete, a zatim sterilisana u autoklavu u trajanju od 15 minuta na temperaturi od 121°C . Nakon inokulacije epruvete su zapečene metalnim čepom i kulture inkubirane tokom 18 do 24 časa, u aerobnim uslovima na temperaturi od 37°C . U cilju izdvajanja Stx, nakon inkubacije, kulture su centrifugirane u centrifugi Eppendorf™ 5702 Series (Fisher Scientific, New Jersey, USA) na $2.500 \times g$ u trajanju od 5 minuta. U testu je bilo korišćeno 100 μl čistog supernatanta. Za pozitivnu kontrolu korišćen je supernatant centrifugirane kulture EHEC serotip O157:H7 (soj ATCC 35150), dok su za negativnu kontrolu korišćeni supernatanti kultura EPEC serotip O127:H6 (soj 2348/69, Pasteur Institute, Paris, France) i ETEC neidentifikovanog serotipa (soj 8519-1, Pasteur Institute, Paris, France).

Prije izvođenja testa kulture sojeva korišćenih u testu i pripremljeni reagensi držani su na sobnoj temperaturi, a procedura testa izvedena je prema preporukama proizvođača i sadržao je sljedeće korake:

1. U prvom koraku u bunarčice mikrotitar ploče dodato je po 100 μl pozitivne kontrole, negativne kontrole i supernatanta ispitivanih kultura sojeva *E. coli*. Postavka uzoraka i kontrola na mikrotitar ploči prikazana je na slici (**Tabela 3**). Zatim je u svaki bunarčić dodato po 100 μl konjugata 1 koji sadrži antitijela konjugovana biotinom. Laganim tapkanjem mikrotitar ploče sadržaj bunarčića je promiješan, a zatim inkubiran na sobnoj temperaturi u trajanju od 60 minuta.

Tabela 3. Postavka uzoraka i kontrola. PK - pozitivna kontrola; NK - negativna kontrola; TSB – neinokulisana hranljiva podloga tripton soja bujon

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PK	8	19	28	39	47	55	66	77	87	97	
B	PK	9	20	31	40	48	56	68	78	88	98	
C	NK	10	21	32	41	49	58	70	79	91	100	
D	NK	12	22	33	42	50	60	71	80	92	101	
E	1	13	23	34	43	51	61	72	81	93	<i>E.coli</i> O157	
F	4	14	24	35	44	52	62	74	82	94	<i>E.coli</i> <i>eae</i>	
G	5	15	26	36	45	53	64	75	83	95	<i>E.coli</i> ST+	
H	7	18	27	38	46	54	65	76	86	96	TSB	

2. Nakon inkubacije, mikrotitar ploča je isprana 5 puta uz upotrebu 300 μ l pufera po bunarčiću. Ispiranje je vršeno na ispiraću mikrotitar ploča RT-2600C (Rayto, Shenzhen, China). Nakon ispiranja, tapkanjem mikrotitar ploče po papirnoj vati uklanjena je eventualno zaostala tečnost.
3. U svaki bunarčić mikrotitar ploče dodato je po 100 μ l konjugata koji sadrži polistreptavidin peroksidazu, a zatim je vršena inkubacija na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta.
4. Nakon inkubacije slijedilo je ispiranje prema uputstvu iz koraka 2.
5. U svaki bunarčić mikrotitar ploče dodato je po 100 μ l supstrata, a zatim je vršena inkubacija u tamnom, na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta. Nakon inkubacije u svaki bunarčić dodato je po 50 μ l stop reagensa u cilju zaustavljanja reakcije. Nakon miješanja sadržaja bunarčića blagim tapkanjem mikrotitar ploče vršeno je mjerenje ekstinkcije pri talasnoj dužini od 450 nm.

Očitavanje mikrotitar ploče je izvršeno na čitaču mikrotitar ploča RT- 2100C (Rayto, Shenzhen, China).

Izračunavanje cut-off – granične vrijednosti vršeno je po formuli:

$$\text{Cut-off} = \text{ekstinkcija negativne kontrole} + 0,150$$

Uzorak je proglašen pozitivnim ako je vrijednost ekstinkcije više od 10% veća od izračunate cut-off vrijednosti. Uzorak čija je vrijednost ekstinkcije bila više od 10% ispod izračunate cut-off vrijednosti smatran je negativnim. U slučaju da se vrijednost ekstinkcije uzorka nalazila u okviru ovog raspona smatrala se graničnom i za taj uzorak test je trebalo ponoviti.

$$\text{NEGATIVAN} < \text{cut-off} - 10\% < \text{GRANIČAN} < \text{cut-off} + 10\% < \text{POZITIVAN}$$

5.2.10. Ekstrakcija DNK iz kultura

Ekstrakcija DNK vršena je iz kultura *E. coli*, koje nijesu bile starije od 24 časa, a čiji je identitet bio potvrđen MALDI-TOF MS metodom. Primijenjen je metod kuvanja i potupak je obuhvatao sljedeće korake:

1. U sterilne, plastične i propisno obilježene epruvete zapremine 1,5 ml dodat je 1 ml fiziološkog rastvora.
2. Vrhom sterilnog plastičnog nastavka pokupljen je dio pojedinačne bakterisjke kolonije i prenešen je u sadžaj epruvete pripremljen u prethodnom koraku.
3. Bakterisjka suspenzija je potom centrifugirana 5 min na 8000 rpm. Centrifugiranje je izvršeno na centrifugi Microcentrifuge (NipptonGenetics, South Korea)
4. Supernatant je zatim odliven.
5. U epruvete je dodato po 500 μ l 0,5 N NaOH.
6. Uzorci su zatim inkubirani u trajanju od 10 minuta na temperaturi od 65°C. Za inkubaciju je korišćen termoblok Eppendorf ThermoStat C (Eppendorf, Hamburg, Germany).
7. Nakon inkubacije uzorci su homogenizovani na vorteksu pri brzini od 1000 rpm. Homogenizovanje je izvršeno na vorteksu Yellow line TTS 2 (IKA[®] Works Inc., Wilmington, USA)

8. U nove, sterilne, plastične, i propisno obilježene epruvete zapremine 1,5 ml dodato je 495 μ l PCR DNA free H₂O (Fisher Scientific, New Jersey, USA).
9. U posljednjem koraku je 5 μ l sadržaja iz koraka 7 dodato u PCR DNA free H₂O pripremljenu u prethodnom koraku, epruveta se zatvori, a sadržaj epruvete homogenizuje na vorteksu.

Ekstrakti DNK zatim su ostavljeni su na čuvanje na -20°C do dalje upotrebe.

5.2.11. Ekstrakcija DNK iz fecesa

Za 28 uzoraka urađena je ekstrakcija DNK direktno iz fecesa korišćenjem kita QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden Germany). Uzorci su odabrani metodom slučajnog izbora. Protokol ekstrakcije obuhvatao sljedeće korake:

1. U epruvete zapremine 2 ml odmjereno je oko 180-220 mg. Epruvete s uzorkom su stavljene u prethodno usitnjen i pripremljen led. Uzorci su, u cilju sprječavanja degradacije DNK, čuvani u ledu sve do momenta dodavanja prvog pufera (korak 2).
2. U svaki uzorak dodato je 1,4 ml pufera ASL. Po dodavanju pufera uzorci su homogenizovani na vorteksu u trajanju od 1 minuta. Temeljna homogenizacija uzoraka povećava konačnu koncentraciju DNK u krajnjem uzorku.
3. Homogenizovani uzorci su zatim inkubirani na temperaturi od 70°C u trajanju od 5 minuta.
4. Nakon inkubacije uzorci su homogenizovani na vorteksu u trajanju od 15 sekundi, a zatim centrifugirani na maksimalnom broju obrtaja u trajanju od 1 minuta kako bi se sedimentirale partikule fecesa.
5. U ovom koraku 1,2 ml supernatanta je pipetom prenešeno u nove epruvete zapremine 2 ml, a sediment odbačen. Prebacivanje male količine sedimenta ne remeti proceduru ekstrakcije.
6. U svaki uzorak dodata je po jedna InhibitEX[®] tableta. Odmah po dodavanju tablete uzorci su homogenizovani na vorteksu u trajanju od 1 minuta, odnosno sve dok se tableta u potpunosti rastvorila. Nakon homogenizacije slijedilo je inkubiranje uzorka na sobnoj temperaturi u trajanju od jednog minuta, kako bi se inhibitori iz stolice vezali za InhibitEX[®] matriks.

7. Nakon inkubacije, u cilju sedimentiranja inhibitora vezanih za InhibitEX[®], uzorak je centrifugiran na maksimalnom broju obrtaja u trajanju od 3 minuta. InhibitEX[®] tablete efikasno vezuju komponente koje inhibiraju enzimsku reakciju i uklanjaju ih iz uzorka u ranoj fazi ekstrakcije.
8. Kompletan supernatant je pipetiran u epruvete zapremine 1,5 ml, a sediment je odbačen. Prebacivanje male količine sedimenta ne remeti proceduru ekstrakcije. Epruvete sa supernatantom su centrifugirane na maksimalnom broju obrtaja u trajanju od 3 minuta.
9. U prazne epruvete zapremine 1,5 ml dodato je po 15 µl proteinaze K, a zatim je dodato i 200 µl supernatanta, dobijenog centrifugiranjem u prethodnom koraku. Uloga proteinaze K je u inaktivaciji nukleaza koje dovode do degradacije DNK u procesu pročišćavanja.
10. U svaki uzorak dodato je po 200 µl pufera AL. Uzorci su zatim temeljno homogenizovani na vorteksu u trajanju od 15 sekundi.
11. Homogenizovani uzorci su zatim inkubirani na temperaturi od 70°C u trajanju od 10 minuta, a zatim i pažljivo centrifugirani kako bi se s pokopca epruvete uklonile kapljice kondenzata.
12. Nakon inkubacije u lizat je dodato po 200 µl etanola (96-100%), a zatim su uzorci homogenizovani na vorteksu.
13. Propisno obilježena „QIAamp spin“ kolona je smještena u epruvete od 2 ml, a zatim kompletan lizat iz prethodnog koraka prebačen pipetom vodeći računa da se ne dodirnu rub i membrana kolone. Kolona je zatvorena i centrifugirana pri maksimalnom broju obrtaja u trajanju od 1 minuta. Nakon centrifugiranja kolona je prebačena u novu epruvetu, a epruveta s filtratom je odbačena.
14. Nakon pažljivog otvaranja kolone u nju je dodato 500 µl pufera AW1. Kolona je zatvorena i centrifugirana pri maksimalnom broju obrtaja u trajanju od 1 minuta. Nakon centrifugiranja kolona je prebačena u novu epruvetu, a epruveta s filtratom je odbačena.
15. Nakon pažljivog otvaranja u kolone je dodato 500 µl pufera AW2. Kolona je zatvorena i centrifugirana pri maksimalnom broju obrtaja u trajanju od 3 minuta.

- Nakon centrifugiranja kolona je prebačena u novu epruvetu od 2 ml, a epruveta s filtratom je odbačena.
16. Obzirom da rezidue pufera AW2 mogu dovesti do problema u naknadnoj primjeni, uzorak je ponovo centrifugiran pri maksimalnom broju obrtaja u trajanju od 1 minuta, kako bi se uklonila mogućnost zaostatka pufera AW2 u ekstraktu. Nakon centrifugiranja kolona je prebačena u novu, propisno obilježenu epruvetu od 1,5 ml, a epruveta s filtratom je odbačena.
17. Nakon pažljivog otvaranja kolone direktno na membranu je dodato 200 µl pufera AE. Kolona je zatvorena i nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 minuta, centrifugirana pri maksimalnom broju obrtaja u trajanju od 1 minuta, kako bi se DNK eluirala.

Ekstrakti DNK zatim su ostavljeni na čuvanje na -20°C do dalje upotrebe.

5.2.12. Dokazivanje posjedovanja gena virulencije *Stx1*, *Stx2* i *eae*

Za umnožavanje gena virulencije *Stx1*, *Stx2* i *eae* primijenjen je konvencionalni multipleks PCR metod prethodno opisan od strane Fadel i saradnika, korišćenjem prajmera (Microsynth AG, Balgach, Switzerland) koji su prikazani u tabeli (**Tabela 4**) (Fadel i sar., 2017).

Tabela 4. Prajmeri korišćeni za ciljane gene i veličine očekivanih PCR produkata

Ciljani gen	Veličina PCR produkta	Prajmer	Sekvenca prajmera
<i>stx1</i>	150 bp	Stx1F	5' CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G 3'
		Stx1R	5' AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC 3'
<i>stx2</i>	255 bp	Stx2F	5' GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC 3'
		Stx2R	5' TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G 3'
<i>eae</i>	384 bp	eaeF	5' GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC 3'
		eaeR	5' CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG 3'

Reakciona smješa ukupnog volumena 25 µl sadržala je 5 µl ispitivanog DNK ekstrakta, 12,5 µl Hot Start *Taq* 2x Master Mix (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), 0,5 µl svakog prajmera (20 µmol) i 4,5 µl sterilne PCR H₂O (Fisher Scientific,

New Jersey, USA). Kao pozitivna kontrola korišćen je DNK ekstrakt *E. coli* soja ATCC 35150. Kao negativna kontrola, odnosno za provjeru valjanosti izvedbe postupka, korišćena je no-template control (NTC), odnosno PCR smješa bez dodatog DNK ekstrakta.

PCR metod izveden je u sistemu TC-412 Thermal Cycler (Techne, Stone, UK) pri sljedećim uslovima: inicijalna denaturacija na temperaturi od 95°C u trajanju od 3 minuta, 35 ciklusa umnožavanja (denaturacija na 95°C u trajanju od 1 minuta, vezivanje prajmera na 57°C u trajanju od 1 minuta, ekstenzija na 72°C u trajanju od 1 minuta) i finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 7 minuta.

Po 10 µl PCR produkta s dodatkom 3 µl 6X DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Lithuania) prenešeno je na 1,5%-tni agarozna gel. U prednju i zadnju kolonu agarozna gela nanešen je marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Lithuania). Dobijeni PCR produkti su potom razdvojeni u 1x TBE (Tris-Borate-EDTA) puferu (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA) u elektroforezi (Biomerta, Göttingen, Germany) na 100 V u trajanju od 60 minuta. Gel je zatim, u cilju boljenja PCR produkata, potopljen u rastvor etidijum bromida (20 µl/250 ml 1x TBE) (Ethidiumbromide solution 1% in water, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany). Nakon tridesetominutnog bojenja analiza gela izvršena je u Serva BlueCube 300 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) sistemu za vizualizaciju.

5.2.13. Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti

Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti izolata *E. coli*, čiji je identitet potvrđen MALDI-TOF MS metodom rađeno je Kirby-Bauer metodom, odnosno disk difuzionim metodom prema smjernicama Evropskog komiteta za testiranje antimikrobne osjetljivosti (CLSI, 2017; European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017). Za pripremu inokuluma ispitivanog bakterijskog soja korišćene su kulture s BSA agara, ne starije od 24 h, od kojih je pravljena suspenzija u fiziološkom rastvoru, gustine 0,5 Mc Farland standarda zamućenosti, što približno odgovara $1-2 \times 10^8$ CFU/mL za *Escherichia coli*. Inokulumi su u roku od 15 minuta kultivisani na Petri ploče s hranljivom podlogom Mueller-Hinton agarom (HiMedia, Mumbai, India), prethodno zagrijanim na sobnoj

temperaturi i propisno obilježenim. Hranljiva podloga je prethodno pripremljena prema preporukama proizvođača i razlivena (po 20 ml) u sterilne, plastične Petri ploče. Inokulacija bakterijske suspenzije vršena je sterilnim brisom, po cijeloj površini agara, u tri različita pravca, s tri završna kružna pokreta po obodu agara. Nakon inokulacije, a u roku od 15 minuta, na površinu podloge stavljeni su antibiotski diskovi (Bioanalyse, Ankara, Turkey), a potom su kulture inkubirane tokom 16 do 20 časova u aerobnoj sredini na temperaturi od $35\pm 1^{\circ}\text{C}$. Antimikrobna osjetljivost svih *E. coli* ispitivana je na sljedeće antibiotike: ampicilin (10 μg), amoksisicilin+klavulanska kiselina (20+10 μg), cefuroksim (30 μg), ceftriakson (30 μg), gentamicin (10 μg), trimetoprim+sulfametoksazol (1,25+23,75 μg), ciprofloksacin (5 μg). Izolati rezistentni na 3 ili više grupa antibiotika smatrali su se multirezistentnim i ispitani su, drugim antibiogramom, na osjetljivost na sljedeće antibiotike: ceftazidim (10 μg), cefotaksim (5 μg), amikacin (30 μg), tobramicin (10 μg), streptomycin (10 μg) i nalidiksična kiselina (30 μg). Nakon inkubacije vršeno je mjerenje zona inhibicije rasta bakterija oko antibiotskih diskova, a interpretacija rezultata rađena je prema vrijednostima prikazanim u tabeli (**Tabela 5**).

Tabela 5. Smjernice za interpretaciju zona inhibicije rasta kod očitavanja disk difuzionog metoda za pripadnike familije *Enterobacteriaceae*

ANTIBIOTIK	OZNAKA DISKA- μg	ZONE INHIBICIJE (mm)		
		osjetljiv	intermedijaran	rezistentan
Ampicilin	AMP-10	≥ 14		≤ 13
Amoksisicilin+klavulanska kiselina	AMC-30	≥ 19		≤ 18
Cefuroksim	CXM-30	≥ 19		≤ 18
Ceftriakson	CRO-30	≥ 25	22-24	≤ 21
Gentamicin	CN-10	≥ 17	14-16	≤ 13
Trimetoprim+sulfametoksazol	STX-25	≥ 14	11-13	≤ 10
Ciprofloksacin	CIP-5	≥ 22	19-21	≤ 18
Ceftazidim	CAZ-10	≥ 22	19-21	≤ 18
Cefotaksim	CTX-5	≥ 20	17-19	≤ 16
Amikacin	AK-30	≥ 18	15-17	≤ 14
Tobramicin	TOB-10	≥ 17	14-16	≤ 13
Streptomycin	S-10	≥ 15	12-14	≤ 11
Nalidiksična kiselina	NA-30	≥ 19	14-18	≤ 13

5.2.14. Statistička analiza podataka

Dobijeni podaci izraženi su kao prevalencija ili proporcija i njihovi intervali povjerenja na nivou povjerenja od 95%.

Za procjenu stepena povezanosti prisustva STEC utvrđenog PCR metodom i pojave dijareje izračunat je unakrsni odnos (OR). Za utvrđivanje statističkog značaja i razlika u vrijednostima prevalencija, dobijenih takođe na osnovu rezultata PCR metoda, u odnosu na starost, pol i stil života psa korišćen je χ^2 test. Za procjenu statističkog značaja razlika u starosti pasa kod kojih su nađene i kod kojih nisu nađene STEC, korišćen je t test.

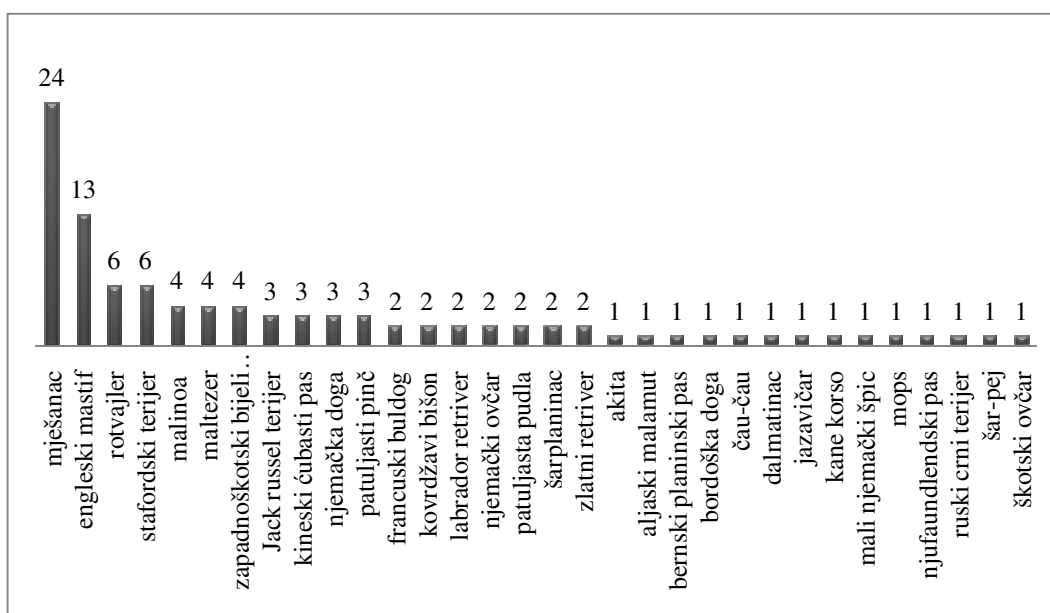
Razlike u prevalenciji u odnosu na rasu nijesu utvrđivane obzirom na mali broj jedinki u okviru rasa, kao ni u odnosu na kontakt s govedima kao rezervoarima STEC obzirom da za pse lualice ovaj epidemiološki podatak nije bio dostupan.

Statistička analiza podataka rađena je u OpenEpi Calculator softveru (Dean i sar., 2006).

6. REZULTATI

6.1. REZULTATI EPIDEMIOLOŠKE ANKETE

U istraživanje je bio uključen 101 pas s područja Novog Sada. Od ukupnog broja od 101 psa uključenog u istraživanje 24 (23,76%) su bili mješanci (**Grafikon 1**).

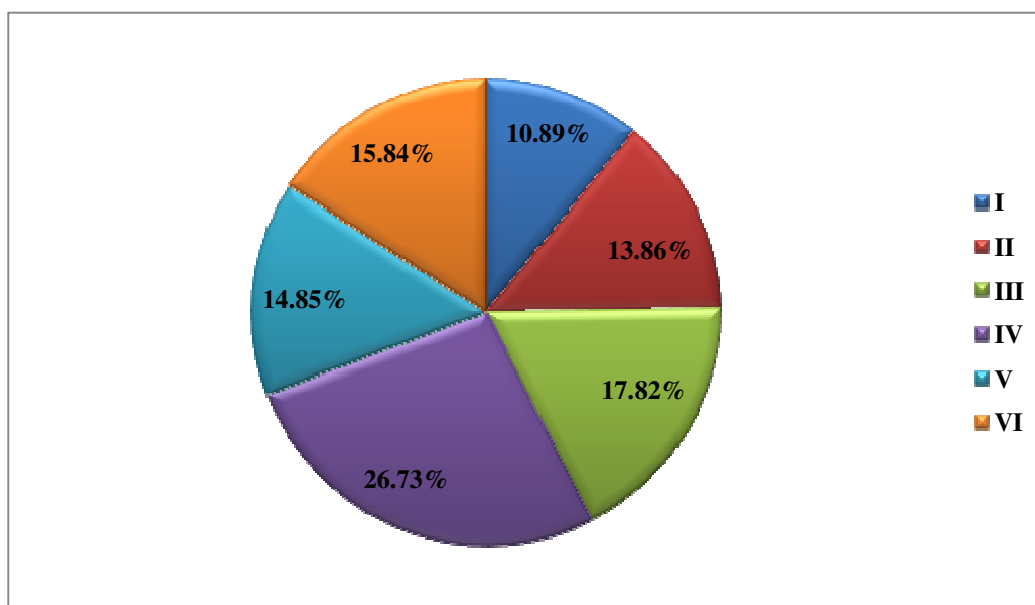


Grafikon 1. Zastupljenost rasa u ukupnoj ispitivanoj populaciji pasa

Preostalih 77 (76,24%) pripadalo 31-oj rasi i to: engleski mastif 13 (12,87%), rotvajler 6 (5,94%), stafordski terijer 6 (5,94%), malinoa 4 (3,96%), maltezer 4 (3,96%), zapadnoškotski bijeli terijer 4 (3,96%), Jack russel terijer 3, kineski ćubasti pas 3, njemačka doga 3, patuljasti pinč 3, francuski buldog 2 (2,97%), kovrdžavi bišon 2 (2,97%), labrador retriver 2 (2,97%), njemački ovčar 2 (2,97%), patuljasta pudla 2

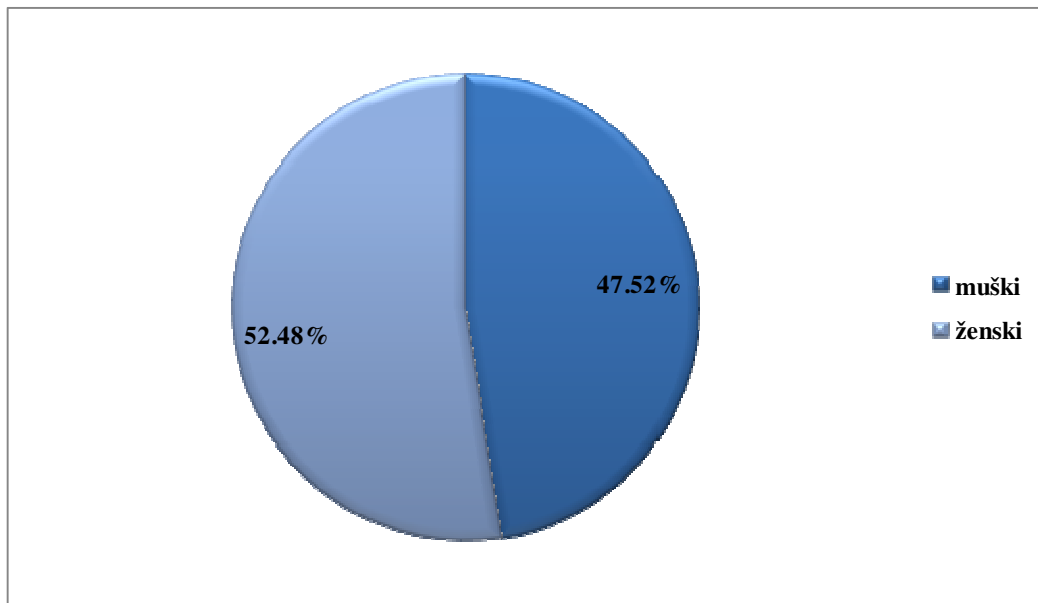
(2,97%), šarplaninac 2 (2,97%), zlatni retriever 2 (2,97%), akita 1 (0,99%), aljaski malamut 1 (0,99%), bernski planinski pas 1 (0,99%), bordoška doga 1 (0,99%), čau-čau 1 (0,99%), dalmatinac 1 (0,99%), jazavičar 1 (0,99%), kane corso 1 (0,99%), mali njemački špic 1 (0,99%), mops 1 (0,99%), njufaundlendski pas 1 (0,99%), ruski crni terijer 1 (0,99%), šar-pej 1 (0,99%) i škotski ovčar 1 (0,99%) (**Grafikon 1**).

Psi uključeni u istraživanje podijeljeni su u 6 starosnih kategorija koje odgovaraju zrelosti i starosnoj dobi pasa i to: I kategorija obuhvatila je 11 (10,89%) pasa starosti do 1 godine, II kategorija obuhvatila je 14 (13,86%) pasa starosti od 1 do 2 godine, III kategorija obuhvatila je 18 (17,82%) pasa starosti od 2 do 3 godine, IV kategorija obuhvatila je 27 (26,73%) pasa starosti od 3 do 5 godina, V kategorija obuhvatila je 15 (14,85%) pasa starosti od 5 do 7 godina i VI kategorija obuhvatila je 16 (15,84%) pasa starosti 7 i više godina godina (**Grafikon 2**).



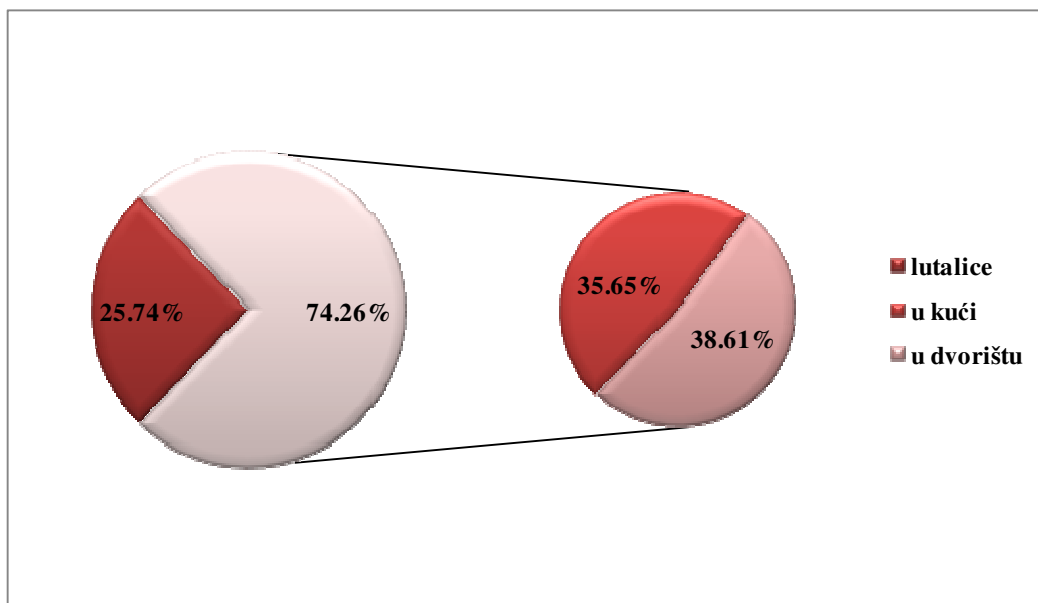
Grafikon 2. Zastupljenost starosnih kategorija u ukupnoj ispitivanoj populaciji (N=101). I - psi starosti do 1 godine, II - psi starosti od 1 do 2 godine, III - psi starosti od 2 do 3 godine, IV - psi starosti od 3 do 5 godina, V - psi starosti od 5 do 7 godina; VI - psi starosti 7 i više godina godina

Jedinki muškog pola u istraživanju bilo je 48 (47,52%), dok je jedinki ženskog pola bilo 53 (52,48%) (**Grafikon 3**).



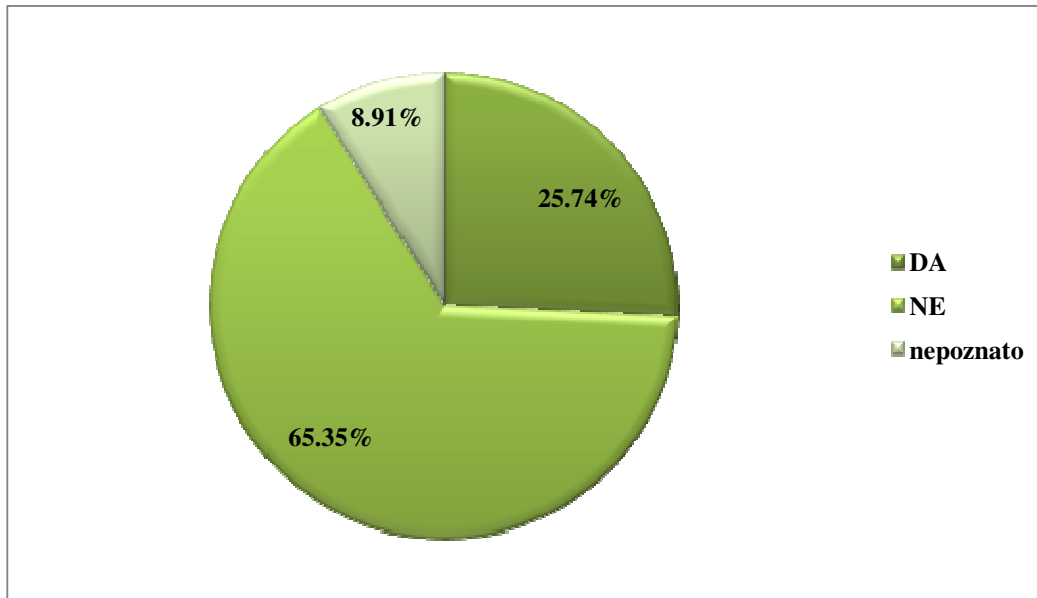
Grafikon 3. Zastupljenost polova u ukupnoj ispitivanoj populaciji (N=101)

Od ukupne populacije od 101 psa 75 (74,26%) su bili vlasnički psi, od čega je 36 (35,65% od ukupne ispitivane populacije, 47,29% od populacije vlasničkih pasa) držano u kući, a 39 (38,61% od ukupne ispitivane populacije, 52,71% od populacije vlasničkih pasa) u dvorištu, dok su 26 (25,74%) pasa bile lutalice držane u azilu (**Grafikon 4**).

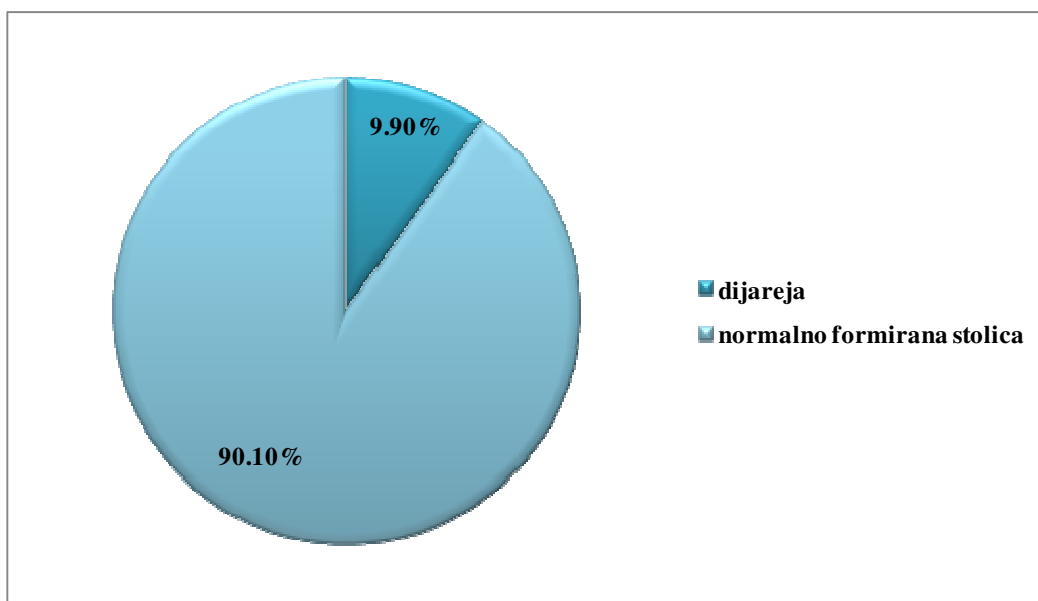


Grafikon 4. Prikaz zastupljenosti različitih životnih stilova pasa u ukupnoj ispitivanoj populaciji

Za 26 (25, 74%) pasa iz azila nijesu bili dostupni podaci o kontaktu s životinjama označenim kao rezervoari STEC (goveda, ovce), dok je od 75 (74,26%) pasa za koje su podaci bili dostupni 9 (8,91%) pasa bilo u kontaktu s govedima, a 66 (65,35%) pasa nije bilo u kontaktu s životinjama označenim kao rezervoari STEC (**Grafikon 4**).



Grafikon 4. Zastupljenost jedinki u ukupnoj populaciji pasa (N=101) koji su bili u kontaktu s životinjama označenim kao rezervoari STEC

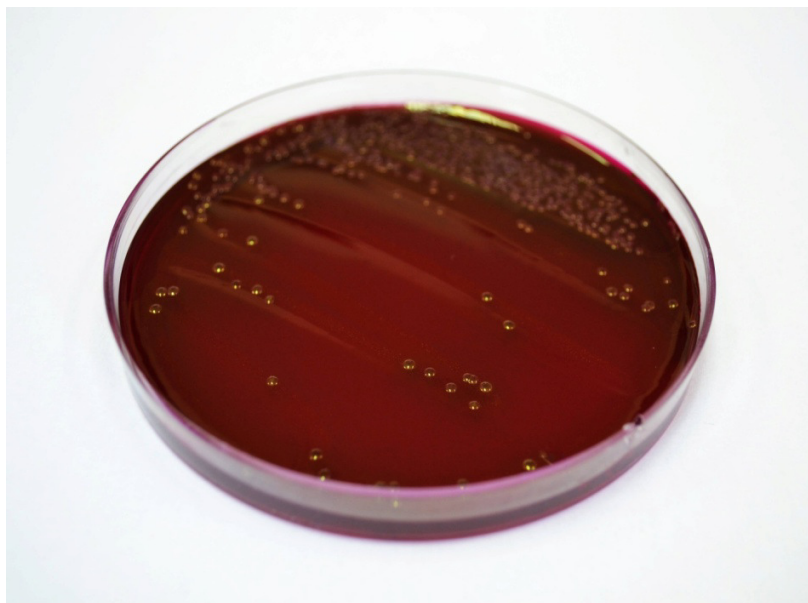


Grafikon 5. Zastupljenost dijareje u ukupnom uzorku stolice pasa (N=101)

Od ukupno 101 uzorka fecesa 10 (9,9%) uzoraka su bili tečni, dok su 91 (90,1%) uzorka bili normalno formirana stolica (**Grafikon 5**).

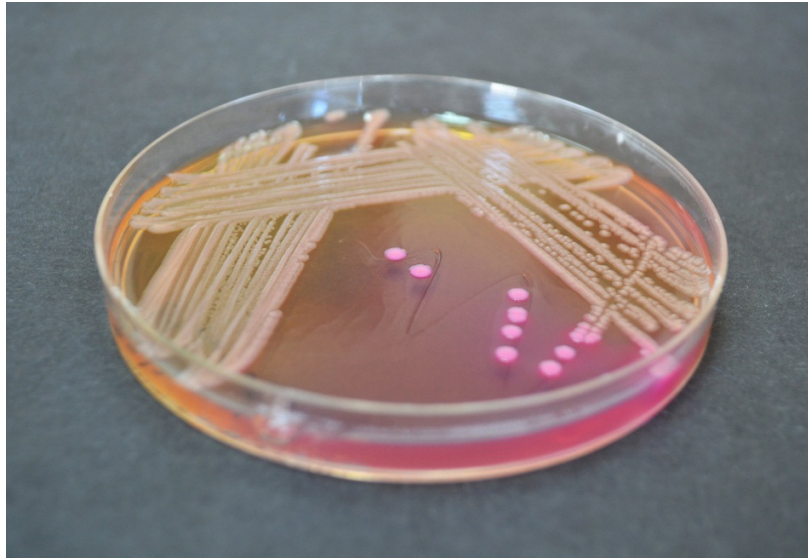
6.2. REZULTATI IZOLACIJE I IDENTIFIKACIJE

Od ukupno kultivisanog 101 uzorka stolice iz 94 (93,07%) su izolovane bakterijske kolonije koje su fenotipski odgovarale kolonijama *E. coli* na EA hranljivoj podlozi (**Slika 7**).



Slika 7. Izgled kolonija *E. coli* na Endo agaru(original)

Od kolonija izolovanih na EA hranljivoj podlozi su zatim supkultivacijom na SMAC agaru dobijena 93 (92,8%) soja u čistoj kulturi čije su kolonije fenotipski odgovarale kolonijama *E. coli* (**Slika 8**).



Slika 8. Izgled kolonija sorbitol-fermentirajuće *E. coli* na SMAC agaru (original)

Jedan izolat ni nakon ponovljene supkultivacije nije porastao na SMAC agaru. Od 93 soja izolovana na SMAC agaru 2 soja nijesu fermentisala sorbitol, međutim biohemijskom identifikacijom sojeva, koja je uslijedila, utvrđeno je da ova 2 soja ne pripadaju vrsti *E. coli*.

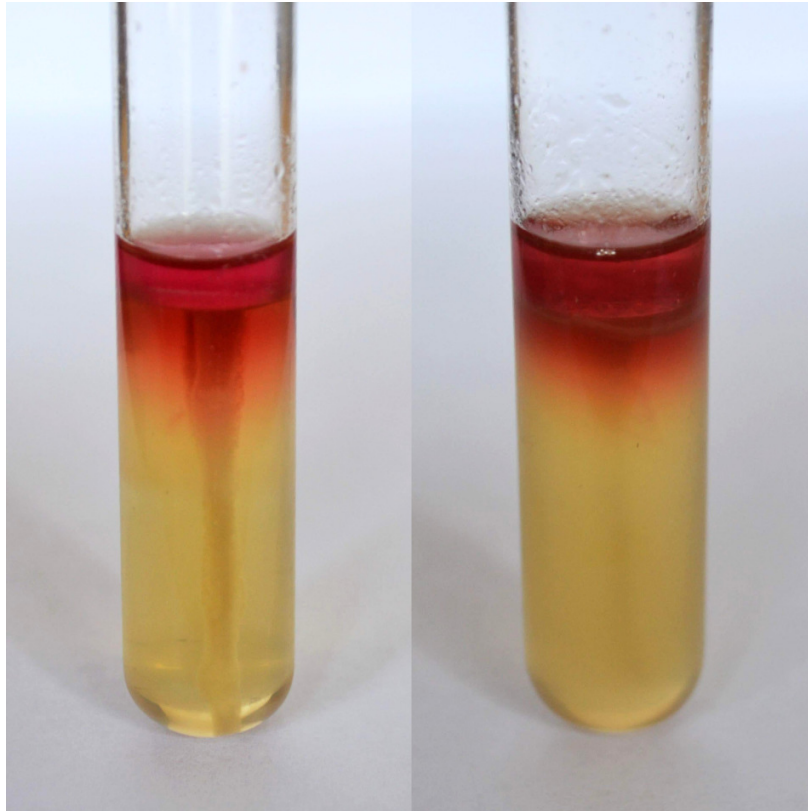
6.3. REZULTATI BIOHEMIJSKE IDENTIFIKACIJE

Nakon izolacije u čistoj kulturi uslijedila je biohemijska identifikacija izolata, a vrstom *E. coli* proglašeni su oni izolati sljedećeg biohemijskog profila: Indol pozitivan, MR pozitivan, VP negativan, citrat negativan, fermentacija glukoze i laktoze do kiselina uz produkciju gasa i bez produkcije H₂S (**Slika 9**). Od ukupno 93 soja dobijena u čistoj kulturi na SMAC agaru, za 82 izolata utvrđeno je da pripadaju vrsti *E. coli*. U odnosu na ukupan broj uzoraka korišćenih u istraživanju, prevalencija *E. coli* nakon izolacije na hranljivim podlogama i biohemijske identifikacije iznosila je 81,18%.



Slika 9. Biohemijski profil *E. coli*. (s lijeva na desno) indol+, MR+, VP-, citrat-, fermentacija šećera uz produkciju kiseline bez produkcije H₂S (original)

Očitavanjem kultura na SIM podlozi identifikovano je 8 nepokretnih izolata, obzirom da je bio evidentan njihov rast samo duž linije uboda eze (**Slika 10**), međutim naknadnom identifikacijom metodom MALDI-TOF MS utvrđeno je da jedan od ovih izolata ne pripada vrsti *E. coli*. Stoga, ukupno 7 (8,75%) izolata *E. coli* identifikovane su kao nepokretne, odnosno utvrđeno je da ne posjeduju flagele.



Slika 10. Izgled kolonija nepokretnih (lijevo) i pokretnih (desno) izolata *E. coli* na SIM hranljivoj podlozi (original)

6.4. REZULTATI MATRICOM POTPOMOŽNUTE LASERSKE DESORPCIJE /JONIZACIJE-VRIJEME PRELETA MASENE SPEKTROMETRIJE (MALDI-TOF)

Naknadnom identifikacijom izolata, metodom MALDI-TOF MS, potvrđen je identitet 80 od 82 izolata čija je pripadnost vrsti *E. coli* bila utvrđena biohemijskom identifikacijom, što predstavlja prevalenciju *E. coli* od 79,21% (95% CI: 70,3 – 85,98) u ispitivanoj populaciji pasa. Izolat broj 17 identifikovan je kao *Enterobacter cloacae* (vrijednost identifikacionog skora 2.203), dok je izolat broj 30 identifikovan kao *Raoultella ornithinolytica* (vrijednost identifikacionog skora 2.522) (**Tabela 6**).

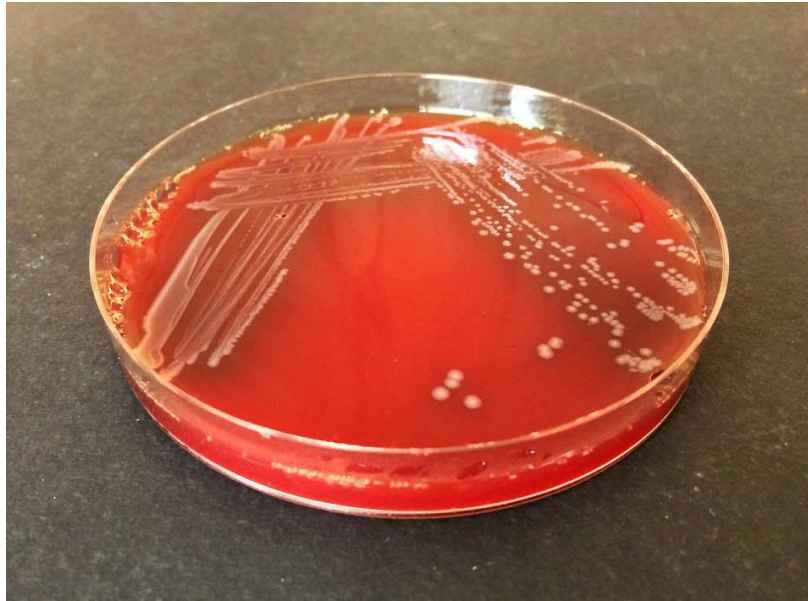
Tabela 6. Prikaz rezultata MALDI-TOF MS metoda za neke od izolata za koje je biohemijskom identifikacijom utvrđena pripadnost vrsti *E. coli*

Analyte name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
A1 (+++)	1	<i>Escherichia coli</i>	2.383	<i>Escherichia coli</i>	2.268
A2 (++)	4	<i>Escherichia coli</i>	2.266	<i>Escherichia coli</i>	2.218
A3 (++)	5	<i>Escherichia coli</i>	2.209	<i>Escherichia coli</i>	2.202
A4 (+++)	7	<i>Escherichia coli</i>	2.396	<i>Escherichia coli</i>	2.39
A5 (+++)	8	<i>Escherichia coli</i>	2.423	<i>Escherichia coli</i>	2.389
A6 (+++)	9	<i>Escherichia coli</i>	2.433	<i>Escherichia coli</i>	2.424
A7 (+++)	10	<i>Escherichia coli</i>	2.39	<i>Escherichia coli</i>	2.381
A8 (+++)	12	<i>Escherichia coli</i>	2.368	<i>Escherichia coli</i>	2.386
A12 (++)	17	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.203	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.097
A5 (+++)	30	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	2.522	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	2.476

Svi izolati *E. coli* imali su identifikacioni skor veći od 2.000, od čega za 21,25% izolata sa sigurnošću ustanovljena pripadnost rodu i dobijena vjerovatna specijska identifikacija (vrijednosti identifikacionog skora od 2.000 – 2.299), dok je za 78,75% izolata dobijena specijska identifikacija visoko vjerovatna (vrijednosti identifikacionog skora od 2.299 – 3.000).

6.5. REZULTATI OČITAVANJA STVARANJA HEMOLIZE

Od ukupno 80 izolata *E. coli* na KA hranljivoj podlozi 24 (30%) je stvaralo α tip hemolize, 13 (16,25%) β tip hemolize, dok je većina odnosno 43 (53,75%) bilo nehemolitično, odnosno stvaralo γ tip hemolize (Slika 11).



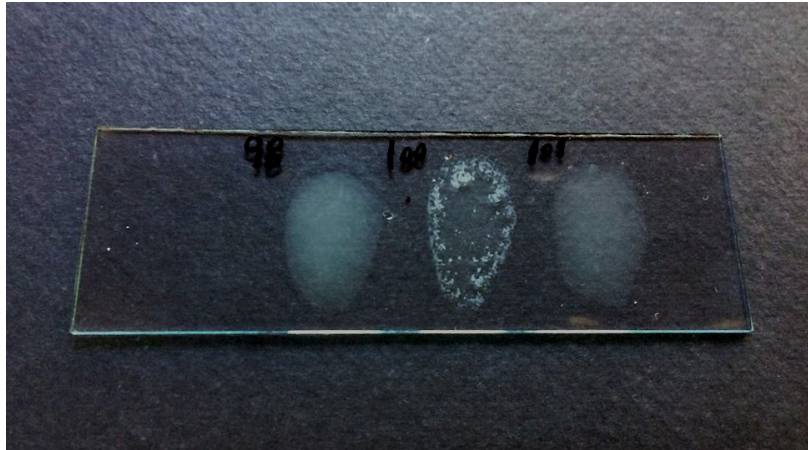
Slika 11. Rast *E. coli* izolata na krvnom agaru bez stvaranja hemolize (original)

6.6. REZULTATI LATEKS AGLUTINACIJE

Metodom lateks aglutinacije primjenom *E. coli* O157 Rapid Latex Test kita nije potvrđeno prisustvo *E. coli* iz serogrupe O157, odnosno svi izolati dali su negativnu reakciju. Prevalencija sojeva *E. coli* iz serogrupe O157 kod pasa u ovom istraživanju iznosila je 0% (95% CI: 0,0 – 3,66).

6.7. REZULTATI AGLUTINACIJE

Metodom direktne aglutinacije primjenom *E. coli* OK O Pool Big Six kita utvrđena su 2 pozitivna izolata (izolati 27 i 100) (**Slika 12**), što predstavlja prevalenciju STEC iz “velike šestorke” od 1,98% (95% CI: 0,54 – 6,93) u ispitivanoj populaciji, odnosno 2,5% u odnosu na ukupan broj izolata *E. coli*.



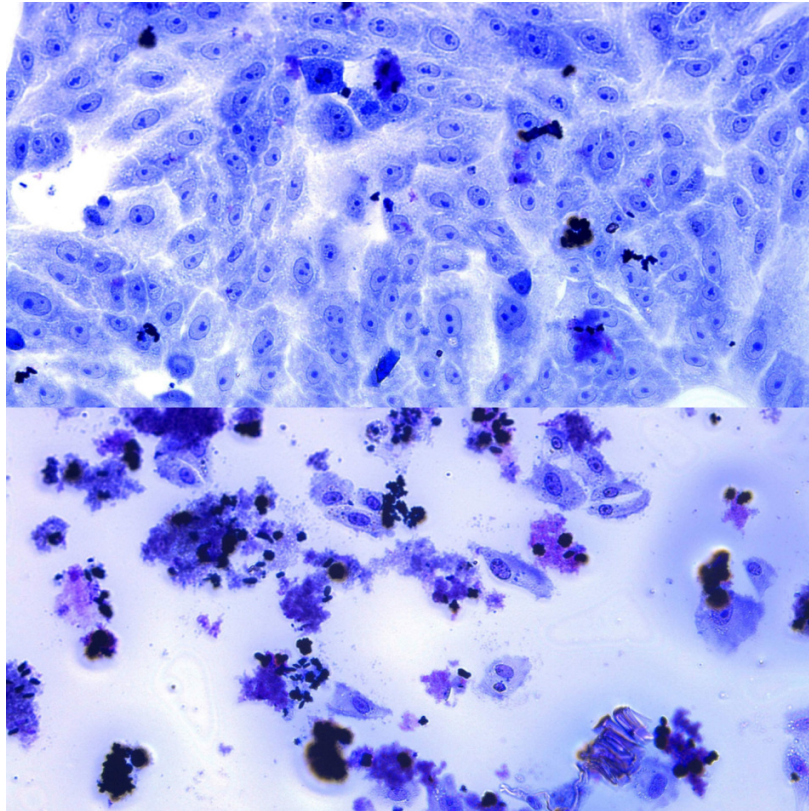
Slika 12. Interpretacija rezultata direktne aglutinacije. Pozitivan uzorak 100, negativni uzorci 98 i 101 (original)

6.8. REZULTATI TESTA VEROCITOTOKSIČNOSTI (VCA)

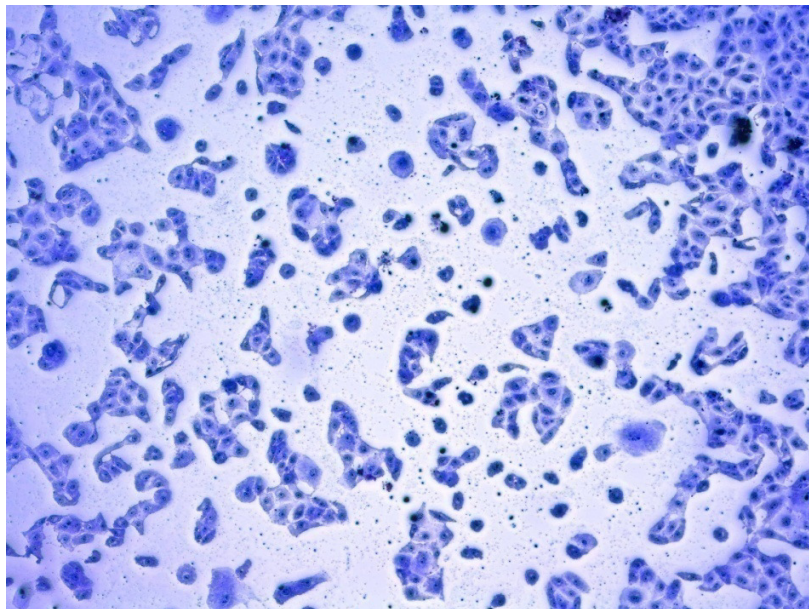
Prilikom očitavanja rezultata VCA testa u bunarčićima s negativnom kontrolom, odnosno čistom kulturom Vero ćelija, zabilježen je ravnomjeran porast ćelija preko cijelog dna bunarčića (**Slika 13**). U bunarčićima s pozitivnom kontrolom, odnosno onima u koje je u kulturu Vero ćelija dodat supernatant dobijen centrifugiranjem 24-oročasovne kulture EHEC soj ATCC 35130, pri svim razrjeđenjima (1:5, 1:25 i 1:125) zabilježen je gubitak preko 50% ćelija (**Slika 13**).

Citotoksičnost kao posljedica produkcije Stx zabilježena je u bunarčićima u koje su dodati supernatanti centrifugiranih kultura 2 izolata i to izolata broj 22 i broj 94 (**Slika 14**). U oba sličaja citotoksičnost je zabilježena samo pri razrjeđenju 1:5.

Vrijednost prevalencije STEC u ispitivanoj populaciji pasa, a dobijena VCA testom, iznosila je 1.98%.



Slika 13. Negativna (gore) i pozitivna (dolje) kontrola (razrjeđenje 1:5). Uveličanje 20x. (original)



Slika 14. Pozitivan rezultat pri razrjeđenju 1:5, izolat 22, uveličanje 5x (original)

6.9. REZULTATI IMUNOENZIMSKOG TESTA (ELISA)

Nakon izvedenog ELISA testa i očitavanja vrijednosti ekstinkcija na mikrotitar ploči dobijeni su rezultati prikazani u tabeli (**Tabela 7**).

Tabela 7. Očitane vrijednosti ekstinkcija. Crvenom bojom označeni su pozitivni rezultati; žutom bojom označeni su marginalni rezultati.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,402	0,165	0,172	0,104	0,156	0,176	1,145	0,172	0,139	0,162	0,151	
B	2,400	0,137	0,139	0,094	0,133	0,135	0,135	0,135	0,136	0,130	0,170	
C	0,148	0,130	0,133	0,099	0,122	0,125	0,132	0,123	0,138	0,122	0,141	
D	0,147	0,131	0,130	0,114	0,116	0,153	0,513	0,133	0,122	0,687	0,143	
E	0,131	0,099	0,105	0,087	0,098	0,103	0,167	0,121	0,114	0,115	2,958	
F	0,148	0,110	0,116	0,111	0,126	0,108	0,543	0,126	0,116	0,119	0,148	
G	0,111	0,098	0,524	0,114	0,112	0,111	0,125	0,150	0,439	0,269	0,176	
H	0,094	0,081	0,071	0,091	0,285	0,109	0,120	0,159	0,145	0,172	0,148	

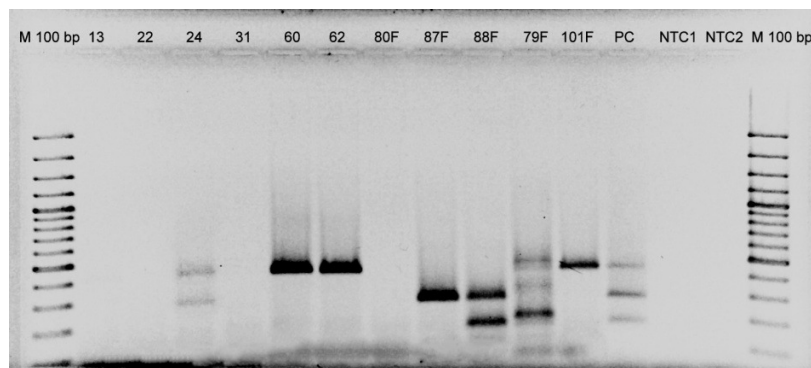
Vrijednosti ekstinkcija negativnih kontrola iznosile su 0,417 i 0,148. Preračunom cut-off vrijednosti, na osnovu vrijednosti negativne kontrole, pozitivnim uzorcima proglašeni su oni čije su vrijednosti ekstinkcije bile veće ili jednake vrijednosti 0,328, dok su negativnim uzorcima bili proglašeni oni čije su vrijednosti ekstinkcije bile manje ili jednake vrijednosti 0,268. Rezultati čije su se vrijednosti kretale između graničnih vrijednosti 0,268 i 0,328 smatrani su marginalnim i za takve uzorke bilo je neophodno ponoviti test. Ukupno 2 rezultata (uzorci 46 i 95) imala su marginalne vrijednosti, te je za njih ELISA test ponovljen. Na ponovljenom testu dobijene su vrijednosti ekstinkcija za pozitivnu kontrolu 2,355, za negativnu kontrolu 0,130, za uzorak 46 0,160 i za uzorak 95 0,230. Na osnovu vrijednosti negativne kontrole izračunate su granične vrijednosti i negativnim rezultatom proglašavaju se vrijednosti ekstinkcija 0,252 i manje, dok se

pozitivnim rezultatom proglašavaju vrijednosti ekstinkcija 0,308 i više. Oba uzorka na ponovljenom testu dala su negativan rezultat.

ELISA testom utvrđeno je 6 uzoraka pozitivnih na prisustvo Stx, što čini prevalenciju STEC od 5,94% (95% CI: 2,75 – 12,36) u ispitivanoj populaciji pasa, odnosno prevalenciju od 7,5% u ukupnom broju od 80 ispitanih izolata *E. coli*.

6.10. REZULTATI TESTA LANČANE REAKCIJE POLIMERAZE (PCR)

Primjenom konvencionalnog PCR metoda kod jednog izolata (izolat 24) utvrđeno je prisustvo *stx2* i *eae* gena (**Slika 15**), što predstavlja prevalenciju STEC od 1,25% u ukupnom broju od 80 izolata *E. coli*.



Slika 15. Rezultati konvencionalnog PCR metoda. M-marker 100 bp, PC -pozitivna kontrola (*stx1* 150 bp, *stx2* 255 bp, *eae* 384 bp), NTC- non template kontrola. (original)

Primjenom PCR metoda, a korišćenjem DNK ekstrakata dobijenih iz nasumično odabranih uzoraka fecesa utvrđeno je prisustvo traženih gena u 4 uzorka i to u uzorku 79 utvrđeno je prisustvo sva 3 tražena gena (*stx1*, *stx2* i *eae*), u uzorku 87 prisustvo 1 gena (*stx2*) i u uzorku 88 prisustvo dva gena (*stx1* i *stx2*) (**Slika 15**), dok je u uzorku 84 utvrđeno prisustvo 2 gena (*eae* i *stx2*) (**Tabela 8**).

Tabela 8. Rezultati konvencionalnog PCR metoda

No	GEN			GRUPA <i>E. coli</i>
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	
7	-	-	+	EPEC
9	-	-	+	EPEC
10	-	-	+	EPEC
12	-	-	+	EPEC
14	-	-	+	EPEC
24	-	+	+	EHEC
31	-	-	+	EPEC
60	-	-	+	EPEC
61	-	-	+	EPEC
62	-	-	+	EPEC
64	-	-	+	EPEC
79	+	+	+	EHEC
81	-	-	+	EPEC
82	-	-	+	EPEC
84	-	+	+	EHEC
85	-	-	+	EPEC
87	-	+	-	STEC
88	+	+	-	STEC
101	-	-	+	EPEC

Primjenom PCR metoda dokazano je prisustvo STEC kod 5 psa, što predstavlja prevalenciju STEC od 4,95% (95% CI: 2,13 – 11,07) u populaciji pasa uključenih u istraživanje. Dva uzorka (24 i 79) dala su pozitivan PCR signal kako za gene za Stx (2 *stx2* i 1 *stx1*), tako i za gen za intimin, te su ti izolati okarakterisani kao EHEC, a prevalencija ovih *E. coli* u ispitivanoj populaciji pasa iznosila je 2,97% (95% CI: 1,015 - 8,371) (**Tabela 8**).

Prisustvo samo *eae* gena utvrđeno je u 14 od ukupno 101 uzorka, pa time prevalencija EPEC u ispitanoj populaciji pasa iznosi 13,86 % (95% CI: 8,44 – 21,93) (**Tabela 8**).

6.11. REZULTATI ANTIMIKROBNE REZISTENCIJE

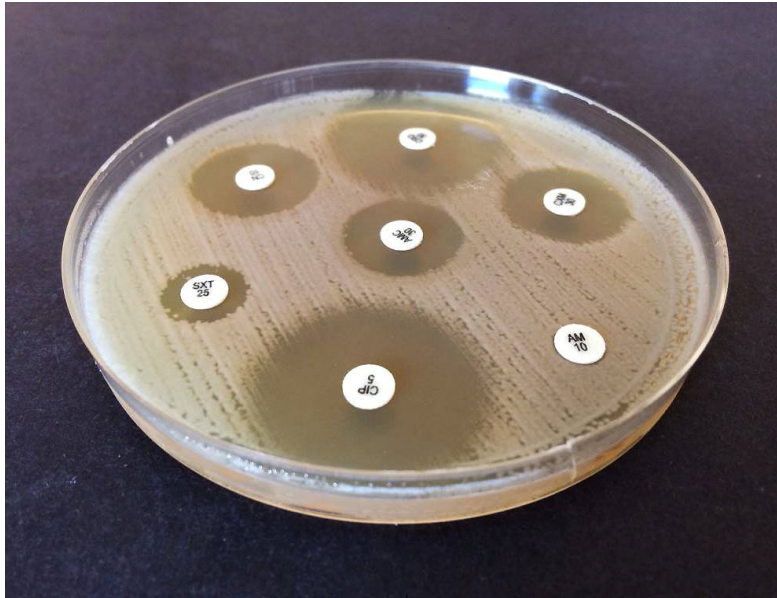
Primjenom disk difuzionog metoda kod 24 od 80 ispitivanih izolata *E. coli* utvrđena je rezistencija na 1 ili više primijenjenih antibiotika (**Tabela 9**). Najviše izolata

E. coli pokazalo je rezistenciju na ampicilin i to 18 izolata (22,5%), zatim na amoksisicilin s dodatkom klavulanske kiseline i na cefuroksim (8,5%), na sulfametaksazol s dodatkom trimetoprima i na ciprofloksacin 6 (7,5%), te na ceftriakson 2 izolata (2,5%), dok nijedan izolat nije pokazao rezistenciju na gentamicin.

Tabela 9. Obrasci antimikrobne rezistencije među *E. coli* izolatima. AMC-amoksisicilin+klavulanska kiselina, AMP-ampicilin, CXM-cefuroksim, CRO-ceftriakson, CN-gentamicin, STX-sulfametoksazol+trimetoprim, CIP-ciprofloksacin; R-rezistentan, I-intermedijaran, O-osjetljiv

IZOLAT	ANTIBIOTIK						
	AMC	AMP	CXM	CRO	CN	STX	CIP
13	R	R	O	O	O	O	O
14	O	R	O	O	O	O	O
23	R	R	O	O	O	R	O
28	R	R	O	O	O	O	O
33	O	R	O	O	O	O	R
34	O	R	O	O	O	R	O
39	O	O	O	O	O	O	R
41	O	R	O	O	O	O	R
42	O	R	O	O	O	R	O
44	O	R	R	O	O	O	O
46	O	R	O	O	O	R	O
48	O	R	O	O	O	O	O
56	O	O	R	O	O	O	O
74	O	R	O	O	O	O	O
78	R	R	O	O	O	O	I
79	O	O	R	O	O	O	O
81	O	O	R	O	O	O	R
86	R	R	R	I	O	R	I
87	O	R	O	O	O	O	O
88	O	O	R	O	O	O	O
91	O	O	R	I	O	O	O
93	O	R	O	O	O	O	O
97	R	R	O	O	O	R	O
98	R	R	O	O	O	O	O

Kod jednog izolata (izolat 86) utvrđena je rezistencija na 4 grupe antibiotika i to na peniciline (amoksisicilin + klavulanska kiselina i ampicilin), cefalosporine (II generacije cefuroksim i III generacije ceftriakson), sulfonamide (sulfametoksazol + trimetoprim) i fluorohinolone (ciprofloksacin), te je ovaj izolat proglašen multirezistentnim (**Slika 16**).



Slika 16. Rezultati antibiograma za izolat *E. coli* 86 (original)

Ovaj multirezistentni izolat stoga podvrgnut je ispitivanju rezistencije na prošireni spektar antibiotika (ceftazidim, cefotaksim, amikacin, tobramicin, streptomycin, nalidiksična kiselina), pri čemu je utvrđena njegova rezistencija na streptomycin i nalidiksičnu kiselinu (**Slika 17**).



Slika 17. Rezultati drugog antibiograma za izolat *E. coli* 86 (original)

6.12. REZULTATI STATISTIČKE ANALIZE

Primjenom PCR metoda STEC su utvrđene u 2 (20%, 95% CI: 5,67 – 50,98) od 10 dijarojičnih i 3 (3,3%, 95% CI: 1,13 – 9,25) od 92 nedijarojična uzorka fecesa (**Tabela 10**).

Tabela 10. Broj STEC pozitivnih dijarojičnih i nedijarojičnih uzoraka utvrđen primjenom PCR metoda

		DIJAREJA		UKUPNO
		+	-	
STEC	+	2	3	5
	-	8	88	96
UKUPNO		10	92	101

Izračunavanjem unakrsnog odnosa za procjenu povezanosti prisustva STEC i pojave dijareje dobijena je vrijednost 5,8667 (95% CI: 0.8731 - 39.4218, P = 0.0687). Kako na nivou povjerenja od 95% intervali povjerenja obuhvataju vrijednost 1.0 tako povećane šanse (OR 5,8667) za nastanak dijareje kao posljedice izloženosti STEC ne dosežu statistički značaj.

U I i VI starosnoj kategoriji, primjenom PCR metoda, prisusvo STEC nije evidentirano (0,0%, 95% CI: 0,0 – 23,84, odnosno 0,00%, 95% CI: 0,00 – 19,36), dok je u ostalim kategorijama njihovo prisustvo utvrđeno u približno jednakom procentu i to u II starosnoj kategoriji u 1 (7,14%, 95% CI: 1,27 – 31,47) od 14 uzoraka, u III starosnoj kategoriji u 1 (5,55%, 95% CI: 0,99 – 25,76) od 18 uzoraka, u IV starosnoj kategoriji u 2 (7,41%, 95% CI: 2,06 – 23,37) od 27 uzoraka i V u 1 (6,25%, 95% CI: 1,11 – 28,33) od 16 uzoraka. Poređenjem prevalencija, dobijenih na osnovu rezultata PCR metoda, na nivou povjerenja 95% i primjenom hi-kvadrat testa nije utvrđen statistički značaj starosti (χ^2 2.004, p 0.8487) i prisustva STEC. Nadalje, primjenom t testa nije utvrđena statistički značajna razlika (p 0,7632) u starosti pasa kod kojih su STEC nađene ($\sigma^2 = 4,57 \pm 2,39$), odnosno nisu nađene ($\sigma^2 = 4,40 \pm 1,95$).

Primjenom PCR metoda prisustvo STEC potvrđeno je u 2 (4,17%, 95% CI: 1,15 – 13,97) od 48 uzoraka i 3 (5,55%, 95% CI: 1,94 – 15,38) od 53 uzorka koji su poticali od mužijaka odnosno ženki. Poređenjem prevalencija, dobijenih na osnovu rezultata PCR

metoda, na novou povjerenja 95% nije utvrđen statistički značaj starosti (χ^2 2.004, p 0.8487) i pola psa (χ^2 0.119, p 0.7297) u odnosu na prisustvo STEC.

U odnosu na stil života psa, primjenom PCR metoda najveća prevalencija STEC utvrđena je kod lotalica i to u 4 (15,38%, 95% CI: 6,15 – 33,53) od 26 uzoraka, zatim u 1 (2,56%, 95% CI: 0,45 – 13,18) od 39 uzoraka vlasničkih pasa držanih u dvorištu, dok ni u jednom (0,0%, 95% CI: 0,0 – 9,64) od 36 uzoraka uzetih od vlasničkih pasa držanih u kući nije utvrđeno prisustvo STEC. Na novou povjerenja 95% statistički značaj utvrđen je između stila života psa (χ^2 8,363, p 0.0153), odnosno kod pasa lotalica utvrđena je značajno veća prevalencija STEC u odnosu na vlasničke pse.

7. DISKUSIJA

Kontinuirani porast populacija pasa kako lualica, tako i kućnih ljubimaca predstavlja trajan epidemiološki problem u urbanim sredinama širom svijeta (Ristić i sar., 2017). Razlog tome je da se kao posljedica čestog kontakta ljudi i životinja povećava vjerovatnoća transmisije mikroorganizama među ovim domaćinima (Beutin, 1999). Feces pasa može sadržati više organizama potencijalno patogenih za ljude, a uzročnici koji izazivaju oboljenja GIT i izazivaju dijareju uključuju *Campylobacter*, *Salmonella* i *Yersinia* vrste, kao i *E. coli*. Pseći feces može doprinijeti i disperziji protozoa poput *Giardia* i *Cryptosporidium*, ali i valjkastih crva poput *Toxocara canis*. Odnedavno sve je veći broj dokaza da kućni ljubimci i njihov feces mogu predstavljati i rezervoar bakterija rezistentnih na antibiotike i čime predstavljaju prijetnju po javno zdravlje (Cinquelpalmi i sar., 2013). *Escherichia coli* prisutna je kao uobičajen konstituent crijevne mikroflore ljudi i životinja, pa ipak dijarejageni sojevi ove bakterije jedan su od vodećih uzroka dijarejalnih oboljenja na svjetskom novou. Jedna od 6 grupa dijarejagenih *E. coli* - STEC obuhvata sojeve koji su serološki veoma raznovrsni, a koji su prepoznati kao uzročnici ozbiljnih oboljenja ljudi poput HKa, kao i potencijalno fatalnih komplikacija poput HUSa (Sancak i sar., 2004; Staats i sar., 2003; Zotta i sar., 2015). Od 1995. godine i prve prijave izolacije STEC u Srbiji od strane Čobeljića i saradnika mali broj istraživanja je bio fokusiran na ove *E. coli*, a prema dostupnoj literaturi nema podataka o prisustvu i karakterizaciji STEC kod pasa u Srbiji (Blagojevic i sar., 2012; Cobeljic i sar., 2003; Cobeljic i sar., 2005; Cobeljic i sar., 1995; Nastasijevic i sar., 2008, 2009).

Izolacija *E. coli* iz fecesa 80 (79,2%) od ukupno 101 psa uključenog u istraživanje nije neočekivana obzirom da se ova bakterija smatra dijelom normalne flore gastrointestinalnog trakta životinja i ljudi. Varijacije u bakterijskoj flori kod zdravih jedinki su moguće pri čemu je zastupljenost bakterija uslovljena različitim faktorima

poput ishrane, koprofagije i okruženja u kom psi borave (Batt i sar., 1996). Vrijednost izolacije *E. coli* iz fecesa pasa od 79,2%, dobijena u ovom istraživanju, u saglasju je s vrijednošću od 83,65%, prijavljene od strane Yousifa i saradnika, a dobijene na približno jednakom broju uzoraka (104) kao u ovoj studiji, takođe upotrebom klasičnih metoda kultivacije i identifikacije (Yousif i sar., 2016). Nešto više vrijednosti stepena izolacije *E. coli* iz fecesa pasa od 91% saopštili su Seepersadsingh i Adesiyun, kao i Ahmed i saradnici, iako na malom uzorku (16), vrijednost od 88% (Ahmed i sar., 2015; Seepersadsingh i Adesiyun, 2009). Niži procenat izolacije *E. coli* iz uzoraka fecesa pasa prikupljenih s šetačkih staza u Mineapolisu, Minesota prijavili su Johnson i saradnici i iznosio je 58% (Johnson i sar., 2001). Hammermuller i saradnici i Younis i saradnici prijavili su isti i takođe niži ukupni procenat izolacije od 66,67% iz fecesa klinički zdravih i pasa s dijarejom (Hammermueller i sar., 1995; Younis i sar., 2015). U dvogodišnjem istraživanju sprovedenom na uginulim i uspavanim psima u Južnoj Koreji procenat izolacije *E. coli* iz intestinalnog brisa iznosio je 71,61% (Nam i sar., 2010). Procenat izolacije *E. coli* iz rektalnog brisa od 47,1% saopšten je u istraživanju iz Irana kod pasa s dijarejom (Torkan i sar., 2016).

Biohemijska identifikacija i identifikacija izolata primjenom MALDI-TOF MS metoda u ovom istraživanju podudarale su se kod 97,56% izolata. Drugi autori prijavili su takođe visoku korelaciju između ovih metoda, pa tako Bizzini i Greub nalaze tačnu identifikaciju do nivoa vrste u 95,1% od 1278 ispitanih izolata (Bizzini i Greub, 2010). Pri primjeni klasične biohemijske identifikacije i MALDI-TOF MS metoda u identifikaciji vrsta iz familije *Enterobacteriaceae*, Rodriguez i saradnici prijavili su podudaranje ova dva metoda u 92,9% slučajeva, pri čemu su se rezultati podudarali 100% prilikom identifikacije *E. coli* izolata (Rodrigues i sar., 2017). Za 93,94% izolata kojima je biohemijskom identifikacijom utvrđena pripadnost vrsti *E. coli* taj identitet je i potvrđen primjenom MALDI-TOF MS metoda u studiji koju su objavili Shell i saradnici (Shell i sar., 2017). Takođe visoke vrijednosti podudaranja ova dva testa pri identifikaciji *E. coli* izolata prijavili su i grupe istraživača predvođene Cherkaouiem i Romanusom (Cherkaoui i sar., 2010; Romanus i sar., 2011). Ipak, nasuprot ovim rezultatima Khot i Fisher ukazuju na limitiranost MALDI-TOF MS metoda u diferencijaciji *E. coli* i

Shigella vrsta, obzirom da su u svom istraživanju zabilježili određen broj *E. coli* izolata pogrešno identifikovanih kao *S. sonnei* (Khot i Fisher, 2013).

Svih 80 sojeva *E. coli* izolovanih iz fecesa pasa uključenih u ovo istraživanje na SMAC agaru fermentisali su sorbitol, čime se pretpostavilo da nijedan od ovih sojeva ne pripada serotipu O157:H7 iz grupe EHEC, što je u saglasju s rezultatima istraživanja na trkačkim psima u Sjedinjenim Američkim Državama (McKenzie i sar., 2010). Nasuprot ovim nalazima, Yousif i saradnici prijavljuju da 23 (26,43%) izolata *E. coli* nije fermentisalo sorbitol, a za svega njih 7 lateks aglutinacijom je potvrđeno da pripadaju serotipu O157:H7 (Yousif i sar., 2016). U studiji iz Trinidada i Tobaga 7% *E. coli* izolovanih iz fecesa pasa nije fermentisalo sorbitol (Seepersadsingh i Adesiyun, 2009). U jednoj studiji sprovedenoj u Srbiji, od 446 ispitivanih STEC sojeva porijeklom od različitih izvora prijavljeno je 27,6% sojeva koji nijesu fermentisali sorbitol (Cobeljic i sar., 2005).

Od ukupno 80 sojeva *E. coli* izolovanih iz fecesa pasa u ovom istraživanju, njih 37 odnosno 46,25% pokazalo je hemolitičku aktivnost na krvnom agaru, od kojih je 13 izolata (16,25%) stvaralo β tip hemolize, dok je 24 (30%) stvaralo α tip hemolize. Ovaj rezultat u saglasju je s podatkom prijavljenim od strane Čobeljića i saradnika kod sojeva *E. coli* izolovanih od domaćih životinja u Srbiji pri čemu je 47,31% izolata imalo hemolitičku aktivnost (α hemoliza 25,8%, β hemoliza 21,5%) (Cobeljic i sar., 2005). Udio hemolitičkih izolata zabilježen u ovom istraživanju je veći od 34,62% i značajno veći od 4,3% koliko je prijavljeno kod *E. coli* izolovanih od pasa u studiji iz Egipta, odnosno Trinidada i Tobaga (Ali i Metwally, 2015; Seepersadsingh i Adesiyun, 2009). Iako hemolizin ne igra ulogu u patogenezi dijareje, izolati *E. coli* koji produkuju hemolizin prepoznati su kao uzročnici urogenitalnih infekcija kod ljudi. Nadalje, opsežne studije sprovedene na životinjskim modelima pokazale su da hemolizin pojačava virulenciju kod velikog broja ekstraintestinalnih infekcija (Aghemwenhio i sar., 2017; Bhakdi i sar., 1988; May i sar., 2000). Stoga visoka vrijednost prevalencije (36,63%) hemolitičkih izolata *E. coli* kod pasa, dobijena u ovom istraživanju, ima velikog značaja s aspekta javnog zdravlja uslijed bliskog kontakta ljudi i pasa i moguće transmisije ovih sojeva.

Izvođenjem lateks aglutinacionog testa, u ovom istraživanju, pripadnost serogrupi O157 nije utvrđena kod izolata *E. coli* izolovanih iz fecesa pasa, što je u saglasju s rezultatima istraživanja saopštenim u Iraku od strane Hamzah i saradnika, Sjedinjenim Američkim Državama od strane Jay-Russel i saradnika i Staatsa i saradnika i u Velikoj Britaniji od strane Sancaka i saradnika (Hamzah i sar., 2013; Jay-Russell i sar., 2014; Sancak i sar., 2004; Staats i sar., 2003). U još jednoj studiji iz Iraka, Yousif i saradnici kod pasa prijavljuju prevalenciju *E. coli* serotipa O157:H7 od 17,3%, upotrebom lateks aglutinacionog testa (Yousif i sar., 2016). U trogodišnjoj epidemiološkoj studiji u Japanu, koja je za cilj imala utvrđivanje stepena kliconoštva EHEC O157:H7 kod kućnih ljubimaca, metodom aglutinacije utvrđeno je prisustvo ovog serotipa u samo jednom uzorku fecesa (0,16%) koji je poticao od psa (Kataoka i sar., 2010). Primjenom istog dijagnostičkog metoda nalaz samo jednog STEC izolata serotipa O157:H7 prijavljen je i kod psa u Brazilu (Bentancor i sar., 2007). Takođe u Brazilu, serotipizacijom *E. coli* izolovanih iz fecesa štenaca starosti do 5 mjeseci, Nakazato i saradnici utvrdili su prevalenciju sojeva iz serogrupe O157 od 1,1%, a oba izolata pripadala su serotipu O157:H16 (Nakazato i sar., 2004). Letonija je Evropskoj agenciji za bezbjednost hrane 2013. godine kod pasa prijavila 6 izolata koji su pripadali serogrupi O157 (EFSA, 2015a). U Nigeriji serotip O157:H7 izolovan je iz 23,4% uzoraka fecesa klinički zdravih i pasa s dijarejom (Ojo. i sar., 2014). Prema dostupnoj literaturi, u Srbiji nema podataka o istraživanjima koja su za cilj imala ispitivanje prisustva sojeva *E. coli* iz serogrupe O157 kod pasa. Iako oskudni, dostupni su podaci o prevalenciji ove serogrupe kod goveda, pri čemu je u jednom istraživanju primjenom lateks aglutacionog testa kod goveda utvrđena prevalencija od 2,6% (Nastasijevic i sar., 2009). U drugoj studiji, direktnim aglutinacionim metodom dokazano je prisustvo O157 STEC sojeva kod 5 od 824 (0,61%) ispitane jedinke. U istom istraživanju, primjenom takođe direktnog aglutinacionog testa prisustvo STEC O157 nije utvrđeno kod svinja, koza, ovaca i kokošaka (Cobeljic i sar., 2005). Tokom 1993. godine na teritoriji Beograda sprovedeno je istraživanje koje je uključilo 2638 osobe s akutnom dijarejom, a od 7 izolata STEC nijedan nije dao pozitivnu reakciju aglutinacije s anti-O157 serumom (Cobeljic i sar., 1995). U drugoj domaćoj studiji koja je takođe uključivala uzorke fecesa porijeklom od ljudi, 1,3% izolata *E. coli* je pripadalo serogrupi O157 (Lazic i sar., 2006). Rezultat ove doktorske

disertacije i rezultati drugih istraživanja govore o niskoj prokuženosti populacija životinja i ljudi *E. coli* iz serogrupe O157 na teritoriji Srbije.

Metodom direktne aglutinacije, a upotrebom polivalentnog seruma, u ovom istraživanju utvrđeno je prisustvo 2 izolata koja pripadaju nekoj od serogrupa iz “velike šestorke” STEC (O26, O45, O103, O111, O121 i O145), čime prevalencija ovih *E. coli* u ispitivanoj populaciji iznosi 1,98%. Slično rezultatu ove studije istraživanje iz Brazila otkrilo je 2 (4%) izolata *E. coli* iz ove grupe STEC. Oba izolata pripadala su serograpi O103 (Puño-Sarmiento i sar., 2013). Od 24 soja izolovana u Njemačkoj od pasa sa simptomima gastroenteritisa, Prada i saradnici prijavili su 1 soj koji je pripadao serograpi O26 (Prada i sar., 1991). Istraživanje iz Velike Britanije otkrilo je takođe nisku prevalenciju STEC iz “velike šestorke” sa samo 1 izolatom od 57 koji je dao pozitivnu reakciju aglutinacije s anti-O26 serumom, a takođe jedan izolat iz iste serogrupe prijavljen je i kod psa u Egiptu (Ali i Metwally, 2015; Sancak i sar., 2004). Tokom 2013. godine Evropskoj agenciji za bezbjednost hrane od zemalja članica Evropske Unije jedino je Letonija prijavila izolaciju ovih zoonotskih STEC sojeva kod pasa, njih 6 i to 4 izolata koja su pripadala serograpi O103 i po 1 izolat iz serogrupa O26 i O121 (EFSA, 2015a). Tokom 2016. godine ovoj agenciji kod pasa je prijavljen 1 izolat iz serogrupe O103 i po 2 izolata iz serogrupa O26, O111 i O145 (EFSA, 2017). Uvidom u dostupnu literaturu nijesu nađeni podaci o izolaciji i serotipizaciji STEC kod pasa u Srbiji, te rezultati ovog istraživanja predstavljaju prvi nalaz tog tipa. Jedna studija iz Srbije uključivala je serotipizaciju *E. coli* izolovanih iz fecesa domaćih životinja (goveda, ovce, koze, svinje i kokoške) direktnim aglutinacionim metodom, serumima za serogrupe O26, O55, O111 i O128, pri čemu je samo 1 soj porijeklom od goveda pripadao serograpi O26 koja pripada “velikoj šestorki” STEC, dok nijedan izolat nije dao pozitivnu reakciju s anti-O111 serumom koji takođe pripada navedenim STEC (Cobeljic i sar., 2005). Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj studiji i rezultata drugih autora može se zaključiti da je prokuženost populacija pasa sojevima STEC iz “velike šestorke” niska.

U ovom istraživanju upotrebom monovalentnog seruma nije rađeno određivanje pripadnosti 2 pozitivna izolata egzaktnej serograpi iz “velike šestorke”, jer je naknadnom analizom PCR metodom utvrđeno da ovi izolati ne posjeduju gene za toksine (*stx1 stx2*). Ovakav nalaz može biti posljedica gubitka gena za toksine, što se često dešava tokom

rutinskog zasijavanja na hranljive podloge, pa čak i tokom prvog koraka supkultivacije STEC iz prirodno kontaminiranih uzoraka (Feng i sar., 2001; Joris i sar., 2011). Nadalje, PCR metodom nije utvrđeno niti da ova 2 izolata posjeduju *eae* gen, čime se isključuje i moguća serološka unakrsna reaktivnost sa serogrupom O126 iz grupe EPEC na koju upozorava proizvođač. Ipak, serološka reaktivnost s drugim serogrupama *E. coli* se ne može isključiti jer iako različiti antigeni mogu biti jedinstveni za određene serogrupe tako antigenske determinante mogu biti i zajedničke i dovesti do serološke unakrsne reaktivnosti s drugim serogrupama *E. coli*, ali i s drugim članovima porodice *Enterobacteriaceae* (Stenutz i sar., 2006). Poput rezultata dobijenih u ovoj studiji, ni kod jednog od izolata za koje je prethodno metodom aglutinacije utvrđeno da pripada nekoj od serogrupa O26, O103 ili O145 nije utvrđeno prisustvo gena za toksine (Jay-Russell i sar., 2014).

Izvođenjem VCA testa u ovom istraživanju utvrđeno je prisustvo 2 STEC izolata, pa je time u ukupnoj ispitivanoj populaciji pasa, prevalencija dobijena upotrebom ovog testa, iznosila 1,98%. Ovo je vrijednost prevalencije STEC veća od prevalencije prijavljene kod pasa u Njemačkoj, ali niža od prevalencije prijavljene kod pasa u Trinidadu i Tobagu, dobijenih takođe VCA testom. Prilikom ispitivanja 24 hemolizin-produkujuća soja *E. coli* izolovana u Njemačkoj od pasa s gastroenteritisom, na VCA testu ni za jedan od ovih sojeva nije utvrđeno da produkuju Stx, pa ni kod soja za koji je metodom hemaglutinacije utvrđeno da pripada EHEC iz serogrupe O26 (Prada i sar., 1991). Nasuprot tom nalazu, u Trinidadu i Tobagu je utvrđena produkcija Stx kod 13,3% izolata, odnosno ukupna prevalencija STEC utvrđena VCA testom kod pasa iznosila je 14,6% (Seepersadsingh i Adesiyun, 2009). Prva studija kojom je utvrđeno prisustvo STEC u Srbiji uključivala je uzorke fecesa porijeklom od ljudi, a korišćenjem VCA testa tada je utvrđena prevalencija STEC od 0,8% (Cobeljic i sar., 1995). U drugoj studiji sprovedenoj u Srbiji u kojoj su korišćeni uzorci fecesa porijeklom od više životinjskih vrsta, kao i uzorci hrane, citotoksični efekat, na Vero kulturi ćelija, kao posljedica produkcije Stx zabilježen je kod 446 (12,33%) od 3616 ispitanih uzoraka (Cobeljic i sar., 2005).

U ovoj studiji, nakon urađene molekularne dijagnostike primjenom konvencionalnog PCR metoda za *stx* gene, zapažena je diskrepanca između tih i rezultata

dobijenih VCA testom. Ni kod jednog od dva izolata kod kojih je VCA testom utvrđena produkcija toksina primjenom PCR metoda nije utvrđeno postojanje gena za Stx, niti je VCA testom utvrđeno da izolat kod koga je primjenom PCR testa nađen *stx2* gen produkuje toksin. Ovakvi rezultati nisu u saglasnosti s rezultatima istraživanja objavljenom od strane Hammermuellera i saradnika u kom su rezultati VCA testa korespondirali rezultatima PCR testa u svakom od slučajeva kada su ova testa bila primijenjena na istoj kulturi (Hammermueller i sar., 1995). Zhang i saradnici dokazali su da STEC koje posjeduju *stx2* genske varijante produkuju Stx u količinama ispod nivoa koji je detektabilan konvencionalnim metodima, što može biti objašnjenje za negativan nalaz izolata pozitivnom na PCR testu za *stx2* (Zhang i sar., 2005). Takođe, niska specifičnost korišćenih *stx* prajmera uslijed postojanja različitih genskih varijanti *stx* može biti razlog negativnog rezultata u ovom istraživanju, dobijenog primjenom konvencionalnog multipleks PCR metoda kod sojeva pozitivnih na VCA testu. Tako Kumar i saradnici ističu da je primjenom drugih prajmerskih parova za gene produkcije Stx utvrđeno prisustvo ovih gena kod sojeva koji su na prethodnom multipleks PCR testu bili negativni, ali kod kojih je primjenom VCA i ELISA testova detektovana produkcija Stx (Kumar i sar., 2004). Nadalje, lažno negativni rezultati mogu biti izazvani supstancama u uzorku koje inhibiraju DNK polimerazu (Altwegg, 1995; Wiczorek i Osek, 2004).

Primjenom ELISA testa kod 6 od 80 izolata dobijenih iz fecesa pasa u ovom istraživanju utvrđena je produkcija Stx, što u ukupnoj ispitivanoj populaciji pasa čini prevalenciju STEC od 5,94%. U studiji iz Sjedinjenih Američkih Država Stx su nađeni u znatno većem procentu i to 32% uzoraka koji su poticali od klinički zdravih pasa i pasa s dijarejom (Staats i sar., 2003). Naknadnim ispitivanjem *E. coli* izolata, primjenom konvencionalnog PCR metoda, ni kod jednog od 6 izolata koji su dali pozitivnu reakciju na ELISA testu, nije utvrđeno da posjeduju gene za produkciju toksina. Takođe, zabilježena je i potpuno nepoklapanje rezultata ELISA testa s rezultatima VCA testa. Slično rezultatima ovog istraživanja Staats i saradnici prijavljuju veliki broj pozitivnih uzoraka u kojima je ELISA testom utvrđeno prisustvo Stx, ali u kojima nije mPCR metodom utvrđeno prisustvo *stx* gena. Takvih uzoraka je bilo čak 24 od ukupno 44 (Staats i sar., 2003). Postojanje unakrsno-reaktivnih epitopa na non-Stx proteinima može

objasniti pojavu lažno pozitivnih rezultata na ELISA testu (Paton i Paton, 1998; Willford i sar., 2009). Nasuprot prethodno objašnjenom nalazu izolat 24 za koji je utvrđeno da posjeduje gen za *stx2* dao je negativnu reakciju na ELISA testu. Ovakav rezultat može se javiti uslijed odsustva ekspresije gena za toksin, ili produkcijom male količine toksina koji ne mogu biti detektibilni serološkim testovima. Međutim, drugo objašnjenje za diskrepancu u rezultatima mogu biti razlike u specifičnosti anti-Stx antitijela i *stx* prajmera za različite tipove Stx (Feng i sar., 2011). Pojava lažno pozitivnih rezultata na ELISA testu može dovesti do pogrešne dijagnoze, te ukazuje na neophodnost kulturelne potvrde Stx-pozitivnih uzoraka (Centers for Disease i Prevention, 2006).

U ovom istraživanju primjenom konvencionalnog PCR metoda geni za produkciju Stx nađeni su u 5 uzoraka fecesa, što predstavlja ukupnu prevalenciju STEC od 4,95%. U svih 5 (4,95%) uzoraka evidentirano je prisustvo *stx2* gena, dok je gen *stx1* nađen u dvoma (1,98%) uzorcima. Kako je uz gene za toksin kod 3 uzorka ustanovljen i *eae* gen tako su ova 3 uzorka okarakterisana kao EHEC, a prevalencija *E. coli* iz ove grupe iznosila je 2,97%. Nadalje, u 14 uzoraka nađen je samo *eae* gen, te je ukupna prevalencija EPEC iznosila 13,86%. Slično rezultatima ove studije, sojevi STEC, od kojih su svi posjedovali *stx2* gen, izolovani su od 5 (1,1%) pasa u istraživanju iz Argentine od kojih je samo jedan posjedovao i gen za intimin te time označen kao EHEC (Bentancor i sar., 2007). Sličan rezultat prijavljen je i u jednom istraživanju iz Njemačke u koje su bili uključeni samo psi bez ikakvih kliničkih simptoma. Naime prijavljena su 3 izolata STEC, što predstavlja prevalenciju od 4,8%, od kojih su sva tri izolata posjedovala *stx2* gen, dok je jedan posjedovao *stx1* gen (Beutin i sar., 1993). Vrijednost prevalencije STEC u ovoj studiji u saglasnosti je i s rezultatima studije iz Irana u kojoj je kod pasa prijavljena vrijednost prevalencije STEC od 4% i prevalenciju EHEC od 2% (Salehi i sar., 2011). U Kanadi Hammermueller i saradnici kod *E. coli* izolovanih iz fecesa pasa s dijarejom prijavljuju u većem procentu nalaz gena za toksine, pa je tako *stx1* gen nađen kod 8,9% i *stx2* kod 22,2% izolata. U istom istraživanju za razliku od rezultata ove studije kod *E. coli* izolovanih od zdravih pasa evidentirano je posjedovanje samo *stx1* gena i to kod 12,3% izolata (Hammermueller i sar., 1995). Nekoliko istraživanja u Brazilu fokusiralo se na ispitivanje STEC kod pasa, s velikom razlikom u vrijednostima prevalencije. U jednoj od studija u koju su bili uključeni i klinički zdravi i

psi s dijarejom ni kod jednog izolata *E. coli* nije utvrđeno prisustvo gena za produkciju toksina (Nakazato i sar., 2004). Druga studija iz Brazila otkrila je u 1 od 101 ispitanog uzorka fecesa psa (0,99%) oba gena za Stx kao i gen za intimin (Almeida i sar., 2012). Nadalje, Coura i saradnici prijavili su 2 izolata STEC od kojih su oba nosila *stx2* gen (Coura i sar., 2018). Takođe u Brazilu de Paula i Marin prijavili su visoku prevalenciju STEC od 40% kod pasa s dijarejom, pri čemu nijedan izolat nije posjedovao oba gena za toksin, a STEC s *stx1* genom bile su zastupljenije (Paula i Marin, 2008). Torkan i saradnici u Iranu prijavili su nalaz od 18,57% STEC kod pasa s dijarejom. Većina tih izolata posjedovala *stx1* gen, a njih 7 je uz gene za toksin posjedovalo i *eae* gen čime je prevalencija EHEC iznosila 10% (Torkan i sar., 2016). U Sjedinjenim Američkim Državama, u istraživanju u koje su bili uključeni hrtovi, *stx1* gen je bio prisutan u 3% nedijaroičnih i 15% dijaroičnih uzoraka, dok je *stx2* gen nađen u 36 i 23% nedijaroičnih, odnosno dijaroičnih uzoraka (Staats i sar., 2003). Nasuprot tome, u drugoj studiji iz Sjedinjenih Američkih Država svi izolati *E. coli* bili su negativni na prisustvo gena za Stx, kao i u studiji iz Egipta koja je uključivala samo pse s dijarejom (Ali i Metwally, 2015; Jay-Russell i sar., 2014). Nadalje, u još jednoj američkoj studiji Turk i saradnici ni kod jednog od izolata koji su poticali od uginulih pasa, a koji su imali dijareju, nijesu utvrdili prisustvo *stx1* ili *stx2* gena (Turk i sar., 1998). Kod pasa u Argentini Zotta i saradnici, nasuprot nalazu koji su ranije prijavili Bentancor i saradnici, nijesu detektovali gene za produkciju toksina u uzorcima fecesa (Bentancor i sar., 2007; Zotta i sar., 2015).

Nalaz EPEC kod 13,86% pasa u saglasju je s rezultatima prevalencije EPEC kod pasa u trima studijama u Brazilu prijavljenim od strane Puño-Sarmienta i saradnika (11,81%), Nakazatoa i saradnika (12,6%) i Coure i saradnika (14,9%) (Coura i sar., 2018; Nakazato i sar., 2004; Puño-Sarmiento i sar., 2013). Sličnu prevalenciju (16,39%) u Sjedinjenim Američkim Državama prijavili su Turk i saradnici kod pasa s dijarejom (Turk i sar., 1998). Bentancor i saradnici prijavili su znatno nižu prevalenciju EPEC kod pasa u Argentini koja je iznosila 2,66% (Bentancor i sar., 2007). Još jedna studija iz Brazila pokazala je ipak znatno veću prevalenciju EPEC u populaciji pasa. Naime, *eae* gen za intimin nađen je u 46,5% uzoraka fecesa (Almeida i sar., 2012). U jednoj studiji iz Irana svi izolati koji su posjedovali *eae* gen posjedovali su i gene za produkciju toksina te

su time svrstani u grupu EHEC, dok je prevalencija EPEC u ispitivanoj populaciji pasa iznosila 0% (Torkan i sar., 2016). Druga studija iz Irana pak prijavljuje prevalenciju EPEC od 6% (Salehi i sar., 2011)

Analizom podataka dobijenih u ovom istraživanju, odnosno poređenjem prevalencija STEC između grupe pasa s dijarejom i grupe klinički zdravih pasa, utvrđeno je da iako je povećana vjerovatnoća nastanka dijareje kod pasa kod kojih je evidentirano prisustvo STEC, ovaj nalaz nema statistički značaj. Dobijeni nalaz u saglasnosti je s zapaženjem Beutina, koji na osnovu rezultata nekoliko istraživanja i podjednake vrijednosti prevalencija STEC kod asimptomatskih i jedinki s dijarejom, ovu grupu patogenih *E. coli* ne dovodi u vezu s dijarejom kod pasa (Beutin, 1999). Nadalje, STEC u vezu s dijarejom ne dovode ni Bentancor i saradnici, ali ni Turk i saradnici koji kod pasa uginulih od dijareje nijesu detektovali prisustvo *E. coli* izolata koji su posjedovali gene za Stx, ali jesu oni koji posjedovali *eae* gen (Bentancor i sar., 2007; Turk i sar., 1998). Da pojava dijareje ne povećava vjerovanoću izolacije serotipa O157:H7 kao najznačajnije STEC smatraju Kataoka i saradnici (Kataoka i sar., 2010). Istog su mišljenja i Ojo i saradnici, a svoje zapažanje potkrepljuju rezultatima eksperimentalne oralne administracije psima izolata porijeklom od ljudi, pri čemu nijesu zabilježeni znaci intestinalne kolonizacije, ali jesu nađene vijabilne bakterije u fecesu ovih životinja nekoliko dana nakon administracije (Kusunoki i sar., 2004; Ojo i sar., 2014). Nasuprot ovim nalazima, na osnovu neznatno većih prevalencija STEC u populaciji pasa s dijarejom u odnosu na klinički zdrave pse, određene grupe istraživača navode pozitivnu korelaciju između STEC i nastanka dijareje (Hammermueller i sar., 1995; Salehi i sar., 2011; Staats i sar., 2003). Međutim dok Staats i saradnici *E. coli* izolate koji posjeduju *stx1* dovode u vezu s dijarejom kod pasa, Hammermueller i saradnici Stx2-produkujuće sojeve povezuju s nastankom dijareje (Hammermueller i sar., 1995; Staats i sar., 2003). Iako u ovom istraživanju nije utvrđeno da STEC dovode do pojave dijareje kod pasa, interesantno je napomenuti da su kod oba dijarojična uzorka u kojima je utvrđeno njihovo prisustvo nađeni *stx2* i *eae* gen. Generalno govoreći, pored toga što pojedini sojevi STEC mogu izazvati infekcije kod životinja, naročito onih mlađe starosne dobi, ova grupa patogenih *E. coli* u većem procentu se nalazi kod asimptomatskih jedinki (Adamu i sar., 2016; Daly i Hill, 2016). Prisustvo STEC kod klinički zdravih jedinki u ovoj studiji

ukazuje na to da psi mogu biti asimptomatski nosioci STEC, te da iako zbog niske prevalencije ne mogu biti označeni kao rezervoar STEC mogu biti svojevrsan vektor za zoonotsku transmisiju ovih uzročnika.

Mali je broj studija o STEC kod pasa imao za cilj utvrđivanje veze između različitih epidemioloških faktora i kliconoštva. Takva veza u ovom istraživanju nije utvrđena između starosne dobi psa i prisustva STEC, a ovakav rezultat u saglasnosti je s rezultatom Coure i saradnika (Coura i sar., 2018). Isto zapažanje prijavili su i Younis i saradnici, ali na studiji koja se bazirala samo na ispitivanju STEC O157:H7 soja, dok Bentancor i saradnici prijavljuju značajno veću prevalenciju STEC kod pasa mlađih od 2 godine (Bentancor i sar., 2007; Younis i sar., 2015). Analizom podataka dobijenih u ovom istraživanju nije utvrđena ni veza između pola pasa i kliconoštva, a takvog mišljenja su i drugi autori (Bentancor i sar., 2007; Coura i sar., 2018; Younis i sar., 2015). Međutim rezultati ovog istraživanja ukazuju na statistički značajne razlike u prevalenciji STEC u odnosu na stil života psa. Značajno veća prevalencija ovog patotipa *E. coli* zabilježena je kod pasa lotalica u odnosu na vlasničke pse držane u kući i pse držane u dvorištu. Statistički značajne razlike u prevalenciji STEC među ovim dvijema grupama vlasničkih pasa nijesu zabilježene. Kao i u ovoj studiji Salehi i saradnici ne nalaze razlike u prevalenciji među psima držanim u kući i psima držanim u dvorištu, dok za razliku od nalaza ove studije Seepersadsingh i Adesiyun ne nalaze razlike u prevalenciji STEC među psima lotalicama i psima držanim u kući (Seepersadsingh i Adesiyun, 2009). Nadalje, u jednoj studiji u Sjedinjenim Američkim Državama iz uzoraka fecesa pasa lotalica STEC ipak nijesu bile izolovane (Jay-Russell i sar., 2014). Objašnjenje za veću prevalenciju STEC koda pasa lotalica u poređenju s vlasničkim psima u ovom istraživanju leži u činjenici da način ishrane svakako utiče na sastav mikroflore, te da ove životinje nemaju ograničenje kretanja čime su češće u kontaktu s kontaminiranom hranom i vodom kao izvorima STEC.

Kako je većina prepoznatih mehanizama rezistencije detektovana kod *E. coli* time je ona koristan organizam u monitoringu antimikrobne osjetljivosti kod pasa i drugih vrsta, ali i jedan od ključnih izvora gena antimikrobne rezistencije koji se na druge patogene bakterije mogu prenijeti mehanizmima horizontalnog transfera (Cummings i sar., 2015).

U ovom istraživanju kod *E. coli* izolovanih iz fecesa pasa utvrđena je rezistencija na sljedeće antibiotike: ampicilin (22,5%), amoksicilin s dodatkom klavulanske kiseline (8,5%), cefuroksim (8,5%), sulfametoksazol s dodatkom trimetoprima (7,5%), ciprofloksacin (7,5%) i ceftriakson (2,5%). Svi ispitani izolati bili su osjetljivi na gentamicin. Jedan izolat bio je umjereno do potpuno rezistentan na sve navedene antibiotike osim gentamicina i kao takav proglašen multirezistentnim te podvrgnut ispitivanju antibiotske osjetljivosti na dodatne antibiotike. Ovaj izolat zatim je ispoljio rezistenciju na streptomycin i nalidiksičnu kiselinu, dok je bio osjetljiv na ceftazidim, cefotaksim, amikacin i tobramicin.

Prema dostupnim podacima, u Srbiji u samo jednoj studiji ispitana je antimikrobna osjetljivost *E. coli* izolata porijeklom od pasa. U ispitivanje je bilo uključeno svega 5 izolata, a prijavljen je jedan multirezistentan izolat koji je bio rezistentan na 7 od 9 ispitivanih antibiotika. Kao i u ovoj doktorskoj disertaciji prijavljena je rezistencija na antibiotike iz grupe penicilina, pri čemu najveći procenat na ampicilin u odnosu na sve korišćene antibiotike, zatim na sulfametoksazol s dodatkom trimetoprima kao i na ciprofloksacin. Prijava osjetljivosti na gentamicin, kao i rezistencije svih izolata na ceftriakson nije u skladu s rezultatima ove doktorske disertacije (Gavrović i sar., 2011). Gledano u odnosu na grupe antibiotika korišćene u ovom istraživanju, rezultati drugih autora u svijetu ukazuju na to da su najveći stepen rezistencije *E. coli* izolovane iz fecesa pasa, kao i u ovom istraživanju razvile na peniciline, pri čemu u najvećem stepenu na ampicilin. Procenat izolata rezistentnih na ampicilin i amoksicilin s dodatkom klavulanske kiseline dobijen u ovom istraživanju u saglasnosti je s rezultatima objavljenim od strane jednog broja autora, dok su ove vrijednosti niže od onih prijavljenih kod *E. coli* izolovanih iz fecesa pasa u Portugaliji i Južnoj Koreji, ali i značajno niže od onih prijavljenih Poljskoj, te Brazilu u kome je prijavljeno čak 85,7% izolata rezistentnih na ampicilin (Carvalho i sar., 2016; Costa i sar., 2008; Cummings i sar., 2015; Murphy i sar., 2009; Nam i sar., 2010; Pedersen i sar., 2007; Rzewuska i sar., 2015; Wedley i sar., 2017).

Nalaz niskog stepena rezistencije izolata *E. coli* na antibiotike iz grupe cefalosporina, u saglasnosti je s rezultatima istraživanja objavljenih kod pasa u Velikoj Britaniji, Portugaliji, Kanadi i Danskoj (Costa i sar., 2008; Murphy i sar., 2009; Pedersen i sar.,

2007; Wedley i sar., 2017). Dvije grupe istraživača, jedna kod pasa u Brazilu i druga u Sjedinjenim Američkim Državama pak prijavljuju značajno veći procenat izolata rezistentnih na ovu grupu antibiotika, s najvećom rezistencijom na cefaleksin (33,3%) kod pasa u Brazilu (Carvalho i sar., 2016; Cummings i sar., 2015).

Nizak procenat rezistencije na fluorohinolone, odnosno na ciprofloksacin kao predstavnika ove grupe antibiotika dobijen u ovom istraživanju, u saglasnosti je s rezultatima drugih studija (Carvalho i sar., 2016; Costa i sar., 2008; Rzewuska i sar., 2015; Wedley i sar., 2017). Nasuprot ovim nalazima, Pedersen i saradnici kod pasa u Danskoj, kao i Murphy i saradnici kod pasa u Kanadi ne nalaze izolate rezistentne na ovaj antibiotik (Murphy i sar., 2009; Pedersen i sar., 2007).

Sulfometaksazol s dodatkom tripetoprima u ovoj studiji korišćen je kao pokazatelj rezistencije *E. coli* na sulfonamide, a zapaženi nizak procenat rezistentnih izolata u saglasnosti je s istraživanjima iz Portugalije i Kanade, dok su drugi autori prijavili veći procenat rezistentnih izolata kod pasa u Sjedinjenim Američkim Državama, Južnoj Koreji, Brazilu, Portugaliji, Velikoj Britaniji, te Poljskoj u kojoj je taj procenat dostigao 39,9% (Carvalho i sar., 2016; Costa i sar., 2008; Cummings i sar., 2015; Murphy i sar., 2009; Nam i sar., 2010; Rzewuska i sar., 2015; Wedley i sar., 2017).

Nijedan od *E. coli* izolata u ovoj studiji, kao i u studiji Coste i saradnika u Portugalu, nije ispoljio rezistenciju na gentamicin koji je služio kao pokazatelj rezistencije na aminoglikozide (Costa i sar., 2008). Nalaz jednog izolata rezistentnog na gentamicin, te time i veoma niska rezistencija, prijavljeni su kod pasa u Danskoj i Kanadi, dok autori nekoliko studija kod pasa u Brazilu, Sjedinjenim Američkim Državama, Poljskoj i Južnoj Koreji prijavljuju značajno veći procenat genatmicin rezistentnih izolata koji se kretao i do 68,1% (Carvalho i sar., 2016; Cummings i sar., 2015; Murphy i sar., 2009; Nam i sar., 2010; Pedersen i sar., 2007; Rzewuska i sar., 2015).

Dokazi o dijeljenju klonova *E. coli* s istim šablonima antibiotske rezistencije između pasa i njihovih vlasnika ukazuje na međuspecijsku transmisiju, odnosno rizik po ljude za sticanje rezistentnih izolata od pasa, ali i obratno (Stenske i sar., 2009). Stoga, nalaz *E. coli* izolata rezistentnih na jedan ili više korišćenih antibiotika u ovom

istraživanju ne samo da ima značaj za terapijski pristup u kliničkoj praksi malih životinja, već ima značaj i s aspekta javnog zdravlja u Srbiji.

8. ZAKLJUČCI

Na osnovu sprovedenog istraživanja izvučeni su sljedeći zaključci:

1. Dokazano je prisustvo STEC u populaciji pasa u Vojvodini, odnosno Republici Srbiji. Primjenom VCA metoda ustanovljena je prevalencija od 1,98%, dok je primjenom ELISA i PCR metoda ustanovljena prevalencija od 5,94% odnosno 4,95%. Evidentna diskrepanca u prevalencijama posljedica je razlika u osjetljivosti i specifičnosti primijenjenih metoda, što ukazuje na i dalje neophodnu kulturnu potvrdu Stx-pozitivnih uzoraka.
2. Utvrđena je statistički značajna veza između stila života psa i kliconoštva. Značajno veća prevalencija STEC, u odnosu na vlasničke pse, zabilježena je kod pasa lualica, što je vjerovatno posljedica neograničene slobode kretanja i time i češćeg kontakta s kontaminiranom hranom i vodom kao izvora STEC.
3. U ispitivanoj populaciji pasa dokazano je prisustvo EHEC izolata koji se dovode u vezu s ozbiljnim oboljenjima ljudi poput hemoragičnog kolitisa i hemolitičko uremijskog sindroma. Nalaz ovog istraživanja ukazuje na to da psi mogu predstavljati izvor oboljenja za ljude u Republici Srbiji.
4. U ispitivanoj populaciji pasa utvrđeno je prisustvo sojeva *E. coli* rezistentnih na jedan ili više korišćenih antibiotika, kao i jednog multirezistentnog soja, što je značajno s aspekta javnog zdravlja u Republici Srbiji uslijed bliskog kontakta pasa i ljudi i moguće međuspecijske transmisije rezistentnih sojeva.

9. LITERATURA

1. Adamu, M.S., Kubkomawa, I.H., A., A., Abubakar, N.S., 2016. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from farm animals and humans in tropical africa - a review. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine* 1, 1-28.
2. Agger, M., Scheutz, F., Villumsen, S., Molbak, K., Petersen, A.M., 2015. Antibiotic treatment of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) infection: a systematic review and a proposal. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70, 2440-2446.
3. Aghemwenhio, I.S., Timilenih, A.A., Alpheus, G.A., 2017. Susceptibility of Beta-Haemolytic *Escherichia coli* to Commonly Used Antibiotics in Selected Hospitals in Delta State, Southern Nigeria. *Archives of Clinical Microbiology* 8, 1-4.
4. Ahmed, L.N., Price, L.B., Graham, J.P., 2015. An exploratory study of dog park visits as a risk factor for exposure to drug-resistant extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC). *BMC Research Notes* 8, 137.
5. Ali, D.H., Metwally, A., 2015. Characterization of enteropathogenic *E. coli* and antibiotic resistance properties in diarrheic pets. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences* 45, 99-104.
6. Allen, K.J., Rogan, D., Finlay, B.B., Potter, A.A., Asper, D.J., 2011. Vaccination with type III secreted proteins leads to decreased shedding in calves after experimental infection with *Escherichia coli* O157. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire* 75, 98-105.
7. Almeida, P.M.P.d., Arais, L.R., Andrade, J.R.C., Prado, E.H.R.B., Irino, K., Cerqueira, A.d.M.F., 2012. Characterization of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) isolated from dogs. *Veterinary Microbiology* 158, 420-424.
8. Altwegg, M., 1995. General problems associated with diagnostic applications of amplification methods. *Journal of Microbiological Methods* 23, 21-30.
9. Ašanin, R., Žutić, M., Ašanin, J., Mišić, D., Žutić, J., Jakić-Dimić, D., Milić, N., Nišavić, J., 2009. Ispitivanje prisustva novih oblika rezistencije na neke antibiotike kod sojeva *E. coli* izolovanih od prasadi. *Veterinarski glasnik* 63, 311-320.
10. Asper, D.J., Karmali, M.A., Townsend, H., Rogan, D., Potter, A.A., 2011. Serological response of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* type III secreted proteins in sera from vaccinated rabbits, naturally infected cattle, and humans. *Clinical and Vaccine Immunology* 18, 1052-1057.

11. Azadi, R., Calabrese, K., Stroup, J., 2010. Hemolytic uremic syndrome caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111. *The Journal of the American Osteopathic Association* 110, 538-544.
12. Ball, H.J., Finlay, D., Zafar, A., Wilson, T., 1996. The detection of verocytotoxins in bacterial cultures from human diarrhoeal samples with monoclonal antibody-based ELISAs. *Journal of Medical Microbiology* 44, 273-276.
13. Batt, R.M., Rutgers, H.C., Sancak, A.A., 1996. Enteric bacteria: friend or foe? *The Journal of Small Animal Practice* 37, 261-267.
14. Bell, B.P., Griffin, P.M., Lozano, P., Christie, D.L., Kobayashi, J.M., Tarr, P.I., 1997. Predictors of hemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Pediatrics* 100, E12.
15. Bentancor, A., Rumi, M.V., Carbonari, C., Gerhardt, E., Larzabal, M., Vilte, D.A., Pistone-Creydt, V., Chinen, I., Ibarra, C., Cataldi, A., Mercado, E.C., 2012. Profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats and genetic relationships with isolates from cattle, meat and humans. *Veterinary Microbiology* 156, 336-342.
16. Bentancor, A., Rumi, M.V., Gentilini, M.V., Sardoy, C., Irino, K., Agostini, A., Cataldi, A., 2007. Shiga toxin-producing and attaching and effacing *Escherichia coli* in cats and dogs in a high hemolytic uremic syndrome incidence region in Argentina. *FEMS Microbiology Letters* 267, 251-256.
17. Beutin, L., 1999. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Veterinary Research* 30, 285-298.
18. Beutin, L., Geier, D., Steinruck, H., Zimmermann, S., Scheutz, F., 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 2483-2488.
19. Bhakdi, S., Mackman, N., Menestrina, G., Gray, L., Hugo, F., Seeger, W., Holland, I.B., 1988. The hemolysin of *Escherichia coli*. *European Journal of Epidemiology* 4, 135-143.
20. Bizzini, A., Greub, G., 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clinical Microbiology and Infection* 16, 1614-1619.
21. Blagojevic, B., Antic, D., Ducic, M., Buncic, S., 2012. Visual cleanliness scores of cattle at slaughter and microbial loads on the hides and the carcasses. *The Veterinary Record* 170, 563.
22. Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, M.P., Gonzalez, E.A., Bernardez, M.I., Blanco, J., 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*iae-xi*). *Journal of Clinical Microbiology* 42, 645-651.
23. Brunder, W., Khan, A.S., Hacker, J., Karch, H., 2001. Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H(-). *Infection and Immunity* 69, 4447-4457.
24. Bryan, A., Youngster, I., McAdam, A.J., 2015. Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. *Clinics in Laboratory Medicine* 35, 247-272.

25. Byrne, L., Jenkins, C., Launders, N., Elson, R., Adak, G.K., 2015. The epidemiology, microbiology and clinical impact of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in England, 2009-2012. *Epidemiology and Infection* 143, 3475-3487.
26. Caprioli, A., Scavia, G., Morabito, S., 2014. Public Health Microbiology of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum* 2, 1-12.
27. Carvalho, A.C., Barbosa, A.V., Arais, L.R., Ribeiro, P.F., Carneiro, V.C., Cerqueira, A.M., 2016. Resistance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of *Escherichia coli* from dogs and owners. *Brazilian Journal of Microbiology* 47, 150-158.
28. Castro, V.S., Carvalho, R.C.T., Conte Junior, C.A., Figueiredo, E.E.S., 2017. Shiga toxin producing *Escherichia coli*: Pathogenicity, supershedding, diagnostic methods, occurrence, and foodborne outbreaks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16, 1269-1280.
29. Centers for Disease, C., Prevention, 2006. Importance of culture confirmation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection as illustrated by outbreaks of gastroenteritis--New York and North Carolina, 2005. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 55, 1042-1045.
30. Chandran, A., Mazumder, A., 2013. Prevalence of diarrhea-associated virulence genes and genetic diversity in *Escherichia coli* isolates from fecal material of various animal hosts. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 7371-7380.
31. Cherkaoui, A., Hibbs, J., Emonet, S., Tangomo, M., Girard, M., Francois, P., Schrenzel, J., 2010. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 1169-1175.
32. Choi, K.S., Kim, S.H., Kim, E.D., Lee, S.H., Han, S.J., Yoon, S., Chang, K.T., Seo, K.Y., 2014. Protection from hemolytic uremic syndrome by eyedrop vaccination with modified enterohemorrhagic *E. coli* outer membrane vesicles. *PloS One* 9, e100229.
33. Cinquepalmi, V., Monno, R., Fumarola, L., Ventrella, G., Calia, C., Greco, M.F., Vito, D., Soleo, L., 2013. Environmental contamination by dog's faeces: a public health problem? *International journal of environmental research and public health* 10, 72-84.
34. CLSI, 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
35. Cobeljic, M., Bojic, I., Opacic, D., Lepsanovic, Z., Lazic, S., 2003. First documented case of enterocolitis in Yugoslavia caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Vojnosanitetski pregled* 60, 493-496.
36. Cobeljic, M., Dimic, B., Opacic, D., Lepsanovic, Z., Stojanovic, V., Lazic, S., 2005. The prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in domestic animals and food in Serbia. *Epidemiology and Infection* 133, 359-366.
37. Cobeljic, M., Lepsanovic, Z., Velimirovic, S., 1995. Infrequent finding of verotoxin-producing *Escherichia coli* in diarrheal stools in Belgrade, Serbia. *Scandinavian journal of infectious diseases* 27, 427-428.

38. Costa, D., Poeta, P., Saenz, Y., Coelho, A.C., Matos, M., Vinue, L., Rodrigues, J., Torres, C., 2008. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. *Veterinary Microbiology* 127, 97-105.
39. Coura, F.M., Diniz, A.N., Oliveira Junior, C.A., Lage, A.P., Lobato, F.C.F., Heinemann, M.B., Silva, R.O.S., 2018. Detection of virulence genes and the phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil. *Ciência Rural* 48, 1-6.
40. Cowan, S.T., 1954. A review of names for coliform organisms. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy* 4, 119-124.
41. Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M., Finlay, B.B., 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 26, 822-880.
42. Cummings, K.J., Aprea, V.A., Altier, C., 2015. Antimicrobial resistance trends among canine *Escherichia coli* isolates obtained from clinical samples in the northeastern USA, 2004-2011. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne* 56, 393-398.
43. Daly, R.F., Hill, N.T., 2016. Characterizing the role of animal exposures in Cryptosporidiosis and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections: South Dakota, 2012. *Zoonoses and Public Health* 63, 467-476.
44. De Boer, E., Heuvelink, A.E., 2000. Methods for the detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Symposium series*, 133S-143S.
45. Dean, A.G, Sullivan, K.M., Soe, M.M. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version. www.OpenEpi.com, updated 2013/04/06, accessed 2017/11/14.
46. Doughty, S., Sloan, J., Bennett-Wood, V., Robertson, M., Robins-Browne, R.M., Hartland, E.L., 2002. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 70, 6761-6769.
47. EFSA, 2009. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. *EFSA Journal*, 223.
48. EFSA, 2010. The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal* 8, 1496.
49. EFSA, 2011. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA Journal* 9, 2090.
50. EFSA, 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal* 10, 2597.
51. EFSA, 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 11, 3129.
52. EFSA, 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 12, 3547.

53. EFSA, 2015a. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 13, 3991.
54. EFSA, 2015b. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 13, 4329.
55. EFSA, 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal* 14, 4634.
56. EFSA, 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 15, 5077.
57. Escherich, T., 1988. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1884. *Reviews of infectious diseases* 10, 1220-1225.
58. Etcheverria, A.I., Padola, N.L., 2013. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization. *Virulence* 4, 366-372.
59. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Version_5/Manual_v_6.0_EUCAST_Disk_Test_final.pdf (accessed 1 September 2017).
60. Fadel, H.M., Afifi, R., Al-Qabili, D.M., 2017. Characterization and zoonotic impact of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in some wild bird species. *Veterinary World* 10, 1118-1128.
61. Fairman, J.W., Dautin, N., Wojtowicz, D., Liu, W., Noinaj, N., Barnard, T.J., Udho, E., Przytycka, T.M., Cherezov, V., Buchanan, S.K., 2012. Crystal structures of the outer membrane domain of intimin and invasins from enterohemorrhagic *E. coli* and enteropathogenic *Y. pseudotuberculosis*. *Structure* 20, 1233-1243.
62. Farfan, M.J., Torres, A.G., 2012. Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infection and Immunity* 80, 903-913.
63. Feng, P., Dey, M., Abe, A., Takeda, T., 2001. Isogenic strain of *Escherichia coli* O157:H7 that has lost both Shiga toxin 1 and 2 genes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8, 711-717.
64. Feng, P.C., Jinneman, K., Scheutz, F., Monday, S.R., 2011. Specificity of PCR and serological assays in the detection of *Escherichia coli* Shiga toxin subtypes. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 6699-6702.
65. Fratamico, P.M., DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D.S., Baranzoni, G.M., Feng, P., 2016. Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology* 7, 644.
66. Fujii, J., Naito, M., Yutsudo, T., Matsumoto, S., Heatherly, D.P., Yamada, T., Kobayashi, H., Yoshida, S., Obrig, T., 2012. Protection by a recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin vaccine expressing Shiga toxin 2 B subunit against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in mice. *Clinical and Vaccine Immunology* 19, 1932-1937.

67. Garcia, A., Fox, J.G., Besser, T.E., 2010. Zoonotic enterohemorrhagic *Escherichia coli*: A One Health perspective. *ILAR Journal* 51, 221-232.
68. Garred, O., van Deurs, B., Sandvig, K., 1995. Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 10817-10821.
69. Gavrovic, M., Asanin, R., Misić, D., Jezdimirovic, M., Zutić, M., 2011. Investigation of the sensitivity of *E. coli* strains isolated from domestic animals to antibiotics and hemiotherapeutics in vitro. *Acta Veterinaria-Beograd* 61, 21-31.
70. Gavrović, M., Ašanin, R., Mišić, D., Jezdimirović, M., Žutić, M., 2011. Investigation of the sensitivity of *E. coli* strains isolated from domestic animals to antibiotics and hemiotherapeutics in vitro. *Acta Veterinaria-Beograd* 61, 21-31.
71. Gomes, T.A., Elias, W.P., Scaletsky, I.C., Guth, B.E., Rodrigues, J.F., Piazza, R.M., Ferreira, L.C., Martinez, M.B., 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology* 47, 3-30.
72. Gould, L.H., Bopp, C., Strockbine, N., Atkinson, R., Baselski, V., Body, B., Carey, R., Crandall, C., Hurd, S., Kaplan, R., Neill, M., Shea, S., Somsel, P., Tobin-D'Angelo, M., Griffin, P.M., Gerner-Smidt, P., Centers for Disease, C., Prevention, 2009. Recommendations for diagnosis of shiga toxin--producing *Escherichia coli* infections by clinical laboratories. *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and reports* 58, 1-14.
73. Gu, J., Ning, Y., Wang, H., Xiao, D., Tang, B., Luo, P., Cheng, Y., Jiang, M., Li, N., Zou, Q., Mao, X., 2011. Vaccination of attenuated EIS-producing *Salmonella* induces protective immunity against enterohemorrhagic *Escherichia coli* in mice. *Vaccine* 29, 7395-7403.
74. Gyles, C.L., 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal Science* 85, E45-62.
75. Hammermueller, J., Kruth, S., Prescott, J., Gyles, C., 1995. Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire* 59, 265-270.
76. Hamzah, A.M., Hussein, A.M., Khalef, J.M., 2013. Isolation of *Escherichia coli* O157 strain from fecal samples of zoo animal. *Scientific World Journal* 2013, 1-5.
77. Hancock, D.D., Besser, T.E., Rice, D.H., Ebel, E.D., Herriott, D.E., Carpenter, L.V., 1998. Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. *Preventive Veterinary Medicine* 35, 11-19.
78. Hasan, S.M., Yousif, A.A., Alwan, M.J., 2016. Detection of virulent genes in *E. coli* O157:H7 isolated from puppies and adult dogs by polymerase chain reaction. *Research Journal for Veterinary Practitioners* 4, 1-6.
79. Herold, S., Paton, J.C., Paton, A.W., 2009. Sab, a novel autotransporter of locus of enterocyte effacement-negative shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21, contributes to adherence and biofilm formation. *Infection and Immunity* 77, 3234-3243.
80. Hughes, J.M., Wilson, M.E., Johnson, K.E., Thorpe, C.M., Sears, C.L., 2006. The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin—producing *Escherichia coli*. *Clinical Infectious Diseases* 43, 1587-1595.

81. Hunt, J.M., 2010. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Clinics in Laboratory Medicine* 30, 21-45.
82. Ikeda, K., Ida, O., Kimoto, K., Takatorige, T., Nakanishi, N., Tatara, K., 1999. Effect of early fosfomycin treatment on prevention of hemolytic uremic syndrome accompanying *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Clinical Nephrology* 52, 357-362.
83. Ivarsson, M.E., Leroux, J.C., Castagner, B., 2012. Targeting bacterial toxins. *Angewandte Chemie* 51, 4024-4045.
84. Jay-Russell, M.T., Hake, A.F., Bengson, Y., Thiptara, A., Nguyen, T., 2014. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains isolated from stray dog and coyote feces in a major leafy greens production region at the United States-Mexico border. *PloS One* 9, e113433.
85. Johnson, J.R., 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews* 4, 80-128.
86. Johnson, J.R., Stell, A.L., Delavari, P., 2001. Canine feces as a reservoir of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 69, 1306-1314.
87. Johnson, K.E., Thorpe, C.M., Sears, C.L., 2006. The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Infectious Diseases* 43, 1587-1595.
88. Joris, M.A., Verstraete, K., Reu, K.D., Zutter, L.D., 2011. Loss of vtx genes after the first subcultivation step of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 and Non-O157 during isolation from naturally contaminated fecal samples. *Toxins* 3, 672-677.
89. Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology* 2, 123-140.
90. Karmali, M.A., Gannon, V., Sargeant, J.M., 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology* 140, 360-370.
91. Kataoka, Y., Irie, Y., Sawada, T., Nakazawa, M., 2010. A 3-year epidemiological surveillance of *Escherichia coli* O157:H7 in dogs and cats in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science* 72, 791-794.
92. Kehl, S.C., 2002. Role of the laboratory in the diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 2711-2715.
93. Khot, P.D., Fisher, M.A., 2013. Novel approach for differentiating *Shigella* species and *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* 51, 3711-3716.
94. Knezevic, P., Petrovic, O., 2008. Antibiotic resistance of commensal *Escherichia coli* of food-producing animals from three Vojvodinian farms, Serbia. *International Journal of Antimicrobial agents* 31, 360-363.
95. Kolar, M., Urbanek, K., Latal, T., 2001. Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 17, 357-363.
96. Kolenda, R., Burdukiewicz, M., Schierack, P., 2015. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5, 23.

97. Konowalchuk, J., Speirs, J.I., Stavric, S., 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 18, 775-779.
98. Kumar, H.S., Karunasagar, I., Karunasagar, I., Teizou, T., Shima, K., Yamasaki, S., 2004. Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from seafood and beef. *FEMS Microbiology Letters* 233, 173-178.
99. Kusunoki, H., Sasai, K., Baba, E., Takata, F., Takatori, K., Uemura, T., 2004. Oral administration of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 to dogs. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association* 57, 326-329. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association* 57, 326-359.
100. Law, D., 2000. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *Journal of Applied Microbiology* 88, 729-745.
101. Law, D., Hamour, A.A., Acheson, D.W., Panigrahi, H., Ganguli, L.A., Denning, D.W., 1994. Diagnosis of infections with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* by use of enzyme-linked immunosorbent assays for Shiga-like toxins on cultured stool samples. *Journal of Medical Microbiology* 40, 241-245.
102. Lazić, S., Cobeljic, M., Dimić, B., Opacic, D., Stojanovic, V., 2006. Epidemiological importance of humans and domestic animals as reservoirs of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Vojnosanitetski preglod* 63, 13-19.
103. Lazić, S., Stajković, N., Dimić, B., Lepšanović, Z., Krstić, M., Čekanac, R., Mladenović, J., Jadranin, Ž., Radaković, S., Rađen, S., 2010. Karakteristike sojeva Verocitotoksin produkujućih *Escherichia coli* izolovanih iz goveda. *Veterinarski glasnik* 64, 339-348.
104. Linhartova, I., Bumba, L., Masin, J., Basler, M., Osicka, R., Kamanova, J., Prochazkova, K., Adkins, I., Hejnova-Holubova, J., Sadilkova, L., Morova, J., Sebo, P., 2010. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiology Reviews* 34, 1076-1112.
105. Lopez-Saucedo, C., Cerna, J.F., Villegas-Sepulveda, N., Thompson, R., Velazquez, F.R., Torres, J., Tarr, P.I., Estrada-Garcia, T., 2003. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases* 9, 127-131.
106. Lorenz, S.C., Monday, S.R., Hoffmann, M., Fischer, M., Kase, J.A., 2016. Plasmids from Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains with Rare Enterohemolysin Gene (ehxA) Subtypes Reveal Pathogenicity Potential and Display a Novel Evolutionary Path. *Applied and Environmental Microbiology* 82, 6367-6377.
107. Luo, Y., Frey, E.A., Pfuetzner, R.A., Creagh, A.L., Knoechel, D.G., Haynes, C.A., Finlay, B.B., Strynadka, N.C., 2000. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature* 405, 1073-1077.
108. Majowicz, S.E., Scallan, E., Jones-Bitton, A., Sargeant, J.M., Stapleton, J., Angulo, F.J., Yeung, D.H., Kirk, M.D., 2014. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathogens and Disease* 11, 447-455.
109. Marks, S.L., Rankin, S.C., Byrne, B.A., Weese, J.S., 2011. Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25, 1195-1208.

110. Martin, D.L., MacDonald, K.L., White, K.E., Soler, J.T., Osterholm, M.T., 1990. The epidemiology and clinical aspects of the hemolytic uremic syndrome in Minnesota. *The New England Journal of Medicine* 323, 1161-1167.
111. Masuoka, H., Shimada, K., Kiyosue-Yasuda, T., Kiyosue, M., Oishi, Y., Kimura, S., Yamada, A., Hirayama, K., 2017. Transition of the intestinal microbiota of dogs with age. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 36, 27-31.
112. May, A.K., Gleason, T.G., Sawyer, R.G., Pruett, T.L., 2000. Contribution of *Escherichia coli* alpha-hemolysin to bacterial virulence and to intraperitoneal alterations in peritonitis. *Infection and Immunity* 68, 176-183.
113. Mayr, U.B., Kudela, P., Atrasheuskaya, A., Bukin, E., Ignatyev, G., Lubitz, W., 2012. Rectal single dose immunization of mice with *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts induces efficient humoral and cellular immune responses and protects against the lethal heterologous challenge. *Microbial Biotechnology* 5, 283-294.
114. McGannon, C.M., Fuller, C.A., Weiss, A.A., 2010. Different classes of antibiotics differentially influence shiga toxin production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 3790-3798.
115. McKenzie, E., Riehl, J., Banse, H., Kass, P.H., Nelson, S., Jr., Marks, S.L., 2010. Prevalence of diarrhea and enteropathogens in racing sled dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24, 97-103.
116. Mejias, M.P., Hiriart, Y., Lauche, C., Fernandez-Brando, R.J., Pardo, R., Bruballa, A., Ramos, M.V., Goldbaum, F.A., Palermo, M.S., Zylberman, V., 2016. Development of camelid single chain antibodies against Shiga toxin type 2 (Stx2) with therapeutic potential against Hemolytic Uremic Syndrome (HUS). *Scientific Reports* 6, 24913.
117. Melton-Celsa, A., Mohawk, K., Teel, L., O'Brien, A., 2012. Pathogenesis of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Current topics in Microbiology and Immunology* 357, 67-103.
118. Montero, D.A., Velasco, J., Del Canto, F., Puente, J.L., Padola, N.L., Rasko, D.A., Farfan, M., Salazar, J.C., Vidal, R., 2017. Locus of Adhesion and Autoaggregation (LAA), a pathogenicity island present in emerging Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Scientific Reports* 7, 7011.
119. Murphy, C., Reid-Smith, R.J., Prescott, J.F., Bonnett, B.N., Poppe, C., Boerlin, P., Weese, J.S., Janecko, N., McEwen, S.A., 2009. Occurrence of antimicrobial resistant bacteria in healthy dogs and cats presented to private veterinary hospitals in southern Ontario: A preliminary study. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne* 50, 1047-1053.
120. Nakazato, G., Gyles, C., Ziebell, K., Keller, R., Trabulsi, L.R., Gomes, T.A., Irino, K., Da Silveira, W.D., Pestana De Castro, A.F., 2004. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Veterinary Microbiology* 101, 269-277.
121. Nam, H.M., Lee, H.S., Byun, J.W., Yoon, S.S., Jung, S.C., Joo, Y.S., Lim, S.K., 2010. Prevalence of antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli*

- isolates from stray pet dogs and hospitalized pet dogs in Korea. *Microbial Drug Resistance* 16, 75-79.
122. Nastasijevic, I., Mitrovic, R., Buncic, S., 2008. Occurrence of *Escherichia coli* O157 on hides of slaughtered cattle. *Letters in Applied Microbiology* 46, 126-131.
123. Nastasijevic, I., Mitrovic, R., Buncic, S., 2009. The occurrence of *Escherichia coli* O157 in/on faeces, carcasses and fresh meats from cattle. *Meat Science* 82, 101-105.
124. Newell, D.G., La Ragione, R.M., 2018. Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies? *Transboundary and Emerging Diseases* 65, 49-71.
125. Nguyen, Y., Sperandio, V., 2012. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2, 90.
126. Ojo, O.E., Bello, A.O., Amosun, E.A., Jadi, R.A., 2014. Multidrug resistant verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the faeces of diarrhoeic and non-diarrhoeic dogs in Abeokuta, Nigeria. *Veterinarski Arhiv* 84, 63-73.
127. Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marches, O., Caprioli, A., 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infection and Immunity* 68, 64-71.
128. Paddock, Z.D., Renter, D.G., Cull, C.A., Shi, X., Bai, J., Nagaraja, T.G., 2014. *Escherichia coli* O26 in feedlot cattle: fecal prevalence, isolation, characterization, and effects of an *E. coli* O157 vaccine and a direct-fed microbial. *Foodborne Pathogens and Disease* 11, 186-193.
129. Paton, A.W., Srimanote, P., Woodrow, M.C., Paton, J.C., 2001. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infection and Immunity* 69, 6999-7009.
130. Paton, J.C., Paton, A.W., 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 450-479.
131. Paula, C.J.S.d., Marin, J.M., 2008. Occurrence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dogs with diarrhea. *Ciência Rural* 38, 1682-1686.
132. Pedersen, K., Pedersen, K., Jensen, H., Finster, K., Jensen, V.F., Heuer, O.E., 2007. Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60, 775-781.
133. Pedersen, R.M., Nielsen, M.T.K., Moller, S., Ethelberg, S., Skov, M.N., Kolmos, H.J., Scheutz, F., Holt, H.M., Rosenvinge, F.S., 2017. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: incidence and clinical features in a setting with complete screening of patients with suspected infective diarrhoea. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*.
134. Pennington, H., 2010. *Escherichia coli* O157. *Lancet* 376, 1428-1435.

135. Prada, J., Baljer, G., De Rycke, J., Steinruck, H., Zimmermann, S., Stephan, R., Beutin, L., 1991. Characteristics of alpha-hemolytic strains of *Escherichia coli* isolated from dogs with gastroenteritis. *Veterinary Microbiology* 29, 59-73.
136. Puno-Sarmiento, J., Medeiros, L., Chiconi, C., Martins, F., Pelayo, J., Rocha, S., Blanco, J., Blanco, M., Zanutto, M., Kobayashi, R., Nakazato, G., 2013. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. *Veterinary Microbiology* 166, 676-680.
137. Puño-Sarmiento, J., Medeiros, L., Chiconi, C., Martins, F., Pelayo, J., Rocha, S., Blanco, J., Blanco, M., Zanutto, M., Kobayashi, R., Nakazato, G., 2013. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. *Veterinary Microbiology* 166, 676-680.
138. Rahal, E.A., Fadlallah, S.M., Nassar, F.J., Kazzi, N., Matar, G.M., 2015. Approaches to treatment of emerging Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections highlighting the O104:H4 serotype. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5, 24.
139. Rahal, E.A., Kazzi, N., Nassar, F.J., Matar, G.M., 2012. *Escherichia coli* O157:H7-Clinical aspects and novel treatment approaches. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2, 138.
140. Rahn, K., Wilson, J.B., McFadden, K.A., Read, S.C., Ellis, A.G., Renwick, S.A., Clarke, R.C., Johnson, R.P., 1996. Comparison of Vero cell assay and PCR as indicators of the presence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in bovine and human fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4314-4317.
141. Rasheed, M.U., Thajuddin, N., Ahamed, P., Teklemariam, Z., Jamil, K., 2014. Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 56, 341-346.
142. Ren, W., Yu, R., Liu, G., Li, N., Peng, Y., Wu, M., Yin, Y., Li, Y., Fatufe, A.A., Li, T., 2013. DNA vaccine encoding the major virulence factors of Shiga toxin type 2e (Stx2e)-expressing *Escherichia coli* induces protection in mice. *Vaccine* 31, 367-372.
143. Rendon, M.A., Saldana, Z., Erdem, A.L., Monteiro-Neto, V., Vazquez, A., Kaper, J.B., Puente, J.L., Giron, J.A., 2007. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 10637-10642.
144. Riquelme-Neira, R., Rivera, A., Saez, D., Fernandez, P., Osorio, G., del Canto, F., Salazar, J.C., Vidal, R.M., Onate, A., 2015. Vaccination with DNA Encoding Truncated Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Factor for Adherence-1 Gene (efa-1') Confers Protective Immunity to Mice Infected with *E. coli* O157:H7. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5, 104.
145. Ristić, M., Pavlović, I., Miladinović Tasić, N., Babić, R., Kocić, B., 2017. Epidemiological importance of green areas and public places contaminated with canine feces in urban environmental conditions. *Acta Medica Medianae* 56, 88-93.

146. Rodrigues, N.M.B., Bronzato, G.F., Santiago, G.S., Botelho, L.A.B., Moreira, B.M., Coelho, I.d.S., Souza, M.M.S.d., Coelho, S.d.M.d.O., 2017. The Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) identification versus biochemical tests: a study with enterobacteria from a dairy cattle environment. *Brazilian Journal of Microbiology* 48, 132-138.
147. Romanus, I.I., Eze, T., Egwu, O.A., Ngozi, A.F., Chidiebuebe, N.A., 2011. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (maldi-tof ms) with conventional culture and biochemical method of bacteria identification to species level *Journal of Medical Laboratory and Diagnosis* 2, 1-4.
148. Rossi, L., Dell'Orto, V., Vagni, S., Sala, V., Reggi, S., Baldi, A., 2014. Protective effect of oral administration of transgenic tobacco seeds against verocytotoxic *Escherichia coli* strain in piglets. *Veterinary Research Communications* 38, 39-49.
149. Rossi, L., Di Giancamillo, A., Reggi, S., Domeneghini, C., Baldi, A., Sala, V., Dell'Orto, V., Coddens, A., Cox, E., Fogher, C., 2013. Expression of verocytotoxic *Escherichia coli* antigens in tobacco seeds and evaluation of gut immunity after oral administration in mouse model. *Journal of Veterinary Science* 14, 263-270.
150. Rzewuska, M., Czopowicz, M., Kizerwetter-Swida, M., Chrobak, D., Blaszcak, B., Binek, M., 2015. Multidrug resistance in *Escherichia coli* strains isolated from infections in dogs and cats in Poland (2007-2013). *Scientific World Journal* 2015, 408205.
151. Salehi, T.Z., Badouei, M.A., Gohari, I.M., 2011. Molecular detection and antibacterial susceptibility of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from healthy and diarrhoeic dogs. *Comparative Clinical Pathology* 20, 585-589.
152. Sancak, A.A., Rutgers, H.C., Hart, C.A., Batt, R.M., 2004. Prevalence of enteropathic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhoea. *The Veterinary Record* 154, 101-106.
153. Sanchez, S., Lee, M.D., Harmon, B.G., Maurer, J.J., Doyle, M.P., 2002. Animal issues associated with *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 221, 1122-1126.
154. Sandvig, K., 2006. The Shiga toxins: Properties and action on cells, In: *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, 3rd edition ed. Elsevier Inc., pp. 310-322.
155. Sato, T., Matsui, T., Takita, E., Kadoyama, Y., Makino, S., Kato, K., Sawada, K., Hamabata, T., 2013. Evaluation of recombinant forms of the shiga toxin variant Stx2eB subunit and non-toxic mutant Stx2e as vaccine candidates against porcine edema disease. *The Journal of Veterinary Medical Science* 75, 1309-1315.
156. Scheiring, J., Andreoli, S.P., Zimmerhackl, L.B., 2008. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatric Nephrology* 23, 1749-1760.

158. Scheutz, F., Teel, L.D., Beutin, L., Pierard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N.A., Melton-Celsa, A.R., Sanchez, M., Persson, S., O'Brien, A.D., 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* 50, 2951-2963.
159. Schmidt, H., Karch, H., 1996. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 2364-2367.
160. Schmitz, S., Suchodolski, J., 2016. Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics - what is the evidence? *Veterinary Medicine and Science* 2, 71-94.
161. Schroeder, C.M., Meng, J., Zhao, S., DebRoy, C., Torcolini, J., Zhao, C., McDermott, P.F., Wagner, D.D., Walker, R.D., White, D.G., 2002. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O128, and O145 from animals and humans. *Emerging Infectious Diseases* 8, 1409-1414.
162. Seepersadsingh, N., Adesiyun, A.A., 2009. Occurrence of phenotypic virulence markers, enteropathogenic serotypes and verocytotoxin production amongst strains of *Escherichia coli* isolated from non-diarrhoeic dogs in Trinidad. *Veterinarski Arhiv* 79, 245-257.
163. Serna, A.t., Boedeker, E.C., 2008. Pathogenesis and treatment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Current Opinion in Gastroenterology* 24, 38-47.
164. Shell, W.S., Sayed, M.L., Allah, F.M.G., Gamal, F.E.M., Khder, A.A., Samy, A.A., Ali, A.H.M., 2017. Matrix-assisted laser desorption-ionization-time-of-flight mass spectrometry as a reliable proteomic method for characterization of *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates. *Veterinary World* 10, 1083-1093.
165. Siegler, R.L., Obrig, T.G., Pysher, T.J., Tesh, V.L., Denkers, N.D., Taylor, F.B., 2003. Response to Shiga toxin 1 and 2 in a baboon model of hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Nephrology* 18, 92-96.
166. Smith, J.L., Fratamico, P.M., Gunther, N.W.t., 2014. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Advances in Applied Microbiology* 86, 145-197.
167. Staats, J.J., Chengappa, M.M., DeBey, M.C., Fickbohm, B., Oberst, R.D., 2003. Detection of *Escherichia coli* Shiga toxin (stx) and enterotoxin (estA and elt) genes in fecal samples from non-diarrheic and diarrheic greyhounds. *Veterinary Microbiology* 94, 303-312.
168. Stenske, K.A., Bemis, D.A., Gillespie, B.E., D'Souza, D.H., Oliver, S.P., Draughon, F.A., Matteson, K.J., Bartges, J.W., 2009. Comparison of clonal relatedness and antimicrobial susceptibility of fecal *Escherichia coli* from healthy dogs and their owners. *American Journal of Veterinary Research* 70, 1108-1116.
169. Stenutz, R., Weintraub, A., Widmalm, G., 2006. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiology Reviews* 30, 382-403.
170. Suchodolski, J.S., 2011. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. *The Veterinary clinics of North America. Small Animal Practice* 41, 261-272.

171. Swanson, K.S., Dowd, S.E., Suchodolski, J.S., Middelbos, I.S., Vester, B.M., Barry, K.A., Nelson, K.E., Torralba, M., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Cann, I.K., White, B.A., Fahey, G.C., Jr., 2011. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *The ISME Journal* 5, 639-649.
172. Taniuchi, M., Walters, C.C., Gratz, J., Maro, A., Kumburu, H., Serichantalergs, O., Sethabutr, O., Bodhidatta, L., Kibiki, G., Toney, D.M., Berkeley, L., Nataro, J.P., Houpt, E.R., 2012. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. and its evaluation on colonies, culture broths, and stool. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 73, 121-128.
173. Tarr, P.I., Bilge, S.S., Vary, J.C., Jr., Jelacic, S., Habeeb, R.L., Ward, T.R., Baylor, M.R., Besser, T.E., 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infection and Immunity* 68, 1400-1407.
174. Tatsuno, I., Horie, M., Abe, H., Miki, T., Makino, K., Shinagawa, H., Taguchi, H., Kamiya, S., Hayashi, T., Sasakawa, C., 2001. *tox B* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infection and Immunity* 69, 6660-6669.
175. Teel, L.D., Steinberg, B.R., Aronson, N.E., O'Brien, A.D., 2003. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-associated kidney failure in a 40-year-old patient and late diagnosis by novel bacteriologic and toxin detection methods. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 3438-3440.
176. Thorpe, C.M., 2004. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Clinical Infectious Diseases* 38, 1298-1303.
177. Toma, C., Martinez Espinosa, E., Song, T., Miliwebsky, E., Chinen, I., Iyoda, S., Iwanaga, M., Rivas, M., 2004. Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 4937-4946.
178. Torkan, S., Bahadoranian, M.A., Khamesipour, F., Anyanwu, M.U., 2016. Detection of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic dogs in Iran. *Archivos de Medicina Veterinaria* 48, 181-190.
179. Torres, A.G., Giron, J.A., Perna, N.T., Burland, V., Blattner, F.R., Avelino-Flores, F., Kaper, J.B., 2002. Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity* 70, 5416-5427.
180. Torres, A.G., Vazquez-Juarez, R.C., Tutt, C.B., Garcia-Gallegos, J.G., 2005. Pathoadaptive mutation that mediates adherence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111. *Infection and Immunity* 73, 4766-4776.
181. Turk, J., Maddox, C., Fales, W., Ostlund, E., Miller, M., Johnson, G., Pace, L., Turnquist, S., Kreeger, J., 1998. Examination for heat-labile, heat-stable, and Shiga-like toxins and for the *eaeA* gene in *Escherichia coli* isolates obtained from dogs dying with diarrhea: 122 cases (1992-1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 212, 1735-1736.

182. Vila, J., Saez-Lopez, E., Johnson, J.R., Romling, U., Dobrindt, U., Canton, R., Giske, C.G., Naas, T., Carattoli, A., Martinez-Medina, M., Bosch, J., Retamar, P., Rodriguez-Bano, J., Baquero, F., Soto, S.M., 2016. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews* 40, 437-463.
183. Viswanathan, V.K., Hodges, K., Hecht, G., 2009. Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea. *Nature reviews. Microbiology* 7, 110-119.
184. Wang, J.Y., Wang, S.S., Yin, P.Z., 2006. Haemolytic-uraemic syndrome caused by a non-O157 : H7 *Escherichia coli* strain in experimentally inoculated dogs. *Journal of Medical Microbiology* 55, 23-29.
185. Warren, A., Townsend, K., King, T., Moss, S., O'Boyle, D., Yates, R., Trott, D.J., 2001. Multi-drug resistant *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamase activity and fluoroquinolone resistance isolated from clinical infections in dogs. *Australian Veterinary Journal* 79, 621-623.
186. Wedley, A.L., Dawson, S., Maddox, T.W., Coyne, K.P., Pinchbeck, G.L., Clegg, P., Nuttall, T., Kirchner, M., Williams, N.J., 2017. Carriage of antimicrobial resistant *Escherichia coli* in dogs: Prevalence, associated risk factors and molecular characteristics. *Veterinary Microbiology* 199, 23-30.
187. Wieczorek, K., Osek, J., 2004. Development of a PCR internal amplification control for the detection of shiga toxin – producing *Escherichia coli*. *Bulletin of the Veterinary Institute in Puławy* 48.
188. Willford, J., Mills, K., Goodridge, L.D., 2009. Evaluation of three commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of Shiga toxin. *Journal of Food Protection* 72, 741-747.
189. Wong, C.S., Jelacic, S., Habeeb, R.L., Watkins, S.L., Tarr, P.I., 2000. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *The New England Journal of Medicine* 342, 1930-1936.
190. Younis, K., Baddour, M., Ibrahim, M.S., 2015. Detection of Diarrheagenic *Escherichia Coli* in Pet Animals and Its Antibiotic Resistance in Alexandria Governorate. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences* 45, 113-118.
191. Yousif, A.A., Hasan, M.S., M.J., A., 2016. Clinical and molecular study of *E. coli* O157:H7 isolated from. Diarrheic and non diarrheic dogs. *Mirror of Research in Veterinary Sciences and Animals* 5, 1-10.
192. Zhang, W., Bielaszewska, M., Friedrich, A.W., Kuczius, T., Karch, H., 2005. Transcriptional analysis of genes encoding Shiga toxin 2 and its variants in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 558-561.
193. Zhang, X.H., He, K.W., Zhao, P.D., Ye, Q., Luan, X.T., Yu, Z.Y., Wen, L.B., Ni, Y.X., Li, B., Wang, X.M., Guo, R.L., Zhou, J.M., Mao, A.H., 2012. Intranasal immunisation with Stx2B-Tir-Stx1B-Zot protein leads to decreased shedding in goats after challenge with *Escherichia coli* O157:H7. *The Veterinary Record* 170, 178.
194. Zotta, C.M., Lavayén, S., Hollmann, P., Lanfranconi, V., 2015. Pets as Reservoir *Escherichia coli* Shiga Toxin-Producer in Mar del Plata. *Journal of the Selva Andina Research Society* 6, 2-9.

10. PRILOZI

Prilog 1. Rezultati epidemiološke ankete. Prikaz pridapnosti rasi i starosnoj kategoriji (I - psi starosti do 1 godine, II - psi starosti od 1 do 2 godine, III - psi starosti od 2 do 3 godine, IV - psi starosti od 3 do 5 godina, V - psi starosti od 5 do 7 godina; VI - psi starosti 7 i više godina godina), stil života psa (K- život u kući, D- život u dvorištu, L – lualice), kontakt s životinjama označenim kao potencijalnim rezervoarima STEC (N- nepoznato) i prisustvo dijareje

No	RASA	STAROSNE KATEGORIJE						POL		STIL ŽIVOTA			KONTAKT		DIJAREJA	
		I	II	III	IV	V	VI	♂	♀	K	D	L	DA	NE	DA	NE
1	kovrdžavi bišon					+			+	+				+		+
2	Jack Russel terijer	+							+	+				+		+
3	mješanac				+				+	+				+		+
4	maltezer						+	+		+				+	+	
5	francuski buldog		+						+	+				+		+
6	rotvajler		+					+			+			+	+	
7	mješanac					+	+				+			+		+
8	mješanac						+	+			+			+		+
9	maltezer					+		+		+				+	+	
10	mješanac					+		+		+				+		+
11	mješanac					+		+		+				+		+
12	Jack Russel terijer	+						+	+	+				+		+
13	zapadnoškotski b. terijer				+				+	+				+		-
14	patuljasti pinč					+		+		+				+		+
15	mops			+				+			+			+		+
16	mješanac					+		+		+				+		+
17	patuljasta pudla			+				+	+	+				+	+	
18	maltezer			+					+	+				+		+
19	aljaski malamut						+	+			+		+			+
20	mješanac						+	+			+		+			+
21	šarplaninac	+							+		+		+			+
22	njemački ovčar	+						+			+		+		+	
23	mali njemački špic				+			+		+				+		+
24	rotvajler					+			+		+			+	+	
25	zapadnoškotski b. terijer			+					+	+				+		+
26	zapadnoškotski b. terijer				+			+	+	+				+		+
27	zlatni retriver		+						+		+			-		+
28	bernski planinski pas					+			+		+			+		+
29	malinoa			+				+			+		+			+
30	malinoa			+				+			+		+			+
31	malinoa			+					+		+		+			+
32	malinoa				+				+		+		+			+
33	patuljasti pinč	+						+		+				+		+
34	maltezer		+						+	+				+		+
35	kineski ćubasti pas						+		+	+				+		+
36	kineski ćubasti pas					+		+		+				+		+
37	kineski ćubasti pas					+		+		+				+		+

Nastavak **Priloga 1** sa strane 95

No	RASA	STAROSNE KATEGORIJE						POL		STIL ŽIVOTA			KONTAKT		DIJAREJA	
		I	II	III	IV	V	VI	♂	♀	K	D	L	DA	NE	DA	NE
38	rotvajler	+							+		+		+			+
39	zlatni retriver					+			+		+			+		+
40	engleski mastif				+				+		+			+		+
41	engleski mastif			+					+		+			+	+	
42	engleski mastif					+			+		+			+		+
43	engleski mastif		+						+		+			+		+
44	engleski mastif				+				+		+			+		+
45	engleski mastif						+		+		+			+		+
46	čaju-čaju	+							+		+			+		+
47	engleski mastif	+							+		+			+		+
48	engleski mastif						+		+		+			+		+
49	mješanac		+						+		+			+		+
50	mješanac					+			+	+				+		+
51	francuski buldog			+					+		+			+		+
52	engleski mastif				+				+		+			+		+
53	engleski mastif				+				+		+			+		+
54	engleski mastif			+					+		+			+		+
55	njemačka doga				+				+		+			+		+
56	njemačka doga				+				+		+			+		+
57	engleski mastif	+							+		+			+		+
58	engleski mastif					+			+		+			+		+
59	patuljasta pudla						+		+	+				+		+
60	škotski ovčar		+						+					+		+
61	njemačka doga			+					+	+				+		+
62	njufaundlendski pas				+				+	+				+		+
63	dalmatinac						+	+		+				+		+
64	labrador retriver				+				+	+				+		+
65	stafordski terijer				+				+		+			+		+
66	mješanac						+	+		+				+		+
67	zapadnoškotski b. terijer						+	+		+				+		+
68	labrador retriver			+					+		+			+		+
69	Jack Russel terijer			+					+	+				+		+
70	stafordski terijer				+				+	+				+		+
71	kovrdžavi bišon				+				+	+				+		+
72	bordoška doga		+						+		+			+		+
73	njemački ovčar				+				+	+				+		+
74	patuljasti pinč			+					+		+			+		+
75	stafordski terijer		+						+			+				+
76	mješanac				+				+			+				+
77	mješanac				+				+			+				+
78	šarplaninac				+				+			+				+
79	rotvajler				+				+			+			+	
80	mješanac			+					+			+				+
81	šar-pej				+				+			+				+
82	mješanac				+				+			+				+
83	mješanac			+					+			+				+
84	rotvajler				+				+			+				+
85	mješanac					+			+			+				+
86	mješanac		+						+			+			+	
87	mješanac		+						+			+				+
88	mješanac			+					+			+				+
89	mješanac						+		+			+				+
90	mješanac				+				+			+				+
91	jazavičar						+	+		+				+	+	
92	ruski crni terijer				+				+			+				+
93	stafordski terijer		+						+			+				+
94	mješanac		+						+			+				+
95	mješanac	+							+			+				+

Nastavak Priloga 1 sa strane 96

No	RASA	STAROSNE KATEGORIJE						POL		STIL ŽIVOTA			KONTAKT		DIJAREJA	
		I	II	III	IV	V	VI	♂	♀	K	D	L	DA	NE	DA	NE
96	akita						+	♂	♀			+				+
97	kane corso				+			♂	♀			+				+
98	rotvajler						+	♂	♀			+				+
99	stafordski terijer			+				♂	♀			+				+
100	mješanac	+						♂	♀			+				+
101	stafordski terijer		+					♂	♀			+				+
UKUPNO		11	14	18	27	15	16	48	53	36	39	26	66	9	10	91

Prilog 2. Rezultati izolacije i identifikacije. No – broj uzorka, EA - Endo agar, SMAC – Sorbitol MacConkey agar, I – test produkcije indola, pokr. – pokretljivost, H₂S – produkcija vodonik slufida, MR – Metil-crveno test, VP – Voges proskauer test, SC – test korišćenja citrata, ferm. – fermentacija, gas – produkcija gasa, KA – krvni agar.

No	EA	SMAC ferm. sorbit.	BIOHEMIJA									<i>E.coli</i>	MALDI -TOF MS	KA		
			SIM			MR	VP	SC	DSIA					hemoliza		
			I	pokr.	H ₂ S				ferm.	gas	H ₂ S			α	β	γ
1	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
2																
3	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-				
4	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
5	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
6																
7	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
8	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>		+	
9	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
10	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>		+	
11																
12	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>		+	
13	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>		+	
14	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>		+	
15	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
16	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-				
17	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-			
18	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>		+	
19	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
20	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>		+	
21	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
22	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
23	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>		+	
24	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>		+	
25	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-				
26	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
27	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
28	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
29	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-				
30	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-			
31	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
32	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
33	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
34	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
35	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>		+	
36	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>		+	
37																
38	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
39	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
40	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
41	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
42	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
43	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
44	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
45	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
46	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
47	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
48	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
49	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
50	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
51	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
52	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
53	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
54	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>		+	
55	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		

Nastavak Priloga 2 sa strane 98

No	EA	SMAC ferm. sorbit.	BIOHEMIJA									<i>E.coli</i>	MALDI -TOF MS	KA		
			SIM			MR	VP	SC	DSIA					hemoliza		
			I	pokr.	H ₂ S				ferm.	gas	H ₂ S			α	β	γ
56	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
57	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-				
58	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
59																
60	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
61	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
62	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
63	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-				
64	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
65	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>		+	
66	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
67																
68	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
69	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-				
70	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
71	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
72	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
73	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-				
74	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>	+		
75	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
76	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
77	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
78	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
79	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
80	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
81	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
82	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
83	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
84	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-				
85	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-				
86	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
87	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
88	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
89	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-				
90																
91	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
92	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
93	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
94	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
95	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
96	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
97	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
98	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
99	+															
100	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
101	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	<i>E.coli</i>			+
Σ	94	93										82	80			