



VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

VIKTORIJA DAPKUTĖ
Mikrobiologijos studijų programa

Magistro baigiamasis darbas

JAUTIENOJE APTIKTŲ ŠIGA TOKSINĄ IŠSKIRIANČIŲ *ESCHERICHIA COLI* IDENTIFIKAVIMAS IR GENOMINĖ ANALIZĖ

Studentė Viktorija Dapkutė

Darbo vadovas dr. Žygimantas Janeliūnas

Darbo konsultantė Gertrūda Šeškutė

VILNIUS, 2024

TURINYS

SANTRUMPOS	3
ĮVADAS	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1. Šiga toksiną išskiriančių <i>Escherichia coli</i> (STEC) savybės	6
1.1.1 STEC serotipavimas	6
1.2 STEC virulentiškumo veiksniai	7
1.2.1 Šiga toksino savybės	8
1.2.2 Šiga toksino struktūra ir veikimo mechanizmas	9
1.3 STEC kamienų patogenezė ir atsparumas antibiotikams	11
1.4 Genomo sekoskaita	12
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	16
2.1. Darbe naudota įranga, priemonės, reagentai, bakterijų kultivavimo terpės	16
2.2. Darbe taikyti metodai	17
2.2.1. STEC aptikimas pagal ISO/TS 13136:2012	17
2.2.2. Bakterijų kultūros paruošimas sekoskaitai	19
2.2.3. Analizė bioinformatikos įrankiais	24
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	26
3.1. STEC jautienoje ir jos gaminiuose 2020 – 2024 m.	26
3.2. Šiga toksino tipai ir potipiai	27
3.3. Kamienų serotipai	28
3.4. Virulentiškumo genai	30
3.5. Atsparumas antibiotikams	32
IŠVADOS	35
SANTRAUKA	36
SANTRAUKA ANGLŲ KALBA	37
LITERATŪROS ŠALTINIAI	38
PADĖKA	45
PRIEDAI	46

SANTRUMPOS

- BPV – buferinis peptono vanduo
- CDC – JAV ligų kontrolės ir prevencijos centras
- CT-SMAC – sorbitolio MacConkey agaras su cefiksimu ir teluritu
- ECDC – Europos ligų prevencijos ir kontrolės centras
- EFSA – Europos maisto saugos tarnyba
- EHEC – enterohemoraginė *Escherichia coli*
- EPEC – enteropatogeninė *Escherichia coli*
- ExPEC – ekstraintestinalinė *Escherichia coli*
- FDA – JAV maisto ir vaistų administracija
- GB3 (ang. *globotriaosylceramide*) – globotrioasilkeramidas
- GB4 (ang. *globotetraosylceramide*) – glikozilintas tetra-globozidas
- HUS – hemolizinis ureminis sindromas
- ISO – Tarptautinė standartizacijos organizacija
- LEE (ang. *locus of enterocyte effacement*) – enterocitų pažeidimo lokusas
- NKS (ang. *next-generation sequencing, NGS*) – naujos kartos sekoskaita
- PSO – Pasaulio sveikatos organizacija
- RL-PGR – realaus laiko polimerazės grandininė reakcija
- RMAC – ramnozės MacConkey agaras
- SMAC – sorbitolio MacConkey agaras
- STEC – Šiga toksiną išskirianti *Escherichia coli*
- TBX – triptono tulžies X-gliukoronido agaras
- TSA – triptono sojos agaras
- TTP – trombozinė trombocitopeninė purpura
- VTEC – verotoksigeninė *Escherichia coli*
- VGS (ang. *whole genome sequencing, WGS*) – viso genomo sekoskaita

IVADAS

Enterobacteriaceae šeimai priklauso daug genčių, tokių kaip *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* ir *Enterobacter*, kurios turi nemažai bendrų savybių: lazdelės formos, gramneigiamos bakterijos, fakultatyviniai anaerobai, fermentuoja gliukozę, redukuoja nitratus į nitritus, pasižymi neigiama oksidazės reakcija. Šiai šeimai priklausančios bakterijos įprastai randamos gamtoje, o dauguma jų yra normalios žmonių ir gyvūnų žarnyno mikrofloros dalis. *Escherichia coli* yra vienas iš plačiausiai ištirtų organizmų ir yra daugelio pagrindinių biocheminių ir genetinių procesų supratimo pagrindas. *E. coli* ilgą laiką buvo klasifikuojamas kaip nekenksmingas mikroorganizmas, tačiau dabar yra žinomų padermių, kurios gali sukelti rimtas ligas arba mirtį. Vienas iš patogeninių *E. coli* kamienų – Šiga toksiną išskirianti *E. coli* (STEC), kuriai būdinga Stx1 ir/arba Stx2 toksinų sintezė (Castro et al., 2017). STEC visame pasaulyje yra siejamos su daugybe žmonių ligų – nuo lengvo viduriavimo iki hemoraginio kolito (HC), hemolizinio ureminio sindromo (HUS) ir trombozinės trombocitopeninės purpuros (TTP). *E. coli* O157:H7 serotipas yra vienas iš dažniausiai aptinkamų ir neretai yra siejamas su sunkiausiomis ligos formomis (Wang et al., 2024).

Galvijai yra laikomi pagrindiniu STEC šaltiniu, tačiau bakterijos gali būti aptinkamos ir kituose gyvūnuose (avyse, ožkose, kiaulėse, paukščiuose) (Wang et al., 2024). Žmonės dažniausiai užsikrečia vartojant užterštą maistą ar vandenį, per aplinką ar tiesioginį kontaktą su gyvūnais (Yang et al., 2020). Pirmasis protrūkis, susijęs su STEC, įvyko Jungtinėse Valstijose 1982 m. dėl jautienos mėšainių, užterštų O157:H7 kamieniu (Castro et al., 2017). Nepakankamai termiškai apdorota mėsa ir mėsos produktai, ypač malta jautiena, neretai yra pagrindinis žmonių STEC infekcijos šaltinis (Varcasia et al., 2018; Nehoya et al., 2020; Egervärn and Flink, 2024). Mėsa dažniausiai užteršiama skerdimo metu dėl taršos išmatomis. Vėlesnis mėsos malimas lemia patogeno išplitimą po visą tūrį, kur STEC gali išlikti dėl netinkamo terminio apdoravimo (Mohammed et al., 2014).

Per pastarąjį dešimtmetį STEC infekcijos paplitimas išaugo, šiuo metu tai yra ketvirtas pagal dažnumą per maistą plintantis patogenas visoje Europos Sąjungoje. Dėl nemažo infekcijų kiekio yra labai svarbu greitai suvaldyti STEC protrūkius bei nustatyti galimą užkrato šaltinį, todėl viso genomo sekoskaita (VGS) (ang. *whole genome sequencing*, WGS) tapo viena pagrindinių priemonių atliekant laboratorinius šių protrūkių tyrimus. Šis metodas siūlo aukštą tikslumą ir galimybę identifikuoti izoliuotų kamienų filogenetinius ryšius. Sekoskaitos pagalba galima pilnai apibūdinti patogeno savybes (t.y. serotipą, virulentiškumą ir atsparumą antimikrobinėms medžiagoms genetinius profilius) bei nustatyti protrūkių šaltinį, todėl šį metodą patartina naudoti siekiant pagerinti epidemiologines žinias apie STEC padermių įvairovę. Būtent dėl šių priežasčių, JAV ligų kontrolės ir prevencijos centras (CDC), JAV maisto ir vaistų administracija (FDA),

Pasaulio sveikatos organizacija (PSO), Europos ligų prevencijos ir kontrolės centras (ECDC) ir Europos maisto saugos tarnyba (EFSA) pataria šalims visame pasaulyje taikyti VGS ne tik įprastose visuomenės sveikatos srityse (klinikiniuose izoliatuose), bet ir maisto taršos stebėjimo sistemose (Nouws et al., 2023).

Darbo tikslas – identifikuoti jautienoje aptiktas Šiga toksiną išskiriančias *Escherichia coli* ir atlikti jų genominę analizę.

Darbo uždaviniai:

1. Palyginti RL-PGR (pagal ISO/TS 13136:2012) ir sekoskaitos duomenų analizės rezultatus.
2. Įvertinti STEC kamienų panašumą pagal virulentiškumo genus.
3. Įvertinti STEC kamienų atsparumą skirtingoms antibiotikų klasėms.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Šiga toksiną išskiriančių *Escherichia coli* (STEC) savybės

Escherichia coli rūšis apima daugybę organizmų, įskaitant patogenus, probiotikus ir įprastas žarnyno bakterijas. *E. coli* bakterijos yra gramneigiami fakultatyviniai anaerobai, kurie daugiausiai aptinkami stuburinių gyvūnų storioje ir aklojoje žarnoje bei sudaro apie 0,1 % sveiko žmogaus žarnyno mikrobiotos (Eckburg et al., 2005; Nawrocki et al., 2020). Patogeninės *E. coli* padermės klasifikuojamos pagal jų virulentiškumo veiksnius ir sukiamų ligų ypatybes. Pagal ligos pobūdį patogeninės *E. coli* skirstomos į dvi grupes: padermės, sukeliančios viduriavimą, ir padermės, kurios viduriavimo nesukelia. Pastarajai grupei priskiriamos ekstraintestinalinės patogeninės *E. coli* (ExPEC), kurios sukelia ligas už šeimnininko žarnyno ribų. Pirmajai grupei (viduriavimą sukeliančių patogeninių *E. coli*) priskiriamos enterohemoraginė *E. coli* (EHEC) ir Šiga toksiną išskirianti *E. coli* (STEC) (Nawrocki et al., 2020).

Šiga toksiną išskiriančios *E. coli* (STEC), dėl sukiamo citotoksiškumo Vero lastelėms dar žinomos kaip verotoksigeninės *E. coli* (VTEC), pirmą kartą aprašytos 1977 metais. STEC gali išskirti dviejų tipų toksinus Stx1 ir Stx2, kurie skirstomi į potipius. Stx2 dažniau siejamas su HUS nei Stx1, o Stx2a laikomas pavojingiausiu toksino potipiu. Nors visos STEC padermės gamina Šiga toksiną (Stx), tačiau ne visos laikomos žmogaus patogenais. Žmonėms infekcijas sukelia EHEC ir STEC padermių pogrupis, kuris sukelia prisitvirtinančius ir naikinančius (AE) pažeidimus (ang. *attaching and effacing (AE) lesions*) bei gali sukelti sunkias infekcijos formas, įskaitant hemoraginį kolitą ir hemolizinį ureminį sindromą (Nawrocki et al., 2020).

1.1.1 STEC serotipavimas

E. coli klasifikacija yra paremta antigenų įvairove, kas leidžia STEC kamienus išskirstyti į serotipus. Klasifikacijai galima naudoti tris bakterijos paviršinius antigenus: O-antigenus, žiuželio H-antigenus ir kapsulės K-antigenus. Standartiškai *E. coli* serotipuojamos pagal du pirmuosius antigenus: O-antigenas nurodo serogrupę, o H-antigenas – serotipą (Bhunja, 2018; Gonzalez and Cerqueira, 2020). Remiantis minėta serotipavimo sistema yra nustatyta daugiau nei 400 skirtingų STEC serotipų, iš jų daugiau nei 130 serotipų yra susiję su žmogaus infekcijomis. Dažniausiai su per maistą plintančių infekcijų sukėlimu siejamas STEC O157:H7 serotipas, tačiau pastaraisiais metais pastebėta, kad kitų serotipų sukiamos infekcijos sudaro iki 50 % visų infekcijos atvejų (Zhang et al., 2022).

Tam tikri serotipai, atsižvelgiant į praneštą ligos pasireiškimo dažnį ir sunkumą, yra smulkiau skirstomi į seropatotipus. Išskiriami 5 STEC serapatotipai A – E, kur A nurodo santykinai didelį sergamumą ir sunkią ligos formą, o E seropatotipui priskiriami serotipai, kurie žmonėms ligos nesukelia. A grupei priklauso O157:H7 ir O157:NM (NM; nemobilus) serotipai, kurie yra patys

virulentiškiausi. Seropatotipas B apima serotipus O126:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19 ir O145:NM, kurie yra siejami su sunkia ligos forma (pvz., HUS), bet rečiau nei serotipas O157:H7. Serotipai O91:H21 ir O113:H21 priskiriami seropatotipui C, abu serotipai siejami su protrūkiiais, bet retai sukelia HUS. Seropatotipui D priskiriami serotipai, kurie susiję su sporadiniais viduriavimo atvejais. Likę STEC serotipai, kurie nėra siejami su žmonių ligomis, priskiriami E seropatotipui (Amézquita-López et al., 2018).

1.2 STEC virulentiškumo veiksniai

STEC virulentiškumo veiksniai, turintys įtakos infekcijos sukėlimui, gali būti aptikti mikroorganizmo chromosomoje ir plazmidėse. Šiga toksiną koduojantys genai, *stx1* ir *stx2*, yra laikomi pagrindiniu STEC apibrėžiančiu virulentiškumo faktoriumi. Papildomi virulentiškumo veiksniai, esantys patogeniškumo salelėse, apima „enterocitų pažeidimo lokusą“ (ang. *locus of enterocyte effacement*, LEE) ir ne-LEE efektorius (ang. „non-LEE effectors“), kurie yra susiję su ląstelių kolonizacija ir infekcijos sukėlimu (1.1 lentelė) (Amézquita-López et al., 2018).

1.1 lentelė. Keletas STEC būdingų virulentiškumo veiksnių (Maluta et al., 2016; Amézquita-López et al., 2018)

Genas	Geno lokacija	Charakteristikos ir (arba) susijusios funkcijos
Hemoliziniai		
<i>ehxA</i>	pO157 plasmidė	Enterohemolizinas
<i>hlyA</i>	Chromosoma	α -hemolizinas
Adheziniai		
<i>eae</i>	LEE lokusas	Intiminas
<i>fdeC</i>	Chromosoma	Į intiminą panašus adhezinai
Efektoriai		
<i>espK</i>	Sp6 profagas	Funkcija nežinoma
<i>katP</i>	pO157 plasmidė	Katalazė-peroksidazė
<i>espP</i>	pO157 plasmidė	Ekstraląstelinė serino proteazė
<i>nleA</i>	O-salelė 71	Sutrikdo baltymų sekreciją
Toksinai		
<i>stx1, stx2</i>	Chromosoma	Šiga toksinai
<i>subA</i>	pO113 plasmidė	Subtilazės citotoksinas; sukelia žmogaus ląstelių apoptozę
<i>astA</i>	Chromosoma	Karštyje stabilus enterotoksinas

LEE yra 35 – 45 kb patogeniškumo salelė, kuri atsakinga už AE pažaidų susidarymą ant žarnyno epitelio ląstelių. Vienas iš tipinių LEE lokuso genų, *eae*, koduoja išorinės membranos adhezina intiminą. Yra aprašyta 18 intimino potipių, tačiau jie visi atlieka tą pačią funkciją –

dalyvauja STEC ir žarnyno epitelio ląstelių sąveikoje. Be intimino, LEE koduoja III tipo sekrecijos sistemą (T3SS), kuri apima struktūrinius ir translokacinius baltymus (EspA, EspB, EspD) ir T3SS efektorinius baltymus (EspF – H, EspZ, Map ir Tir). Mažiausiai 32 kiti T3SS išskiriami baltymai yra užkoduoti už LEE ribų, todėl tokie efektoriai paprastai vadinami ne LEE koduotais efektoriais (NLE). Nors LEE lokusas būdingas daugumai STEC padermių, jo buvimas nėra būtinas patogenezei, kai kurios LEE neturinčios padermės taip pat gali sukelti HUS ir retais atvejais protrūkius (Farrokh et al., 2013).

1.2.1 Šiga toksino savybės

Šiga toksinas (Stx), pagrindinis Šiga toksiną išskiriančios *E. coli* (STEC) virulentiškumo faktorius, pirmą kartą buvo aptiktas *Shigella dysenteriae*. Šiga toksinas, remiantis biocheminėmis ir molekulinėmis savybėmis, skirstomas į tris tipus: Stx, Stx1 ir Stx2 (1.2 lentelė). Stx1 toksino aminorūgščių seka yra beveik identiška *Shigella dysenteriae* išskiriamam Šiga toksinui (Stx), skiriasi tik viena aminorūgštis (Chan and Ng, 2016). 2 tipo toksinas (Stx2) turi tik 50 – 60 % panašumą su Stx1. Remiantis naujausiais šaltiniais, Stx1 toksinas skirstomas į keturis potipius (Stx1a, Stx1c, Stx1d ir Stx1e), o Stx2 net į penkiolika potipių (nuo Stx2a iki Stx2o). Stx1 potipiai pasižymi dideliu aminorūgščių sekos panašumu (95% – 98,3%), kai tuo tarpu Stx2 toksinai yra heterogeniškesni (Gill et al., 2022; Henrique et al., 2022; Wang et al., 2024).

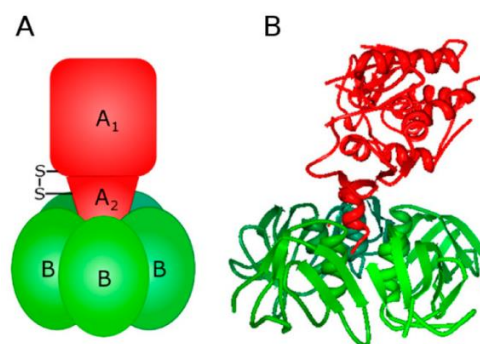
1.2 lentelė. Šiga toksinų fizinės ir cheminės savybės (Chan and Ng, 2016)

	Stx	Stx1	Stx2
Šaltinis	<i>S. dysenteriae</i>	STEC	STEC
Struktūra	AB ₅	AB ₅	AB ₅
Funkcija	A subvienetas: katalitinis domenas, N-glikozidazės aktyvumas; B subvienetas: į lektiną panašus domenas, receptoriaus atpažinimas	A subvienetas: katalitinis domenas, N-glikozidazės aktyvumas; B subvienetas: į lektiną panašus domenas, receptoriaus atpažinimas	A subvienetas: katalitinis domenas, N-glikozidazės aktyvumas; B subvienetas: į lektiną panašus domenas, receptoriaus atpažinimas
Molekulinė masė	A grandinė 32 kDa; B grandinė 7 kDa	A grandinė 32 kDa; B grandinė 7 kDa	A grandinė 32 kDa; B grandinė 7 kDa
Sekos panašumas su Stx	100 %	~100 % (1 aminorūgšties skirtumai)	~55 % panašumas A grandinei, ~57 % panašumas B grandinei
Atsakas į karštį	Jautrus karščiui: praranda aktyvumą ties 65 °C	Jautrus karščiui: praranda aktyvumą ties 65 °C	Stabilesnis: praranda aktyvumą ties 85 °C
Atsakas į pH	Stabilus kai pH 5 – 9	Stabilus kai pH 5 – 9; praranda aktyvumą kai pH 3, neutraliame pH aktyvumas atsistato	Stabilus kai pH > 3.5; stabilesnis už Stx1 kai pH 3
Izoelektrinis taškas (pI)	7,0	7,0	5,2
Receptorius	Galα1-4Galβ1-4Glc keramidas	Galα1-4Galβ1-4Glc keramidas	Galα1-4Galβ1-4Glc keramidas
Afiniškumas receptoriui	Aukštas	Aukštas	Žemesnis nei Stx/Stx1

Nors identifikuojama vis naujų toksino potipių, ne visi iš jų yra susiję su sunkia infekcijos forma. Remiantis klinikiniais duomenimis, dažniausiai su sunkesne ligos forma bei hospitalizacija siejami Stx1a, Stx2a, Stx2c ir Stx2d potipiai (Henrique et al., 2022). O atliekant citotoksiškumo tyrimus su Vero ir HeLa ląstelėmis pastebėta, kad Stx2 yra daug toksiškesnis nei Stx1, nes jis pasižymi didesniu afiniškumu šeimininko ląstelių ribosomoms ir didesniu kataliziniu aktyvumu (Wang et al., 2024).

1.2.2 Šiga toksino struktūra ir veikimo mechanizmas

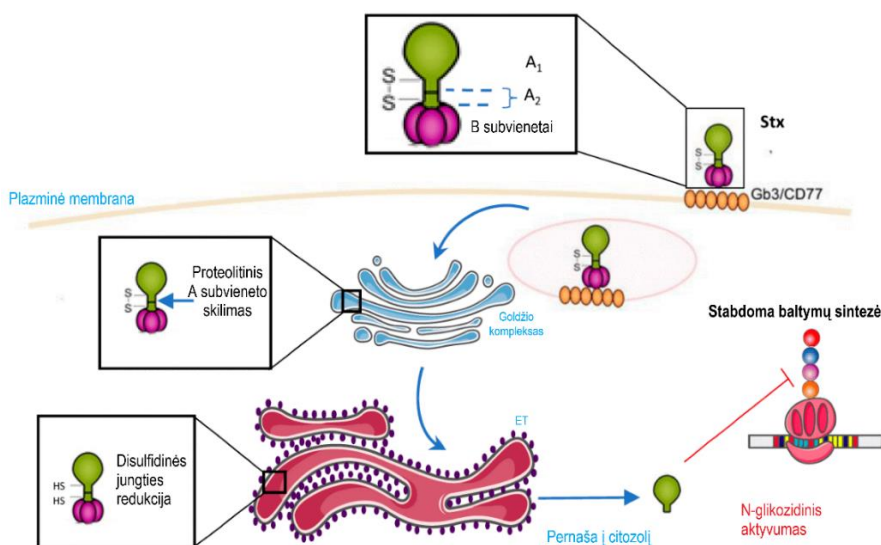
Šiga toksinas yra užkoduotas bakteriofago genome, kuris dažniausiai yra integruotas kaip profagas bakterijų chromosomoje. Po indukcijos fagas pereina į lizinį ciklą, kurio metu ekspresuojamas Šiga toksino genas. Struktūriškai Šiga toksinai yra tipiški ribosomas inaktyvuojančių baltymų (RIP) šeimos nariai, kuriems būdinga AB₅ struktūra – vienas A subvienetas, nekovalentiškai susietas su penkiais vienodais B subvienetais (1.1 pav.). 32 kDa dydžio A subvienetas susideda iš 27,5 kDa A₁ fragmento ir 4,5 kDa A₂ fragmento, kurie yra sujungti disulfidine jungtimi. Penki identiški 7,7 kDa B subvienetai sudaro pentamerinį žiedą, kuris apgaubia A subvienetą C-gale. A subvienetas pasižymi katalitinėmis savybėmis (N-glikozidinis aktyvumas) ir siejamas su citotoksiniu aktyvumu, B subvienetai atsakingi už sąveiką su ląstelės-šeimininkės receptoriais – glikosfingolipido Gb3 trisacharidine dalimi. Kiekvienas B subvienetas turi tris angliavandenių surišimo vietas, todėl kiekvienoje Šiga toksino molekulėje yra iki 15 sąveikų vietų su angliavandeniais, kas lemia aukštą toksino afiniškumą (Bergan et al., 2012; Chan and Ng, 2016; Bhunia, 2018).



1.1 pav. Šiga toksino struktūra, A – toksino molekulė susideda iš dviejų nekovalentiškai susietų fragmentų: A fragmento (raudona spalva) ir iš penkių grandinių sudaryto B fragmento (žalia spalva); B – rentgeno kristalografijos būdu nustatyta holotoksino struktūra (Kavaliauskiene et al., 2017).

Šiga toksino veikimo mechanizmas (1.2 pav.) apima kelis etapus: prisijungimą prie specifinių receptorių tikslinių ląstelių paviršiuje, patekimą į ląstelę endocitozės būdu, toksino pernešimą per Goldžio kompleksą ir endoplasminį tinklą bei patekimą į citozolį, kur toksinas pasiekia ribosomas, sukeldamas jų inaktyvaciją. Bakterijos patekusios į virškinamąjį traktą kolonizuoja žarnyno paviršių, Stx toksinai per pažeistą žarnyno traktą patenka į kraujotaką ir yra pernešami į

pagrindinius organus – inkstus ir nervų sistemą, ten atpažįsta ant tikslinių ląstelių esančius Gb3 receptorių (Chan and Ng, 2016; Liu et al., 2022). Gb3 yra ekspresuojamas kelių tipų žmogaus ląstelėse: inkstų epitelio, mezangialinėse ir glomerulinėse ląstelėse, mikrovaskulinėse endotelio ląstelėse, dengiančiose smegenis ir žarnas, taip pat kai kuriuose B limfocituose. Šiga toksinų surišimo savybės yra gana specifinės, toksino B grandinė sąveikauja su Gb3 receptoriaus trisacharido dalimi (Gal α 1-4Gal β 1-4Glc keramidas). Yra pastebėta, kad B subvienetas taip pat gali sąveikauti ir su Gb4 receptoriais, tačiau ši sąveika labiau būdinga Stx2e potipiui. Gb3 receptorių platus pasiskirstymas paaiškina, kodėl HC ir HUS ligų atveju pažeidžiamas ne tik žarnynas, bet ir inkstai bei smegenys (Chan ir Ng, 2016).



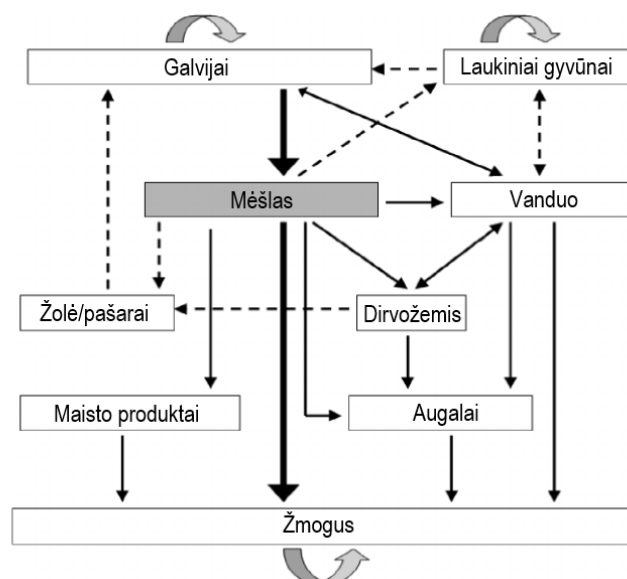
1.2 pav. Šiga toksino veikimo mechanizmas. Stx prisijungia prie Gb3 ląstelės paviršiuje ir patenka į ląstelę endocitozės būdu. Stx transportuojamas į Goldžio aparatą, kur A subvienetas suskaidomas, Stx toliau patenka į endoplazminį tinklą, kur suskaidoma disulfidinė jungtis tarp A1 ir A2 fragmentų. Katalitiniu aktyvumu pasižymintis A1 fragmentas keliauja į citozolį, kur slopina baltymų sintezę (Robert and Wiels, 2021)

Prisijungęs prie receptoriaus toksinas transportuojamas į ląstelę nuo klitrino priklausomos endocitozės būdu ir suformuojamos toksiną nešančios klitrinu padengtos pūslelės. Toksinus nešančios endosomos keliauja retrogradiniu keliu į Goldžio kompleksą ir endoplazminį tinklą, ši pernaša yra priklausoma nuo aktino pagrindu veikiančio mikrotubulių tinklo (Chan and Ng, 2016). Tam, kad toksino molekulė pasidarytų veikli, endoproteazė furinas turi A subvientą suskaidyti į du fragmentus: A1 ir A2. Furinas, atpažindamas specifinį sekos motyvą (Arg-X-X-Arg) baltymo kilpoje, suskaido A fragmentą tarp R251 ir M252 aminorūgščių Stx1 molekulėje, ir tarp R250 ir A251 Stx2 molekulėje. Šiga toksino optimaliam skilimui reikalingas žemas pH, o tai parodo, kad šis procesas įvyksta ankstyvajame transportavimo kelyje. Toksinas gali būti skeliamas ir nedalyvaujant furinui, bet šis procesas yra mažiau efektyvus. Po skilimo A1 fragmentas lieka prijungtas prie A2 fragmento per disulfidinę jungtį tol, kol toksinas patenka į endoplazminį tinklą, kur yra veikiamas redukuojančiomis sąlygomis (Bergan et al., 2012). Kai toksinas patenka į endoplazminį tinklą, disulfidinė jungtis skyla, o A1 fragmentas patenka į lumeną, galiausiai į

citozolį, kur pasireiškia ribosomų inaktyvacija. Stx toksino poveikis gali turėti įvairių pasekmių ląstelėms, daugeliu atveju sužadinami apoptotiniai mechanizmai. Be apoptozės, ribotoksinis stresas gali sukelti citokinų gamybos pokyčius bei endoplazminio tinklo stresą, šie veiksniai daro įtaką baltymų taisyklingam susilankstymui (Chan and Ng, 2016).

1.3 STEC kamienu patogeneze ir atsparumas antibiotikams

Pagrindiniu STEC šaltiniu laikomi galvijai, tačiau bakterijos gali būti izoliuojamos iš įvairių gyvūnų, įskaitant avis, arklius, ūkiuose auginamus elnius, ožkas, šunis, kiaules ir laukinius paukščius. Šie patogenai gali cirkuluoti aplinkoje ne tik per gyvūnus, bet ir maisto grandinę, vandenį ir dirvą (*L.3 pav.*). Nors STEC kolonizuoja galvijų žarnyną, paprastai bakterijos jiems ligos nesukelia, tarp šių dviejų organizmų vyrauja komensalizmas (Browne et al., 2021; Nada et al., 2023). Pirmieji užregistruoti žmonių STEC infekcijos atvejai buvo susiję su nepakankamai termiškai apdorotos maltos jautienos vartojimu, o nuo to laiko malta jautiena buvo susijusi su daugybe protrūkių. Jautiena neretai užteršiama galvijų skerdimo metu, dėl netinkamo higienos normų laikymosi, vėliau užkrėstą mėsą smulkinant bakterijos paskirstomos po visą jos tūrį. Vartojant užterštą jautieną infekcijos rizika žymiai padidėja, kai mėsa ir jos produktai nėra tinkamai termiškai apdorojami (Health Protection Surveillance Centre (HPSC), 2005). Remiantis Europos ligų prevencijos ir kontrolės centro (ECDC) 2022 m. epidemiologijos ataskaita, jautiena yra reikšmingas rizikos veiksnys užsikrėsti per maistą plintančia STEC infekcija. Įtariama, kad dalį 2022 m. infekcijos atvejų sukėlė malta jautiena mėsauiuose, kuri buvo netinkamai termiškai apdorota. Jautiena ir švieži produktai (vaisiai ir daržovės) laikomi kaip pagrindiniai STEC infekcijos šaltiniai Europoje (“STEC infection Annual Epidemiological Report 2022,” 2022).



1.3 pav. STEC šaltiniai ir plitimo būdai. Išsines linijos žymi tiesioginius arba netiesioginius perdavimo kelius tarp galvijų ir žmonių, punktyrinės linijos – perdavimo kelius galvijams (Franz, 2007).

STEC infekciją sukelia mažas ląstelių kiekis (<50 bakterijų ląstelių), o inkubacinis laikotarpis iki viduriavimo pradžios svyruoja nuo 2 iki 12 dienų (Amézquita-López et al., 2018). Infekcijos pradžioje bakterijos nekaupia toksino, todėl toksino lygis yra labai mažas ir žalingo poveikio nedaro. Pirminėje infekcijos stadijoje bakterijos atlieka žarnyno kolonizacijos ir sukibimo su ląstelėmis procesus. Bakterijoms sąveikaujant su epitelio ląstelėmis, jos gamina ir išskiria efektorius, kurie sukelia epitelio ląstelinio aktino persitvarkymą. Aktino pokyčiai leidžia bakterijų produktams pereiti epitelio ląstelių barjerą ir patekti į kraujotakos sistemą. Bakterijų infekcija sukelia žarnyno gleivinės pažeidimus, sutrikdo gaurelių struktūrą, paveikia absorbciją žarnyne ir galiausiai sukelia vandeningą viduriavimą. Po kelių dienų prasideda Šiga toksino produkcija, kuris sukelia ląstelių pažeidimus ir ląstelių mirtį. Žarnyno endotelio pažeidimai sukelia gleivinės ir pogleivinės edemą, hemoragiją ir kruviną viduriavimą. HC atsiradimas su šiais simptomais gali būti besivystančio HUS požymis. STEC sukeltam HUS būdinga tai, kad organuose atsiranda trombozinių mikrovaskulinių pažeidimai, kurie lemia maždaug 5 % pacientų mirtį (Chan ir Ng, 2016; Amézquita-López et al., 2018).

Visame pasaulyje vis dažniau užfiksuojamas STEC padermių, izoliuotų iš naminių gyvūnų šaltinių (galvijų, avių, vištų, kalakutų, kiaulių), atsparumo antimikrobinėms medžiagoms padidėjimas, kuris gali turėti įtakos maistui ir aplinkai (Amézquita-López et al., 2018). Atsparumo antibiotikams atsiradimas STEC gali būti siejamas su dideliu šių medžiagų naudojimu agrokultūroje bei gyvulininkystėje. Iš gyvulių izoliuotos STEC padermės yra atsparios įvairioms antibiotikų klasėms: β -laktamams, aminoglikozidams, amfenikoliams, tetraciklinams (Colello et al., 2018; Mir and Kudva, 2019).

Įprastai bakterinės infekcijos yra gydomos antibiotikais, tačiau STEC infekcijų gydymas antibakteriniais preparatais yra prieštaringas, nes yra įrodymų, kad antibiotikai gali pabloginti ligą, skatindami toksino produkciją. Tyrimai rodo, kad STEC infekcijos metu ankstyvas tam tikrų klasių (makrolidų, tetraciklinų, fosfomicinų, aminoglikozidų) antimikrobinių medžiagų skyrimas stabdo infekcijos progresavimą. Nepaisant to, kad žmonių STEC infekcijų gydymas antibiotikais nerekomenduojamas, antibiotikams atsparių bakterijų buvimas gyvūnuose ir maiste, kelia pavojų visuomenės sveikatai, nes aplinkoje padidėja genetinis fondas, iš kurio bakterijų patogenai gali įgyti atsparumą antibiotikams (Amézquita-López et al., 2018; Galarce et al., 2020).

1.4 Genomo sekoskaita

Mikrobiologiniai bakterijų kultivavimo metodai paprastai laikomi standartine patogenų aptikimo procedūra, o patogeno patvirtinimui atliekami serologiniai (imunochromatografija, ELISA) arba molekuliniai tyrimai (multilokusų VNTR analizė, PGR, RL-PGR). Polimerazės grandininės reakcija (PGR) yra dažniausiai taikomas daugelio laboratorijų įprastinės analizės

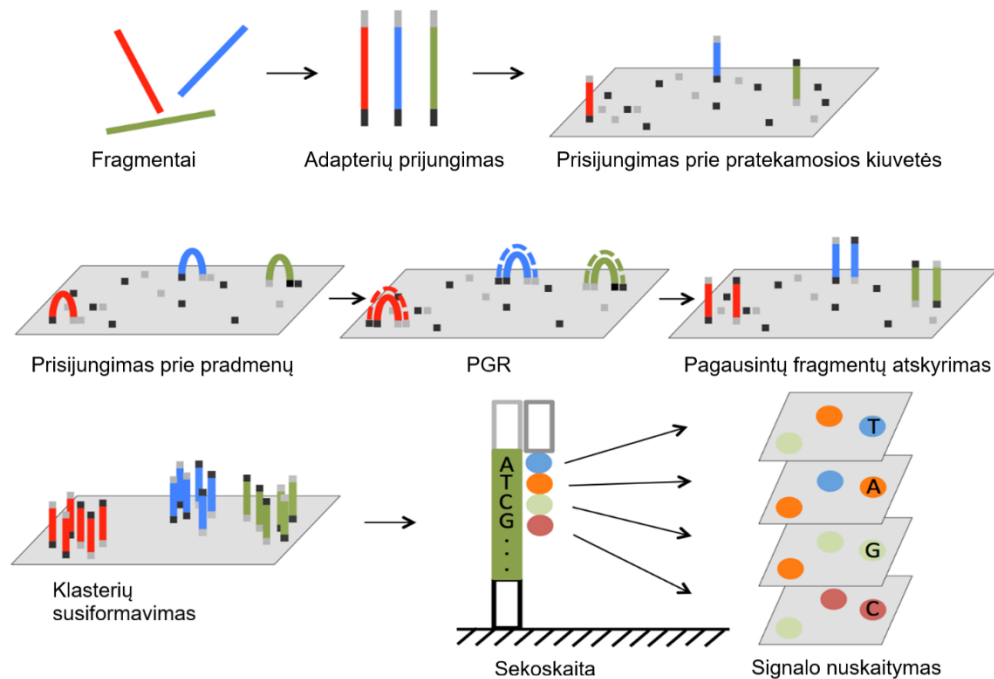
metodas, nes jis yra ekonomiškąs ir paprastas. Realaus laiko PGR tyrimai gali duoti greitus rezultatus, tačiau analizuojamų analičių skaičius yra apribotas turimų reagentų. Kamienų tipavimui vis dažniau naudojama genomo sekoskaita, nes šis metodas suteikia geresnę skiriamąją gebą, lyginant su kitais genotipavimo metodais (Amézquita-López et al., 2018).

Sekoskaitos eros pradžia žymi Fred Sanger 1977 metais sukurtas DNR grandinės terminacijos metodas. Tai yra pirmasis nukleorūgščių sekos nustatymo metodas, dabar vadinamas Sengerio sekoskaita. Šiai metodikai reikalingas viengrandės DNR (vgDNR) šablonas, trumpos oligonukleotidinis pradmuo, deoksinukleotidai (dNTP) bei dideoksinukleotidai (ddNTP). Sengerio sekoskaitos technologija yra daug laiko reikalaujantis ir brangus metodas, bet nepaisant to, ši technologija vis dar naudojama ir laikoma auksiniu standartu (Burian et al., 2021; Akaçin et al., 2022). Šiuo metu DNR sekoskaitos technologijos yra skirstomos į tris kartas. Pirmosios kartos metodai yra pagrįsti DNR grandinės terminacijos reakcija (Sengerio sekoskaita), o nuskaitymų fragmentų ilgis gali siekti 500–1000 bazių porų (bp). Antros kartos sekoskaita, dar žinoma kaip naujos kartos sekoskaita (NKS), apima pirosekoskaitą, sekoskaitą sintezės būdu ir sekoskaitą ligavimo būdu. Trečiosios kartos technologija yra paremta vienos molekulės sekoskaita (Akaçin et al., 2022).

Antros kartos sekoskaitos metodai iš esmės pakeitė DNR sekos nustatymą, nes vienu metu galima nustatyti nuo tūkstančių iki milijonų DNR fragmentų (Satam et al., 2023). Pirmoji NKS technologija pristatyta 2005 m. – Roche 454 platforma, paremta pirosekoskaitos principu, kur seka identifikuojama nustatant pirofosfato išsiskyrimą, kai į DNR šabloną pridedami nukleotidai. Vienas iš Roche 454 platformos plusų – ilgų fragmentų (apie 700 bp) nuskaitymas, kas nebūdinga kitoms antros kartos sekoskaitos platformoms. Nepaisant to, pirosekoskaitos metodas turėjo nemažai trūkumų (didelis klaidų dažnis, kaina), todėl 2013 m. nutraukta Roche 454 platformos gamyba (Slatko et al., 2018; Akaçin et al., 2022). Kitos NKS priskiriamos platformos: SOLiD, Ion Torrent bei Illumina. SOLiD sekoskaitos platforma taiko ligavimu pagrįstą metodą, o Ion Torrent ir Illumina paremtos sekoskaita sintezės principu, kuris apima nuo DNR polimerazės priklausomą nukleotidų įtraukimą į sintetinamą DNR grandinę (Hu et al., 2021). Ion Torrent yra pirmoji NKS platforma, kuri nenaudoja optinių jutiklių, o sekos nustatymas yra paremtas H⁺ jonų aptikimu DNR sintezės metu (Goodwin et al., 2016).

Illumina buvo pristatyta 2006 m. ir iki šiol laikoma viena pagrindinių naujos kartos sekoskaitos platformų. Technologija naudoja sekoskaitos pagal sintezę metodą, pagrįstą grįžtamais, fluorescencinę žymę turinčiais terminatoriais, metodo principas pateiktas *1.4 paveiksle*. Illumina taip pat būdingas porinis sekos nuskaitymas, t.y. vyksta iš abiejų DNR fragmento galų, o tai padeda generuoti aukštos kokybės sekas. Illumina platforma laikoma tiksliausia sekos nustatymo

technologija rinkoje, kurios klaidų lygis yra 0,1 % (būdingos nukleotido pakeitimo klaidos, insercijos ir delecijos labai retos). Nors ilgas veikimo laikas yra laikomas vienu iš Illumina platformų trūkumu, naujesni modeliai pasižymi trumpesniu laiku, bet išlaiko aukštą kokybę ir tikslumą (Hu et al., 2021; Akaçin et al., 2022; Satam et al., 2023).



1.4 pav. Illumina platformos veikimo principas. Prie sekos fragmentų galų prijungiami adapteriai. Fragmentai jungiasi prie pratekamosios kiuvetės (ang. *flowcell*) ir vyksta tiltelinė PGR, kurios metu susidaro fragmentų klasteriai. Kiekvieno sekos nustatymo ciklo metu prie augančių grandinių pridedamas vienas fluoroforu prijungtas nukleotidas. Lazeris sužadina visų sekvenuojamų fragmentų fluoroforus, o optinis skaitytuvas surenka signalus iš kiekvieno fragmentų klasterio. Tada sekos nustatymo terminatorius pašalinamas ir prasideda kitas sekos nustatymo ciklas (Lu et al., 2016).

Trečiosios kartos sekoskaitos technologijos siūlo naujus metodus, įveikiančius ankstesnių kartų apribojimus. Šios technologijos suteikia galimybes nuskaityti ilgesnius DNR fragmentus, PacBio arba Oxford Nanopore technologijų platformose fragmento ilgis gali siekti iki 10 kb (Burian et al., 2021; Hu et al., 2021). PacBio platforma naudoja vienos molekulės realaus laiko (SMRT) metodą su fluorescenciniu būdu pažymėtais nukleotidais. Kita technologija – Oxford Nanopore sekoskaita, yra pagrįsta nanoporų technologija, kai vienos grandinės DNR molekulė praeina per nanoporą, o DNR sekai nustatyti matuojami elektros srovės pokyčiai. Kadangi atliekant vienos molekulės sekoskaitą nėra reikalinga fragmento amplifikacija, galima nuskaityti abi DNR grandines suteikiant daugiau informacijos ir padidinant tikslumą (Reuter et al., 2015). Ilgų fragmentų sekoskaitos technologijos pasižymi visapusiška genomo aprėptimi, leidžiančia nustatyti sudėtingus struktūrinius variantus, tokius kaip didelės insercijos, delecijos, inversijos, duplikacijos ir kt. (Satam et al., 2023).

Genomo sekoskaita suteikia neprilygstamą įžvalgą apie patogenų evoliucijos istoriją ir filogenetinius ryšius, atsparumo genų aptikimą bei kitas charakteristikas. Sekoskaita vis dažniau

taikoma patogenų charakterizavimui įvairiose srityse, įskaitant visuomenės sveikatą, maisto saugą ir infekcijų prevenciją (Price et al., 2023). Viso genomo sekoskaita (VGS) yra vienas pagrindinių metodų, atliekant tyrimus su patogenais, sukeliančiais protrūkius. Kadangi kasmet STEC vidutiniškai sukelia 45 su maistu susijusius protrūkius (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC), 2019), izoliuoti kamienai neretai analizuojami atliekant genomo sekoskaitą, kuri suteikia daugiau informacijos nei įprasti metodai. Laboratorijose rutininiai tyrimai atliekami vadovaujantis Tarptautinės standartizacijos organizacijos (ISO) technine specifikacija (TS) 13136:2012 STEC aptikimui ir identifikavimui maisto ir aplinkos mėginiuose. Ši specifikacija skirta tik įprastiniam pagrindinių virulentiškumo genų (t.y. *stx* ir *eae*) aptikimui bei pagrindinių serogrupių (O157, O111, O26, O103 ir O145) nustatymui. Standartinė procedūra neaprašo kitų serogrupių ir kitų virulentiškumo genų nustatymo, tuo tarpu sekoskaita leidžia nustatyti didesnę serotipų ir virulentiškumo genų įvairovę bei identifikuoti naujas STEC padermes (Nouws et al., 2023).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

Tyrimas atliktas Nacionaliniame maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institute, molekulinės biologijos ir GMO tyrimų skyriuje. Instituto darbuotojai mėginių neima, todėl darbe ši dalis nėra aprašoma. Maisto mėginiai pristatomi iš įvairių Lietuvos gamintojų ir maisto įstaigų. Tyrimas atliktas bendradarbiaujant su Maisto produktų mikrobiologinių tyrimų skyriumi.

2.1. Darbe naudota įranga, priemonės, reagentai, bakterijų kultivavimo terpės

Darbe naudota įranga, priemonės ir reagentai pateikti 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Darbe naudota įranga, priemonės ir reagentai

Darbe naudota įranga ir priemonės	Darbe naudoti reagentai
<ul style="list-style-type: none"> ○ Illumina Miseq sekvenatorius ○ QuantStudio7 Real-Time PCR System ○ AB StepOnePlus Real-time PCR System ○ 7500 Real-time PCR System ○ Termocikleris ProFlex 96-well PCR System ○ Fluorimetras „Qubit™ 2.0 ○ Termostatas ○ Spiritinė lemputė ○ Laminarinis boksas ○ Termoblokas ○ Centrifugos ○ Purtyklės ○ 96 šulinėlių mikroplokštelės ○ Mėgintuvėliai ○ 1 µl kilpelės ○ 90 mm Petri lėkštelės ○ Automatinės pipetės, įvairių tūrių ○ Antgaliai su filtrais, įvairių tūrių ○ Šaldytuvas ○ Šaldiklis 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Thermo Scientific™ Maxima™ probe qPCR Master Mix buferinis tirpalas ○ Genų pradmenys ir zondai (sekos pateiktos I priede). ○ QIAGEN „QIAamp DNA Blood Mini Kit“ ○ Zymo „DNA Clean & Concentrator™ – 25 ○ Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit ○ Invitrogen™ Collibri™ ES DNA Library Prep Kit for Illumina™ ○ Invitrogen™ Collibri™ Indexes ○ Invitrogen™ Collibri™ DNA Library Cleanup Kit ○ Invitrogen™ Collibri™ Library Quantification Kit ○ 0,2 N NaOH tirpalas

Darbe naudotos bakterijų kultivavimo terpės:

- Buferinis peptono vanduo (BPV) (10 g peptono, 5 g NaCl, 3,5 g Na₂HPO₄, 1,5 g KH₂PO₄, terpės pH 7,0 ± 0,2)
- Triptono sojos agaras (TSA) (15 g kazeino peptono, 15 g agaro, 5 g NaCl, 5 sojos peptono, terpės pH 7,3 ± 0,2).

- Triptono tulžies X-gliukoronido agaras (TBX) (20 g fermentinio kazeino hidrolizato, 15 g agaro, 1,5 g tulžies druskų, 0,075 g X-β-D-gliukurono rūgšties, terpės pH 7,0 ± 0,2).
- Sorbitolio MacConkey agaras (SMAC) (20 g peptono, 15 g agaro, 10 g sorbitolio, 5 g NaCl, 1,5 g tulžies druskų, 0,03 g neutralaus raudonojo, 0,001 g kristalvioleto, terpės pH 7,1 ± 0,2).
- Sorbitolio MacConkey agaras su cefiksimu ir teluritu (CT-SMAC) (20 g peptono, 15 g agaro, 10 g sorbitolio, 5 g NaCl, 2,5 g kalio telurito, 1,5 g tulžies druskų, 0,05 g cefiksimo, 0,03 g neutralaus raudonojo, 0,001 g kristalvioleto, terpės pH 7,1 ± 0,2).
- Ramnozės MacConkey agaras (RMAC) (20 g ramnozės, 15 g peptono, 12 g agaro, 5 g NaCl, 1,5 g tulžies druskų, 0,03 g neutralaus raudonojo, 0,001 g kristalvioleto, terpės pH 7,1 ± 0,2).

2.2. Darbe taikyti metodai

2.2.1. STEC aptikimas pagal ISO/TS 13136:2012

STEC aptikimas jautienoje ir jos gaminiuose atliekamas remiantis ISO/TS 13136:2012 standartine procedūra, atliekami šie etapai:

- 1) Maisto mėginys užsėjamas BPV terpėje santykiu 1:9, t.y. 325 g mėginio ir 2925 g terpės. Pagausinimas vyksta 18 – 24 val. 37 °C ± 1 °C.
- 2) Po pagausinimo atliekamas DNR išskyrimas iš terpės (tiriamas kiekis – 1 ml). Detali DNR išskyrimo eiga pateikta 2 priede.
- 3) Stx toksinų, būdingų STEC, nustatymas atliekamas RL-PGR metodu, ieškomi *stx1* ir *stx2* genai.
 - a) PGR reakcijos mišinys ruošiamas naudojant Thermo Scientific™ Maxima™ probe qPCR Master Mix buferinį tirpalą, pradmenis ir zondus. Stx toksinų genų pradmenų ir zondų sekos pateiktos 1 priede.
 - b) Reakcijos mišinio sudėtis vienai reakcijai: 12,5 μl RL-PGR buferinio tirpalo, 2,5 μl pradmenų ir zondo mišinio (10x), 5 μl dej. H₂O.
 - c) PGR reakcijai naudojamos 96 šulinėlių mikroplokštelės, prieš įnešant į šulinėlį mėginius ir teigiamą kontrolę, jie yra gerai sumaišomi ant purtyklės ir nucentrifiguojami. Į mikroplokštelės šulinėlius įpilama po 20 μl reakcijos mišinio, pridedama po 5 μl mėginio arba teigiamos/neigiamos kontrolės. RL-PGR temperatūrinis režimas pateiktas 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. RL-PGR temperatūrinis režimas.

Žingsnis	Temperatūra	Trukmė	Ciklų skaičius
DNR pirminė denatūracija	95 °C	10 min.	
DNR denatūracija kiekviename cikle	95 °C	1 min.	45
Pradmenų prikibimas/DNR sintezė	60 °C	1 min.	

- d) Reakcija laikoma teigiama, kai amplifikacijos kreivė ženkliai viršija slenkstinę ribą, bei akivaizdžiai iškyla virš neigiamos kontrolės amplifikacijos kreivės.
- e) Jei mėginyje nustatomas *stx1* ir/arba *stx2* genas, atliekama patogeno izoliacija.
- 4) Patogeno izoliacijai atliekami šie veiksmai:
- Mėginiai, kuriuose buvo aptikti *stx* genai, užsėjami ant atrankiųjų terpių: TBX, SMAC, CT-SMAC, RMAC (terpių sudėtys pateiktos 2.1 skyriuje). Inkubuojama 37 °C ± 1 °C, 24 val.
 - Atrenkama iki penkiasdešimt kolonijų, kurioms būdinga tipinė *E. coli* morfologija, pavienės kolonijos pagausinamos ant TSA terpės (sudėtis pateikta 2.1 skyriuje) ir taip pat perkeliamos į mėgintuvėlį su distiliuotu vandeniu. Viename mėgintuvėlyje negali būti daugiau nei 10 kolonijų.
- 5) Atliekamas DNR išskyrimas, etapai pateikti 2 priede.
- 6) Atliekamas *stx1*, *stx2* ir *eae* genų nustatymas RL-PGR metodu. Eiga tokia pati kaip pateikta šio skyrelio 3 etape (a – e žingsniai).
- 7) Nustačius genus, atitinkamo mėgintuvėlio kolonijos pagausinamos ant TSA terpės, inkubuojama 37 °C ± 1 °C, 18 – 24 val. Po inkubacijos pakartojamas *stx1*, *stx2* ir *eae* genų nustatymas RL-PGR metodu. Eiga tokia pati kaip pateikta šio skyrelio 3 etape (a – e žingsniai).
- 8) Izoliuotoms teigiamoms kolonijoms nustatoma serogrupė, atliekamas RL-PGR ir ieškoma specifinių O antigeno genų. ISO/TS 13136:2012 standartas aprašo O26, O103, O111, O145, O157 serograpių aptikimą, papildomai nustatomos dar devynios serogrupės (O45, O55, O80, O91, O104, O113, O121, O128, O146). O antigeno specifinių genų pradmenų ir zondų sekos pateiktos 1 priede. PGR eiga tokia pati kaip pateikta šio skyrelio 3 etape (a – e žingsniai).

Atrinktos teigiamos kolonijos toliau ruošiamos sekoskaitai (kolonijos auginamos ant TSA terpės) arba gali būti šaldomos – 80 °C.

2.2.2. Bakterijų kultūros paruošimas sekoskaitai

2.2.2.1. DNR išskyrimas iš bakterijų kultūros

DNR išskyrimui naudojamas QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini Kit komercinis rinkinys ir atliekami šie etapai:

- 1) Į 1,5 ml mėgintuvėlį įpilama 200 µl PBS ir pridedama apie 10 pavienių kolonijų, sumaišoma. Į švarų 1,5 ml mėgintuvėlį įpilama 20 µl proteazės, į jį perkeliamas PBS mišinys su bakterijų kultūra. Į mėgintuvėlį įpilama 200 µl AL buferio ir sumaišoma ~15 s, inkubuojama ~56°C temperatūroje ~10 min.
- 2) Mėgintuvėlis trumpai nucentrifuguojamas lašų pašalinimui. Pridedama 200 µl etanolio (96 – 100 %) ir sumaišoma maišykle ~15 s. Gautas mišinys pernešamas į kolonėlę ir centrifuguojamas 8000 rpm ~1 min. Nucentrifugavus kolonėlę perkeliama į naują mėgintuvėlį, o filtratas išmetamas.
- 3) Į kolonėlę įnešama 500 µl AW1 buferio ir centrifuguojama 8000 rpm ~1 min. Nucentrifugavus kolonėlę pernešama į naują mėgintuvėlį, o filtratas pašalinamas.
- 4) Į kolonėlę įnešama 500 µl AW2 buferio ir centrifuguojama maksimaliu greičiu ~3 min. Nucentrifugavus kolonėlę perkeliama į naują mėgintuvėlį, o filtratas pašalinamas. Kolonėlės dar kartą centrifuguojamos maksimaliu greičiu ~3 min. tam, kad pašalinti AW2 buferinio tirpalo likučius.
- 5) Kolonėlę perkeliama į naują 1,5 ml mėgintuvėlį. Įnešama 200 µl dejonizuoto vandens ir inkubuojama kambario temperatūroje ~1 min. Mėgintuvėliai centrifuguojami 8000 rpm ~1 min. ir kolonėlė išmetama.
- 6) Gautas DNR tirpalas valomas su Zymo „DNA Clean & Concentrator™ – 25“ rinkiniu – visas DNR eliuatas sumaišomas su dvigubu tūriu „DNA Binding Buffer“ pasirinkto tūrio mėgintuvėliuose ir sunešamas ant kolonėlių. Centrifuguojama >10 000 rpm, ~30 s.
- 7) Kolonėlės perkeliamos į švarius centrifugavimo mėgintuvėlius, o filtratas išmetamas. Šis žingsnis kartojamas tol, kol ant kolonėlės sunešamas visas turimas tirpalas.
- 8) Ant kolonėlės užnešama 400 µl “DNA Wash Buffer” tirpalo. Centrifuguojama >10 000 rpm, ~1 min. Kolonėlės perkeliamos į švarius centrifugavimo mėgintuvėlius, o filtratas išmetamas. Kolonėlės dar kartą centrifuguojamos >10 000 rpm, ~1min. tam, kad pasišalintų “DNA Wash Buffer ” tirpalo likučiai. Kolonėlės perkeliamos į švarius 1,5 ml arba 2 ml mėgintuvėlius, o filtratas išmetamas.
- 9) Ant kolonėlių užnešama apie 70 µl dejonizuoto vandens, centrifuguojama >10 000 rpm ~1 min. Gautame tirpale gaunama išgryninta DNR. Gautos DNR koncentracija matuojama Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit rinkiniu.

- 10) Koncentruotas dažas sumaišomas su skiedimo buferiu santykiu 1:199 vienai reakcijai (gaunamas darbinis tirpalas).
- 11) Į koncentracijos matavimui skirtą mėgintuvėlį įpilama 199 µl darbinio tirpalo ir 1 µl DNR tirpalo. Viskas sumaišoma ir inkubuojama kambario temperatūroje, tamsoje apie 2 – 5 min.
- 12) Koncentracija matuojama su fluorimetru.

2.2.2.2. Bibliotekos ruošimas

Biblioteka ruošama naudojant Invitrogen™ Collibri™ ES DNA Library Prep Kit for Illumina™ rinkinį.

- 1) Šaldomame stovelyje ruošiamas DNR fragmentacijos tirpalas: 25 µl 10mM Tris-HCl (pH 7,5 – 8,5), 5 µl „10X Fragmentation and dA-tailing“ buferinio tirpalo (mėlynas) ir 10 µl DNR. Tirpalas sumaišomas ir trumpai nucentrifuguojamas. Gaunamas šviesiai mėlynas tirpalas. Į gautą tirpalą pridedama 10 µl fermento „5X Fragmentation and dA-tailing Enzyme Mix“ (skaidrus). Tirpalas gerai sumaišomas ir trumpai nucentrifuguojamas ir toliau laikomas šaldomame stovelyje.
- 2) Fragmentacija atliekama termocikleryje, detalus temperatūrinis režimas nurodytas 2.3 lentelėje.

2.3 lentelė. Fragmentacijos temperatūrinis režimas.

Žingsnis	Temperatūra	Trukmė
Šaldymas	4 °C	3 min.
Fragmentacija	37 °C	30 min.
dA-uodegos formavimas	65 °C	10 min.
Inkubacija	4 °C	∞

- 3) Prie fragmentuotos DNR liguojami dvigubi indeksai-adapteriai (Collibri™ Dual-Indexed indeksų plokštelė): reakcijai naudojama 10 µl dvigubo indekso-adapterio (geltonas tirpalas) ir 50 µl fragmentuotos-dA uodegos DNR mėginio (gaunamas žalias tirpalas). Į gautą mišinį pridedama 10 µl „7X Ligation Master Mix“ (raudonas tirpalas), viskas sumaišoma, gautas (violetinis) tirpalas inkubuojamas termocikleryje be dangčio 20 °C temperatūroje 30 min.

2.2.2.3. DNR valymas ir bibliotekos fragmentų ilgio parinkimas

Procedūros metu iš prie DNR adapterio prijungto mėginio pašalinami mažesni ir ilgesni bibliotekos fragmentai, kad būtų sukurta norimo fragmento ilgio biblioteka, šiuo atveju procedūra aprašyta siekiant gauti 350 bp ilgio bibliotekos fragmentus.

- 1) Indeksuotas DNR mėginys (70 μ L) sumaišomas su 60 μ L magnetinių dalelių tirpalu „DNA Cleanup Beads“. Tirpalas sumaišomas ir inkubuojamas ~5 min. kambario temperatūroje.
- 2) Mėgintuvėliai įdedami į magnetinį stovėlį ir laikomi ~2 min. arba kol susiformuos nuosėdų granulė.
- 3) Laikant mėgintuvėlius magnetiniame stovelyje, pipete atsargiai pilnai pašalinamas supernatantas. Įpilama 200 μ l plovimo buferio (iš anksto sumaišyto su etanolio), tada inkubuojama ~30 s. kambario temperatūroje. Negalima suspenduoti magnetinių granulių plovimo buferyje. Naudojantis pipete pašalinamas supernatantas. Plovimo etapas pakartojamas dar kartą.
- 4) Kad pašalinti likusį etanolį, mėgintuvėliai trumpai centrifuguojami ir vėl įdedami atgal į magnetinį stovėlį, tada atsargiai pipete pašalinamas likęs supernatantas, nepažeidžiant nuosėdų granulės.
- 5) Laikant mėgintuvėlius magnetiniame stovelyje, magnetinės nuosėdų granulės džiovinamos ore ~2 min. kambario temperatūroje arba tol, kol ant mėgintuvėlio sienelių neliks etanolio lašelių.
- 6) Mėgintuvėliai išimami iš magnetinio stovelio, įpilama 105 μ l eliucijos buferio, tada suspensija gerai sumaišoma ir inkubuojama ~1 min. kambario temperatūroje.
- 7) Mėgintuvėliai įdedami į magnetinį stovėlį ~2 minutėms arba tol, kol susiformuos nuosėdų granulė. Neišimant mėgintuvėlių iš magnetinio stovelio, paimama 100 μ l supernatanto (t. y. eliuato) ir perkeliama į naują 1,5 ml mėgintuvėlį.
- 8) Į gautą eliuatą įpilama 45 μ l „DNA Cleanup Beads“ ir maišoma, kol gausis vienalytė suspensija. Tirpalas inkubuojamas ~5 min. kambario temperatūroje.
- 9) Mėgintuvėliai įdedami į magnetinį stovėlį ~2 min. arba tol, kol susiformuos nuosėdų granulė. Laikant mėgintuvėlius magnetiniame stovelyje, visas supernatantas atsargiai nusiurbiamas ir perkeliamas į švarų mėgintuvėlį.
- 10) Į gautą eliuatą įpilama 20 μ l „DNA Cleanup Beads“ ir maišoma, kol gausis vienalytė suspensija. Mėginiai inkubuojami ~5 min. kambario temperatūroje.
- 11) Mėgintuvėliai įdedami į magnetinį stovėlį ir laikomi ~2 min. arba kol susiformuos nuosėdų granulė. Laikant mėgintuvėlius magnetiniame stovelyje, pipete atsargiai pašalinamas supernatantas.
- 12) Laikant reakcijos mėgintuvėlius magnetiniame stovelyje, įpilama 200 μ l plovimo buferio (iš anksto sumaišyto su etanolio), inkubuojama ~30 s. kambario temperatūroje. Naudojantis pipete pašalinamas supernatantas. Plovimo etapas pakartojamas dar kartą.

- 13) Kad pašalinti likusį etanolį, mėgintuvėliai trumpai centrifuguojami ir vėl įdedami atgal į magnetinį stovėlį, tada atsargiai pipete pašalinamas likęs supernatantas, nepažeidžiant nuosėdų granulės.
- 14) Laikant mėgintuvėlius magnetiniame stovelyje, magnetinės nuosėdų granulės džiovinamos ore ~1 min. kambario temperatūroje arba tol, kol ant mėgintuvėlio sienelių neliks etanolio lašelių. Neinkubuoti ilgiau nei 5 min., nes taip sumažinamas eliacijos efektyvumas.
- 15) Mėgintuvėliai išimami iš magnetinio stovelio, įpilama 25 µl eliacijos buferio, tada suspensija gerai sumaišoma ir inkubuojama ~1 min. kambario temperatūroje.
- 16) Mėgintuvėliai įdedami į magnetinį stovėlį ~2 minutėms arba tol, kol susiformuos nuosėdų granulė. Neišimant mėgintuvėlių iš magnetinio stovelio nusiurbiamas 22 – 23 µl supernatanto ir perkeliama į naują mėgintuvėlį.

2.2.2.4. Bibliotekos PGR amplifikacija ir valymas

- 1) Naujuose PGR mėgintuvėliuose ruošiamas indeksuotos ir su adapteriais liguotos DNR ir amplifikacijos komponentų mišinys: 20 µl DNR biblioteka (skaidrus tirpalas), 25 µl „2X Library Amplification Master Mix“ (mėlynas tirpalas), 5 µl „Primer Mix“ (geltonas tirpalas), viskas sumaišoma, gaunamas žalias tirpalas.
- 2) Amplifikacija vykdoma termocikleryje, temperatūrinis režimas pateiktas 2.4 lentelėje.

2.4 lentelė. Amplifikacijos temperatūrinis režimas.

Žingsnis	Ciklų skaičius	Temperatūra	Trukmė
Fermento aktyvacija	1	98 °C	30 s
Denatūracija	7	98 °C	15 s
Pradmenų prikibimas		60 °C	30 s
Elongacija		72 °C	30 s
Elongacija	1	72 °C	1 min.
Šaldymas	1	4 °C	∞

- 3) Amplifikuotos DNR bibliotekos mėginys (50 µl) sumaišomas su 40 µl magnetinių dalelių tirpalu „DNA Cleanup Beads“ ir inkubuojama ~5 min. kambario temperatūroje. Nelaikyti ilgiau nei 5 min., nes tai gali sumažinti išeią.
- 4) Mėgintuvėlis įdedamas į magnetinį stovėlį ir laikomi ~2 min. arba kol susiformuos nuosėdų granulė. Laikant mėgintuvėlius magnetiniame stovelyje, pipete atsargiai pašalinamas supernatantas.
- 5) Mėgintuvėlis išimamas iš magnetinio stovelio ir pridodama 50 µl eliacijos buferio, gerai sumaišoma ir inkubuojama ~1 min. kambario temperatūroje. Į tą patį mėgintuvėlį įpilama

50 µl magnetinių dalelių tirpalo „DNA Cleanup Beads“, sumaišoma, ir inkubuojama ~5 min. kambario temperatūroje.

- 6) Mėgintuvėliai įdedami į magnetinį stovėlį ir laikomi ~2 min. arba kol susiformuos nuosėdų granulė. Laikant mėgintuvėlius magnetiniame stovelyje, pipete atsargiai pašalinamas supernatantas.
- 7) Laikant reakcijos mėgintuvėlius magnetiniame stovelyje, įpilama 200 µl plovimo buferio (iš anksto sumaišyto su etanolio), inkubuojama ~30 s. kambario temperatūroje. Naudojantis pipete pašalinamas supernatantas. Plovimo etapas pakartojamas dar kartą.
- 8) Kad pašalinti likusį etanolį, mėgintuvėliai trumpai centrifuguojami ir vėl įdedami atgal į magnetinį stovėlį, tada atsargiai pipete pašalinamas likęs supernatantas, nepažeidžiant nuosėdų granulės.
- 9) Laikant mėgintuvėlius magnetiniame stovelyje, magnetinės nuosėdų granulės džiovinamos ore ~1 min. kambario temperatūroje arba tol, kol ant mėgintuvėlio sienelių neliks etanolio lašelių. Neinkubuoti ilgiau nei 5 min., nes taip sumažinamas eliacijos efektyvumas.
- 10) Mėgintuvėliai išimami iš magnetinio stovelio, įpilama 25 µl eliacijos buferio, suspensija gerai sumaišoma ir inkubuojama ~1 min. kambario temperatūroje. Mėgintuvėliai įdedami į magnetinį stovėlį ~2 minutėms arba tol, kol susiformuos nuosėdų granulė. Neišimant mėgintuvėlių iš magnetinio stovelio nusiurbiamas 22 – 23 µl supernatanto ir perkeliama į naują mėgintuvėlį.
- 11) Gautos bibliotekos DNR koncentracija matuojama Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit rinkiniu. Koncentruotas dažas sumaišomas su skiedimo buferiu santykiu 1:199 vienai reakcijai (gaunamas darbinis tirpalas).
- 12) Į koncentracijos matavimui skirtą mėgintuvėlį įpilama 199 µl darbinio tirpalo ir 1 µl DNR tirpalo. Viskas sumaišoma ir inkubuojama kambario temperatūroje, tamsoje apie 2 – 5 min.
- 13) Koncentracija matuojama su fluorimetru.

2.2.2.5. Bibliotekos koncentracijos nustatymas RL-PGR

Bibliotekos koncentracijos nustatymui ir skiedimui naudojamas Invitrogen™ Colibri™ Library Quantification Kit rinkinys.

- 1) Bibliotekos skiedžiamos santykiu 1:10 000 ir 1:100 000. Taip pat galima naudoti kitus skiedimus, tačiau analizuojant duomenis yra svarbu, kad bent vienas skiedimo taškas atitiktų Colibri™ DNA standartų diapazoną (20 – 0,0002 pM).

- 2) Ruošiamas pradinis bibliotekos mėginio skiedimas santykiu 1:100. Į mėgintuvėlį įpilama 2 µl bibliotekos ir 198 µl Collibri™ skiedimo buferio. Tirpalas gerai sumaišomas ir trumpai nucentrifuguojamas.
- 3) Ruošiamas 1:10 000 skiedimas: įpilama 2 µl 1:100 skiedimo (iš 2 žingsnio) ir 198 µl Collibri™ skiedimo buferio. Tirpalas gerai sumaišomas ir trumpai nucentrifuguojamas.
- 4) Ruošiamas 1:100 000 skiedimas: įpilama 10 µl 1:10 000 skiedimo (iš 3 žingsnio) ir 90 µl Collibri™ skiedimo buferio. Tirpalas gerai sumaišomas ir trumpai nucentrifuguojamas.
- 5) PGR reakcijai naudojami skiedimai 1:10 000 ir 1:100 000.
- 6) Ruošiamas PGR mišinys: kiekvienai reakcijai imama 16 µl Collibri™ Quantification Master Mix (mėlynas tirpalas) ir 4 µl mėginio/DNR standarto po tris pakartojimus. RL-PGR temperatūrinis režimas pateiktas 2.5 lentelėje.

2.5 lentelė. RL-PGR temperatūrinis režimas.

Žingsnis	Ciklų skaičius	Temperatūra	Trukmė
Pradinė denatūracija	1	95 °C	2 min.
Denatūracija	35	95 °C	30 s
Pradmenų prikibimas/DNR sintezė		60 °C	45

- 7) Gauta koncentracija perskaičiuojama į nM įvertinant bibliotekos ilgį ir naudotą skiedimą:
 - a. Mėginys A (1:10000) = (Quantity Mean) pM×10000x(387/350)×10⁻⁴= koncentracija nM
 - b. Mėginys A (1:100000) = (Quantity Mean) pM×100000x(387/350)×10⁻⁴= koncentracija nM
- 8) Biblioteka dejonizuotu vandeniu skiedžiama iki 4 nM. Praskiesta biblioteka denatūruojama sumaišant 5 µl 0,2N NaOH tirpalo ir 5 µl bibliotekos tirpalo. Gautas tirpalas sumaišoma pipete arba purtykle ir nucentrifuguojamas. Tirpalas inkubuojamas kambario temperatūroje ~5 min. Po inkubacijos į tirpalą pridedama 990 µl HT1 buferio ir gerai sumaišoma.
- 9) Paruoštos bibliotekos sekoskaita atliekama su Illumina MiSeq analizatoriumi. Į MiSeq sekoskaitos kasetę įpilama 600 µl galutinio tirpalo.

2.2.3. Analizė bioinformatikos įrankiais

Po sekoskaitos vienam kamienui gaunami 2 failai: R1 ir R2. Gauti duomenys analizuojami naudojant šias platformas ir įrankius:

- 1) Galaxy (Sciensano) arba Galaxy (ARIES):

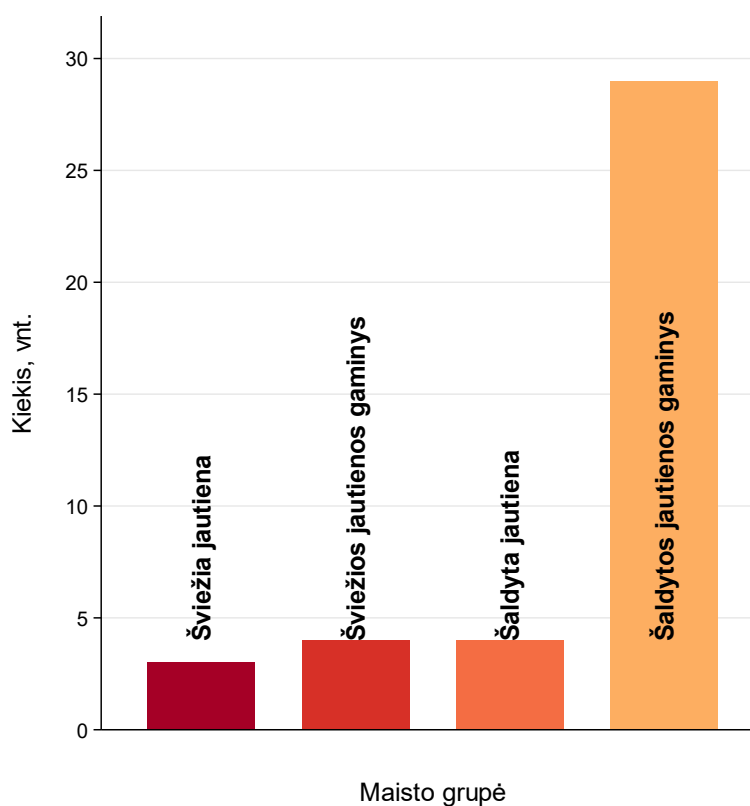
- a. Sekų kokybės patikra su FastQC. Tolimesnei analizei atrenkamos tik aukštos kokybės sekos. Kokybės patikros analizės pavyzdys pateiktas *3 priede*.
 - b. Adapterių ir žemos kokybės sekų pašalinimas su Trimmomatic.
 - c. Genomo regionų surinkimas su Assembly SPAdes.
 - d. STEC pipeline 1.0 (tik Galaxy Sciensano) – atlieka aukščiau paminėtas funkcijas, virulentiškumo genų, serotipo, atsparumo antibiotikams analizę.
- 2) Center for Genomic Epidemiology (Nacionalinio maisto instituto ir Danijos technikos universiteto analizės sistema)
- a. ResFinder 4.5.0 – atsparumo antibiotikams genų nustatymas.
 - b. VirulenceFinder 2.0 – virulentiškumo genų nustatymas.
 - c. SerotypeFinder 2.0 – serotipo nustatymas pagal O ir H antigenus.

Šios analizės buvo atliktos standartiniais parametrais: sekos panašumas 90 % ir minimalus genų ilgio persidengimas 60 %. Šie parametrai taikytis visiems analizės įrankiams. Serotipo bei atsparumo antibiotikams genų buvimas patvirtinamas tuo atveju, kai nustatytas sekų panašumas ir persidengimas > 90 %. Virulentiškumo genų buvimas patvirtinamas tuo atveju, kai nustatytas sekų panašumas ir persidengimas > 98 %.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. STEC jautienoje ir jos gaminiuose 2020 – 2024 m.

NMVRVI Molekulinės biologijos ir GMO tyrimų skyriuje atliekant rutininius STEC identifikavimo maisto produktuose tyrimus, 2020 – 2024 metais iš viso nustatyta 40 maisto taršos STEC bakterijomis atvejų. Visi iš jų nustatyti jautienoje ir jos gaminiuose (3.1 pav). Remiantis Airijos sveikatos centro duomenimis, STEC dažniau aptinkama smulkintoje jautienoje nei jautienos skerdenoje (Health Protection Surveillance Centre (HPSC), 2005). Šiame darbe taip pat pastebėta tokia tendencija, didžiausia tarša nustatyta šaldytos jautienos gaminiuose (smulkinta jautiena mėšainiams), STEC aptikta 29 produktuose. Kitose maisto grupėse nustatyta žymiai mažiau STEC atvejų (3 – 4).



3.1 pav. Teigiamų STEC atvejų pasiskirstymas pagal maisto grupę.

Atliekant patogeno izoliaciją pagal ISO/TS 13136:2012 standartą, gautos 28 STEC bakterijų kultūros, tai sudaro 70 % bendro teigiamų mėginių kiekio. Nepavykusią izoliaciją gali lemti maisto produktuose esantis per mažas bakterijų kiekis arba jos buvo negyvybingos dėl apdorojimo metu taikytų sąlygų (Rivas et al., 2015). Taip pat yra įrodyta, kad jautienos ar jos produkto užšaldymas nedaro tiesioginės įtakos izoliacijai, kai kurie STEC kamienai gali išgyventi žemoje temperatūroje kelis mėnesius (Castro et al., 2017). Didžioji dalis STEC taršos atvejų aptikta šaldytoje jautienoje (ar jos gaminiuose), o atliekant patogeno izoliaciją gautos 24 STEC kultūros.

Toliau darbe pateikta 20 kamienų, kuriems suteikti pavadinimai GS01 – 20, analizė. Analizuojami tik tie kamieniai, kurių sekoskaitos metu gautos sekos atitinka kokybės patikros (FastQC) keliamus reikalavimus.

3.2. Šiga toksino tipai ir potipiai

STEC kamieniai gali išskirti Stx1, Stx2 arba abiejų tipų toksinus (Etcheverría and Padola, 2013). Šiame darbe Šiga toksino tipas buvo nustatomas atliekant RL-PGR, o toksino potipis nustatytas atliekant tikslesnę analizę pagal sekoskaitos duomenis. RL-PGR metodu nustatyta, kad 1 tipo toksinas (Stx1) aptiktas 60 % (n = 12) kamienų, 2 tipo toksinas (Stx2) aptiktas 90 % (n = 18) kamienų, o 50 % (n = 10) visų kamienų išskiria abu toksino tipus (Stx1 ir Stx2) (3.1 lentelė).

3.1 lentelė. Kamieniuose aptikti Šiga toksinai ir jų potipiai

Kamienas	Šiga toksino tipas/potipis	
	RL-PGR	Sekoskaita
GS01	<i>stx2</i>	<i>stx2a</i>
GS02	<i>stx2</i>	<i>stx2d</i>
GS03	<i>stx1</i>	<i>stx1a</i>
GS04	<i>stx1, stx2</i>	<i>stx1a, stx2a</i>
GS05	<i>stx2</i>	<i>stx2c</i>
GS06	<i>stx1</i>	<i>stx1a</i>
GS07	<i>stx2</i>	<i>stx2d</i>
GS08	<i>stx2</i>	<i>stx2d</i>
GS09	<i>stx1, stx2</i>	<i>stx1a, stx2a</i>
GS10	<i>stx1, stx2</i>	<i>stx1a, stx2a</i>
GS11	<i>stx2</i>	<i>stx2a</i>
GS12	<i>stx1, stx2</i>	<i>stx1a, stx2a</i>
GS13	<i>stx1, stx2</i>	<i>stx1a, stx2d</i>
GS14	<i>stx2</i>	<i>stx2f</i>
GS15	<i>stx1, stx2</i>	<i>stx1a, stx2a</i>
GS16	<i>stx1, stx2</i>	<i>stx1a, stx2a</i>
GS17	<i>stx2</i>	<i>stx2e</i>
GS18	<i>stx1, stx2</i>	<i>stx1c, stx2b</i>
GS19	<i>stx1, stx2</i>	<i>stx1a, stx2c</i>
GS20	<i>stx1, stx2</i>	<i>stx1a, stx2c</i>

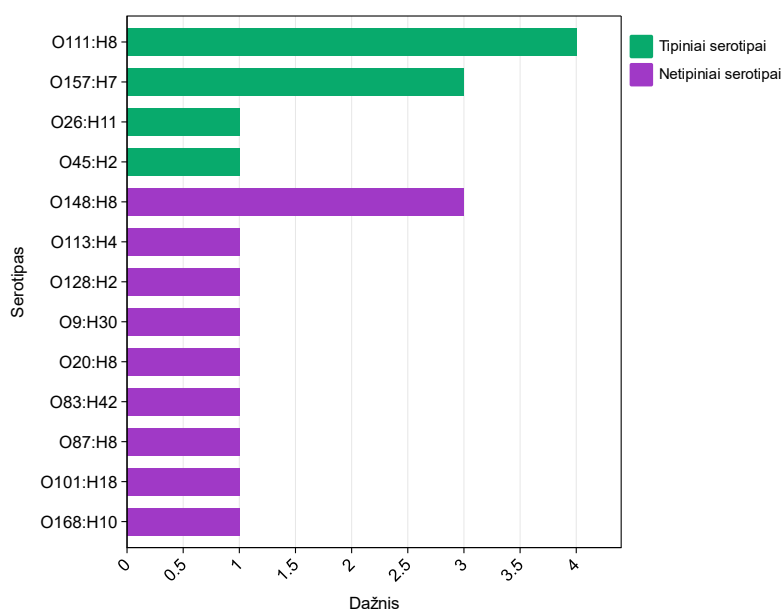
Šiga toksino potipio nustatymui panaudotas Galaxy platformos įrankis STEC pipeline 1.0, identifikuoti 2 Stx1 potipiai (a ir c), bei 6 Stx2 potipiai (a, b, c, d, e, f). RL-PGR metodu nustatytas toksino tipas sutampa su sekoskaitos duomenų analize. Lyginant Šiga toksino genų profilius, dažniausiai aptikta *stx1a, stx2a* (30 %, n = 10) kombinacija, rečiausios kombinacijos: *stx2c* (5 %, GS05); *stx2f* (5 %, GS14); *stx2e* (5%, GS17); *stx1a, stx2d* (5 %, GS13); *stx1c, stx2b* (5 %, GS18).

Nemažai tyrimų aprašo sąsają tarp Šiga toksino potipio ir ligos sunkumo. Literatūroje teigiama, kad tam tikri abiejų toksinų tipų variantai (Stx1a; Stx2a, Stx2c ir Stx2d) yra susiję su sunkiomis žmonių ligomis (Melton-Celsa, 2014; Travert et al., 2021). Visi keturi paminėti potipiai

arba jų deriniai dažnai aptinkami pacientuose, kuriems infekcija išsivystė į HUS (Bai et al., 2018; Nüesch-Inderbinen et al., 2018; Alconcher et al., 2020). Nepaisant to, pastebėta, kad Stx2 žymiai dažniau siejamas su sunkių ligų išsivystymu nei Stx1 (Persson et al., 2007). Vis dėlto, ne visi Stx2 potipiai pasižymi tokiu pat virulentiškumu. Stx2a dažniausiai siejamas su sunkiomis ligomis ar komplikacijomis (Byrne et al., 2020; Ylinen et al., 2020), o PSO įvardija dar vieną pavojingą potipį – Stx2d, kuris neretai sukelia kraujingą viduriavimą ir HUS (Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food, 2018). Šie du potipiai pasižymi panašiu virulentiškumu ir didesne rizika sukelti HUS (Huang et al., 2021). Svarbu paminėti, kad šiame darbe taip pat izoliuoti kamienai, turintys Stx2a (n = 8) ir Stx2d (n = 4) toksino variantus. Šių kamienų buvimas jautienoje turėtų kelti susirūpinimą, nes jie potencialiai galėtų sukelti rimtus sveikatos sutrikimus.

3.3. Kamienų serotipai

STEC kamienų serogrupių nustatymui taikytas RL-PGR, nustatytos 6 serogrupės: O26 (n = 1), O45 (n = 1), O111 (n = 4), O113 (n = 1), O128 (n = 1), O157 (n = 3), likusiems kamienams serogrupės nustatyti nepavyko. Panaudojant Galaxy platformos įrankį STEC pipeline 1.0, galima identifikuoti ne tik serogrupę, bet ir serotipą (pagal O ir H antigenus). Nustatytų serotipų įvairovė pateikta 3.2 paveiksle.

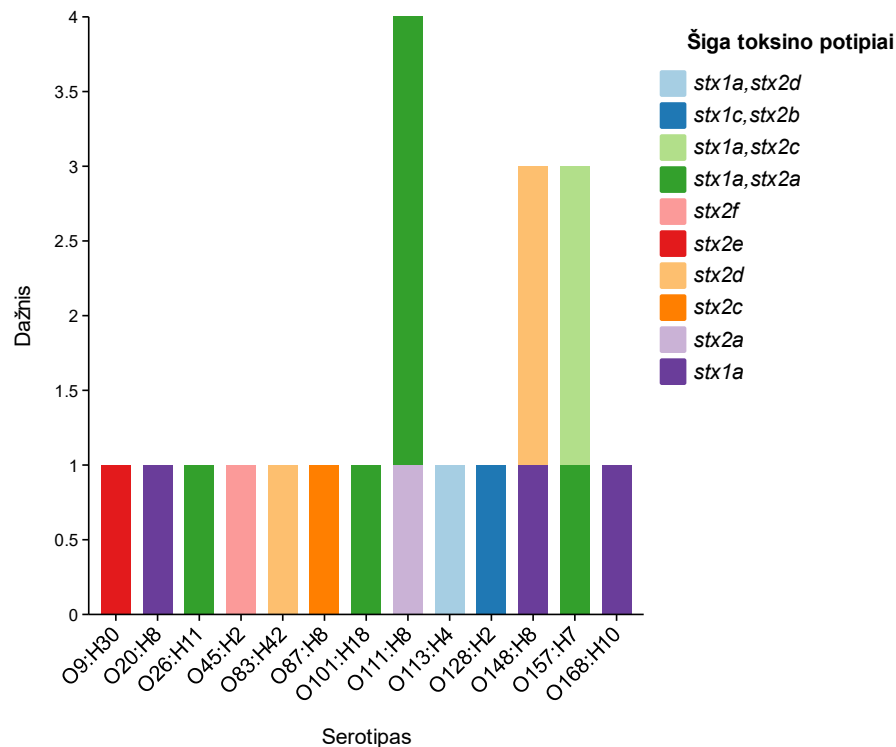


3.2 pav. Nustatytų serotipų įvairovė.

RL-PGR metodu nustatytos serogrupės sutampa su sekoskaitos domenų analize. Šiame darbe izoliuotiems STEC kamienams būdinga 13 serotipų, iš jų 4 (30,8 %) tipiniai ir 9 (69,2 %) netipiniai serotipai. Tipiniams serotipams priskiriama O157:H7 bei „didžiojo šešeto grupė“ (O26, O45, O103, O111, O121, O145). Šios šešios serogrupės turi epidemiologinę svarbą JAV ir visame pasaulyje, nes kasmet sukelia daugybę per maistą plintančių protrūkių (Hines et al., 2017; Scavia et al., 2018).

Šio tyrimo metu aptikti 3 dažniausi serotipai: O111:H8 (n = 4), O148: H8 (n = 4) ir O157:H7 (n = 3), šie kamienai dažniausiai izoliuojami iš galvijų ar jautienos ir kitose šalyse (Prancūzija, Brazilija ir kt.) (Espíe et al., 2006; Tristão et al., 2007; Bibbal et al., 2015). Dažniausiai su HUS siejamas O157:H7 serotipas, tačiau ir O111:H8 gali sukelti HUS – Japonijoje šio serotipo kamienas izoliuotas iš HUS sergančio paciento ir buvo atsakingas už didelį protrūkį, susijusį su žalios jautienos vartojimu (Sekizuka et al., 2019).

Nepriklausomai nuo kamieno serotipo, Šiga toksino profilis gali skirtis (3.3 pav.). O111:H8 serotipas būdingas 4 kamienams (GS09 – GS11, GS16), kurie turi skirtingas Šiga toksino kombinacijas: GS09, GS10 ir GS16 būdingi *stx1a*, *stx2a* genai, o GS11 kamienui – *stx2a*. Trims kamienams nustatytas O148:H8 serotipas, tačiau jiems būdingi skirtingi Šiga toksino potipiai, Stx2a (GS01), Stx2d (GS02), Stx2c (GS08). O157:H7 serotipas būdingas 3 kamienams (GS15, GS19, GS20), jie visi išskiria abiejų tipų Šiga toksiną, tik skiriasi Stx2 toksino potipiai (a arba c).

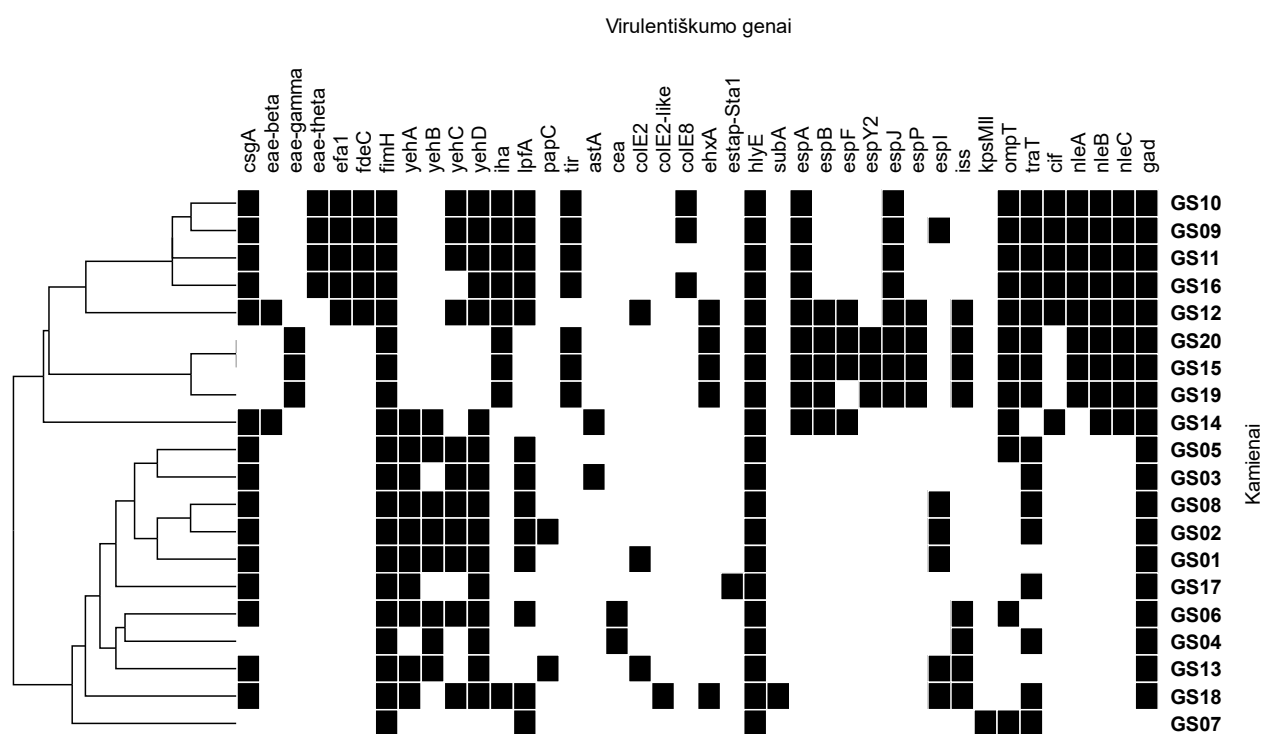


3.3 pav. Stx pasiskirstymas pagal serotipą.

2022 m. ECDC paskelbtoje kasmetinėje epidemiologinėje ataskaitoje teigiama, kad su protrūkiiais siejamos STEC O26, O104, O111, O113, O145, O157 ir O178 serogrupės (“STEC infection Annual Epidemiological Report 2022,” 2022). Didžiąją dalį infekcijų sukėlė tipiniai serotipai, tačiau su protrūkiiais siejami ir netipiniai O178 serogrupės STEC kamienai. Lyginant šiame darbe gautus rezultatus su Europos statistika, galima daryti išvadą, kad dalis izoliuotų kamienų priklauso dažniausiai infekcijas sukeliančių STEC kamienų grupei.

3.4. Virulentiškumo genai

Analizuojant izoliatus su VirulenceFinder 2.0 (CGE) įrankiu nustatyta 40 virulentiškumo genų (neįskaitant *stx* genų). Šie genai buvo aptikti skirtingais dažniais ir deriniais (3.4 pav.), kurių viename genome buvo nuo 6 iki 25 virulentiškumo genų. Aptiktus genus, remiantis jų funkcijomis, galima grupuoti į kelias kategorijas: adhezinais (*fdeC*, *csgA*, *eae-beta*, *eae-gamma*, *eae-theta*, *efa1*, *fimH*, *yehA*, *yehB*, *yehC*, *yehD*, *iha*, *lpfA*, *papC*, *tir*), toksinai (*astA*, *cea*, *colE2*, *colE2-like*, *colE8*, *ehxA*, *estap-Sta1*, *hlyE*, *subA*), sekrecijos sistemos efektoriai (*espA*, *espB*, *espF*, *espI*, *espY2*, *espJ*, *espP*), protektiniai/atsparumas serumui (*iss*, *kpsMII*, *ompT*, *traT*), ne-LEE efektoriai (*cif*, *nleA*, *nleB*, *nleC*) ir glutamato dekarboksilazė (*gad*).



3.4 pav. Izoliuotų kamienų virulentiškumo profiliai. Dendrograma pagrįsta tirtų virulentiškumo genų buvimu (juodais kvadratais) arba nebuvimu.

Dažniausiai aptikti genai yra *fimH* (1 tipo fimbrija) ir *hlyE* (hemolizinas E), esantys visuose 20 analizuojamų genomų. Genas *gad* aptiktas 95 % (19/20) genomų, o jo koduojamas baltymas yra atsakingas už bakterijų atsparumą rūgštinėms sąlygoms. Šis baltymas ypač svarbus per maistą plintantiems patogenams, įskaitant ir STEC (Saint Martin et al., 2023). Keletas genų būdingi tik pavieniams kamienams: *kpsMII* (GS07), *subA* (GS18), *estap-Sta1* (GS17), ir *colE2-like* (GS18). Genas *kpsMII* koduoja polisialo rūgšties (PSA) transportavimo baltymą, kuris yra bakterijoms būdingos PSA kapsulės dalis. Ši kapsulė imituoja žinduolių ląstelėms būdingą PSA struktūrą o tai bakterijoms leidžia išvengti šeimininko imuninės sistemos apsaugos (Lin et al., 2016; Hu et al., 2023). Genai *subA* ir *estap-Sta1* priskiriami toksinų kategorijai, *subA* koduoja subtilazės citotoksina, o *estap-Sta1* koduoja karštyje stabilų enterotoksina (ST). Subtilazės citotoksinas dažnai

būdingas kamienams, neturintiems intimo geno. Pirmą kartą *subA* aptiktas STEC O113:H2 izoliata, tačiau neretai aptinkamas ir kitose padermėse, pvz., O128:H2 (Michelacci et al., 2013; Sánchez et al., 2012). Šis serotipas paprastai yra izoliuojamas iš avių ir elnių, o žmonėms gali sukelti HUS (Sánchez et al., 2012). Šio tyrimo metu jautienoje izoliuotas O128:H2 kamienas (GS18), kuriam ir būdingas subtilazės citotoksinas. Karštyje stabilus enterotoksinas (*estap-Sta1*) įprastai yra būdingas enterotoksigeninei *E. coli* (ETEC). Literatūroje yra aprašyti keli atvejai, kai aptinkami ETEC kamienai, išskiriantys ne tik enterotoksina, bet ir Šiga toksina, tokie kamienai laikomi ETEC/STEC hibridais (Bai et al., 2018; Hu et al., 2023; Lee et al., 2023). Vieną iš analizuotų kamienų (GS17, O9:H30) galima įvardinti kaip hibridinį STEC/ETEC kamieną, nes jam būdingas tiek Šiga toksinas (*stx2e*), tiek karštyje stabilus enterotoksinas.

Be jau paminėtų toksinų, izoliuotiems kamienams būdingi ir su bakteriocinų produkcija susiję genai (*cea*, *colE2*, *colE2-like*, *colE8*). Kolicinų (E1, E2, panašaus į E2, E8) produkcija nustatyta 45 % kamienų. Kolicinai yra koduojami plazmidėse, įvairios *Escherichia coli* padermės juos išskiria esant stresinėms sąlygoms (Sharma et al., 2013). Literatūroje aprašomas ne tik STEC gebėjimas produkuoti kolicinus, bet tam tikri kamienai gali būti jautrūs šių toksinų poveikiui. Kadangi, yra prieštaringų duomenų apie STEC infekcijų gydymo antibiotikais veiksmingumą, bakteriocinai galėtų būti kaip alternatyva kovojant su STEC bakterijų sukeliama ligomis (Jordi et al., 2001; Askari and Ghanbarpour, 2019).

Intimo genas *eae* aptiktas 9 izoliatuose, kurie priklauso serotipams O26:H11 (n = 1), O45:H2 (n = 1), O111:H8 (n = 4), O157:H7 (n = 3). Intimas yra vienas iš LEE efektorių ir yra reikalingas bakterijų adhezijai bei sukelia AE pažeidimus. Nors *eae* yra vienas ryškiausių virulentiškumo veiksnių, prisidedančių prie patogenezės, STEC kamienams būdingi ir kiti virulentiškumo genai, kurie gali sustiprinti jų patogeniškumą, pvz., enterohemolizinas (*ehxA*) (Baschera et al., 2019). Šis genas būdingas 5 (GS12, GS15, GS18 – GS12) kamienams. Be to, kamienai, kuriems būdinga *stx2*, *eae* ir *ehxA* kombinacija, dažnai siejama su sunkia ligos forma (Díaz et al., 2021). Tokia virulentiškumo genų kombinacija aptikta GS12 (O26:H11), GS15 (O157:H7), GS19 (O157:H7) ir GS20 (O157:H7) kamienuose.

LEE lokuse koduojamas ne tik intimas, bet ir Esp baltymai, kurie yra išskiriami per III tipo sekrecijos sistemą ir yra būtini AE pažeidimams susidaryti (Sekiya et al., 2001). Šiame darbe izoliuotiems kamienams taip pat būdingi Esp baltymus koduojantys genai (*espA*, *espB*, *espF*, *espJ*, *espY2*), jie aptikti 15 – 45 % izoliatų. EspA baltymą koduojantis genas aptiktas 45 % kamienų. EspA yra struktūrinis baltymas, kuris dalyvauja formuojant į pilies panašias struktūras. Tokios struktūros yra būtinos ankstyvam bakterijų prisijungimui prie epitelio ląstelių ir veikia kaip kanalas bakterijų efektorių perkėlimui į šeimininko ląstelę (Sekiya et al., 2001; Li et al., 2021).

Be LEE koduojamų efektorių, literatūroje yra aprašyta keletas ne LEE koduojamų efektorių, esančių su fagais susijusiuose elementuose. Vienas iš jų, ne LEE koduojamas efektorius A (NleA), yra plačiai paplitęs tarp patogeninių *E. coli* (Schwidder et al., 2011). Šio tyrimo metu izoliuoti 8 kamienai, turintys šį *nleA* virulentiškumo geną. Be *nleA*, aptikti dar 2 šiai grupei priskiriami efektoriai: *nleB* (n = 9) ir *nleC* (n = 9). Visų trijų genų kombinacija būdinga GS9 – GS12, GS15, GS16, GS19, GS20 kamienams, GS14 kamienas turi *nleB*, *nleC*, bet neturi *nleA*. Ne LEE efektoriai pažeidžia įvairius ląstelės šeiminkės procesus, įskaitant: baltymų eksporto iš endoplazminio tinklo slopinimą (NleA), priešuždegiminių signalų slopinimą (NleB, NleC) (Salvador et al., 2014).

3.5. Atsparumas antibiotikams

Siekiant identifikuoti kamienų atsparumą antibiotikams buvo panaudotas ResFinder (Galaxy platforma, STEC pipeline 1.0) įrankis. Nustatyta, kad 55 % kamienų yra atsparūs bent vienam antibiotikui, kamienų atsparumo antibiotikams profiliai pateikti 3.2 lentelėje. Atsparumas nustatytas 9 skirtingoms antibiotikų klasėms: β-laktamams (*ampS*, *blaACT-9*, *blaDHA-17*, *blaTEM-1B*), aminoglikozidams (*aadA1*, *aadA2*, *aac(6')-Ic*, *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *ant(3'')-Ia*, *aph(6)-Id*), chinolonams (*qnrD1*), tetraciklinui (*tet(A)*, *tet(E)*, *tet(J)*, *tet(59)*), amfenikoliams (*cat*, *catA2*, *smlA1*, *floR*), makrolidams (*mph(B)*), sulfonamidams (*sul1*, *sul2*, *sul3*), antifoliatams (*dfrA1*, *dfrA12*, *dfrA8*) bei fosfomicinui (*fosA*).

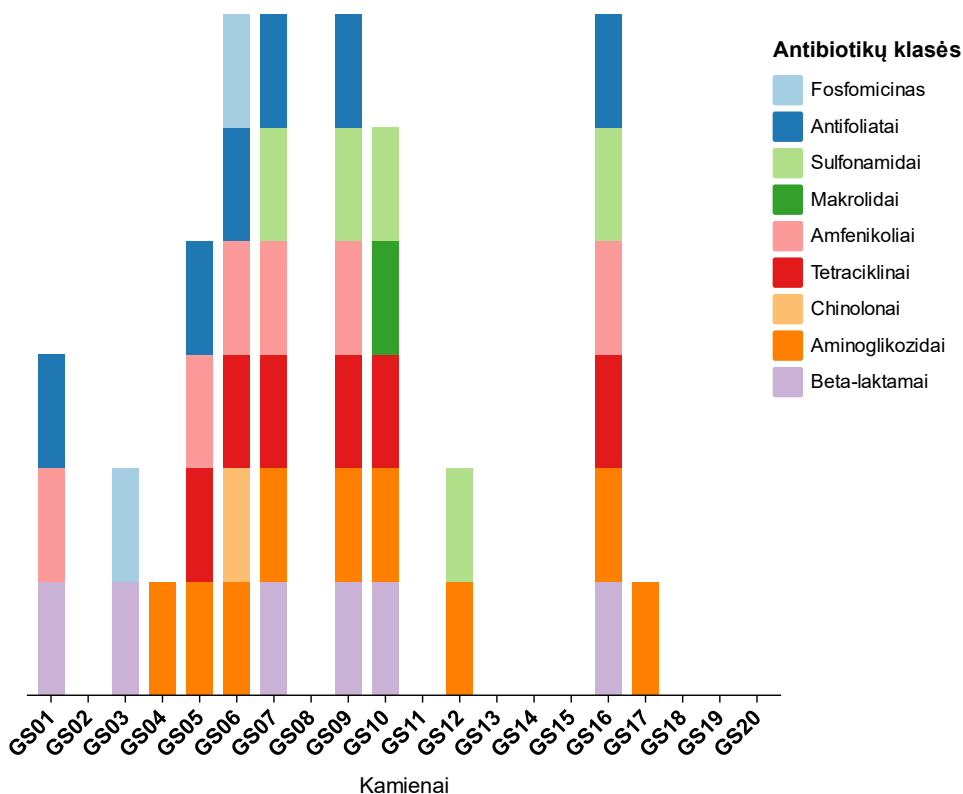
3.2 lentelė. Kamienų atsparumas antibiotikams. β-laktaminiai antibiotikai (*ampS*, *blaACT-9*, *blaDHA-17*, *blaTEM-1B*); aminoglikozidai (*aadA1*, *aadA2*, *aac(6')-Ic*, *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *ant(3'')-Ia*, *aph(6)-Id*); chinolonai (*qnrD1*); tetraciklinas (*tet(A)*, *tet(E)*, *tet(J)*, *tet(59)*); sulfonamidai (*sul1*, *sul2*, *sul3*); chloramfenikolis (amfenikoliams (*cat*, *catA2*, *smlA1*, *floR*); trimetoprimas (*dfrA1*, *dfrA12*, *dfrA8*), fosfomicinas (*fosA*).

Kamienas	Serotipas	Atsparumo antibiotikams profilis
GS01	O148:H8	<i>ampS</i> , <i>blaDHA-17</i> , <i>catA2</i> , <i>dfrA1</i> (4)
GS02	O148:H8	–
GS03	O168:H10	<i>blaACT-9</i> , <i>fosA</i> (2)
GS04	O101:H18	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> (2)
GS05	O87:H8	<i>aadA1</i> , <i>cat</i> , <i>dfrA1</i> , <i>tet(59)</i> , <i>tet(J)</i> (5)
GS06	O20:H8	<i>aac(6')-Ic</i> , <i>cat</i> , <i>dfrA1</i> , <i>fosA</i> , <i>qnrD1</i> , <i>tet(E)</i> , <i>tet(J)</i> (7)
GS07	O83:H42	<i>ant(3'')-Ia</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>blaTEM-1B</i> , <i>cmlA1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tet(A)</i> (9)
GS08	O148:H8	–
GS09	O111:H8	<i>aadA2</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>blaTEM-1B</i> , <i>cmlA1</i> , <i>dfrA8</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tet(A)</i> (10)
GS10	O111:H8	<i>aadA1</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>blaTEM-1B</i> , <i>mph(B)</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)_6</i> (8)
GS11	O111:H8	–
GS12	O26:H11	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>sul2_2</i> (3)
GS13	O113:H4	–
GS14	O45:H2	–
GS15	O157:H7	–
GS16	O111:H8	<i>aadA1</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>blaTEM</i> , <i>cmlA1</i> , <i>dfrA8</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tet(A)</i> (10)
GS17	O9:H30	<i>aadA1</i> (1)

3.2 lentelės tęsinys. Kamienų atsparumas antibiotikams. β -laktaminiai antibiotikai (*ampS*, *blaACT-9*, *blaDHA-17*, *blaTEM-1B*); aminoglikozidai (*aadA1*, *aadA2*, *aac(6')-Ic*, *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *ant(3'')-Ia*, *aph(6)-Id*); chinolonai (*qnrD1*); tetraciklinas (*tet(A)*, *tet(E)*, *tet(J)*, *tet(59)*); sulfonamidai (*sul1*, *sul2*, *sul3*); chloramfenikolis (amfenikoliams (*cat*, *catA2*, *smlA1*, *floR*); trimetoprimas (*dfrA1*, *dfrA12*, *dfrA8*), fosfomicinas (*fosA*).

GS18	O128:H2	–
GS19	O157:H7	–
GS20	O157:H7	–

O111:H8 serotipo kamienams (GS09, GS10, GS16) būdingas panašus atsparumo profilis. Šie izoliatai turi nuo 8 iki 10 genų, iš kurių 5 būdingi visiems trims. GS09 ir GS16 profiliai yra beveik identiški, skiriasi tik vienu genu, atsakingu už atsparumą aminoglikozidams (*aadA2* (GS09); *aadA1* (GS16)). GS07 izoliatai taip pat nustatytas didelis atsparumo determinančių skaičius (10), šis kamienas pasižymi atsparumu 6 antibiotikų klasėms. Kamienų atsparumo pasiskirstymas pagal klases pateiktas 3.5 paveiksle.



3.5 pav. Kamienų atsparumas įvairių klasių antibiotikams.

Atliekant tyrimo metu gautų duomenų analizę pastebėta, kad izoliatai didžiausiu atsparumu pasižymi aminoglikozidų ($n = 9$) klasės antibiotikams. Mažiausias atsparumas nustatytas chinolonų ir makrolidų klasės antibiotikams. GS06 izoliatai aptikta determinantė *qnrD1*, atsakinga už atsparumą chinolonams, o GS10 kamienas – *mph(B)* genas, kuris lemia atsparumą eritromicinui, josamicinui, tilozinui ir spiramicinui (Achard et al., 2008).

Atsparumas antimikrobinėms medžiagoms kelia didelę grėsmę žmonių ir gyvūnų sveikatai. Tų pačių klasių antibiotikai, pavyzdžiui, β -laktamai, aminoglikozidai, makrolidai, chinolonai, tetraciklinai, naudojami ne tik žmonių medicinoje, bet ir gyvulininkystėje. Dėl šios priežasties gyvūnai yra antibiotikams atsparių bakterijų, kurios gali būti perduodamos žmonėms, šaltinis (Ma et al., 2021; Ghimpețeanu et al., 2022). Antimikrobinių medžiagų, ypač tų, kurios laikomos itin svarbiomis žmonių medicinoje, naudojimo mažinimas gyvulininkystėje yra viena iš PSO siekiamybių, nes tokiu būdu galima išsaugoti šių medžiagų naudą žmonėms. Strategija yra paremta didžiausią prioritetą turinčių antibiotikų ribojimu gyvūnų ligoms kontroliuoti. Chinolonai, trečios ir ketvirtos kartos cefalosporinai, makrolidai/ketolidai bei glikopeptidai yra didžiausio prioriteto antibiotikų klasės (Collignon et al., 2016). Šiame darbe aptiktas kamienas (GS06), turintis atsparumą chinolonams, bei kamienas (GS10), kuris pasižymi atsparumu makrolidams. Atsparumą šiems antibiotikams koduojantys genai gali būti perduodami ir kitoms bakterijų rūšims, o tai padidina riziką visuomenės sveikatai.

IŠVADOS

1.
 - a. ISO/TS 13136:2012 aprašytas RL-PGR yra tinkamas metodas identifikuoti STEC maisto produktuose, įskaitant ir jautieną. Remiantis standartu, galima nustatyti Šiga toksino genus, tačiau nustačius tik toksino tipą negalima tiksliai įvertinti kamieno virulentiškumo. Sekoskaitos duomenų analizė suteikia tikslesnius rezultatus, nustatomas ne tik toksino tipas, bet ir potipis, o pagal jį galima įvertinti kamieno pavojingumą. Šio tyrimo metu nustatyti 8 kamienai, kuriems būdingas Stx2a toksinas – jis yra laikomas toksiškiausiu bei yra siejamas su sunkiomis ligos formomis.
 - b. ISO/TS 13136:2012 yra pritaikytas tik STEC kamieno serogrupės nustatymui. Šis metodas yra apribotas turimų reagentų, todėl serogrupė ne visada nustatoma. Atlikus sekoskaitos duomenų analizę galima nustatyti ne tik serogrupę, bet ir serotipą. Analizuojant šio tyrimo metu gautus duomenis, aptikti ne tik tipiniai STEC serotipai (O26:H11, O45:H2, O111:H8, O113:H4, O128:H2, O157:H7), bet ir retesni serotipai (O9:H30, O20:H8, O83:H42, O87:H8, O101:H18, O148:H8, O168:H10).
2. Atliekant virulentiškumo genų analizę, be *stx* genų nustatyta 40 virulentiškumo genų, visuose izoliuotuose kamienuose aptikti *fimH* (padeda prisitvirtinti prie tikslinių ląstelių) ir *hlyE* (padeda patekti į tikslines ląsteles) genai. Sekoskaitos duomenų analizė parodė, kad STEC kamienams būdingas ne tik Šiga toksinas, bet ir kiti toksinai – subtilazės citotoksinas, kolicinai, karštyje stabilus enterotoksinas.
3. Atsparumas bent vienam antibiotikui aptiktas 11 STEC kamienų. Izoliatams būdingas atsparumas įvairioms antibiotikų klasėms: antifoliatams, sulfonamidams, makrolidams, amfenikoliams, tetraciklinams, chinolonams, aminoglikozidams, β-laktamams bei fosfomicinui. Izoliatai didžiausiu atsparumu pasižymi aminoglikozidų klasės antibiotikams. Mažiausias atsparumas nustatytas chinolonų ir makrolidų klasės antibiotikams. STEC kamienų atsparumui įtaką gali turėti didelis šių antimikrobinių medžiagų naudojimas galvijų ūkiuose.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Viktorija Dapkutė
Magistro baigiamasis darbas

**JAUTIENOJE APTIKTŲ ŠIGA TOKSINĄ IŠSKIRIANČIŲ *ESCHERICHIA COLI*
IDENTIFIKAVIMAS IR GENOMINĖ ANALIZĖ**

SANTRAUKA

Šiga toksiną išskirianti *Escherichia coli* (STEC) – vienas dažniausių per maistą plintančių patogenų, kuriam būdinga Stx1 ir/arba Stx2 toksinų sintezė. STEC visame pasaulyje yra siejamos su ne viena žmonių liga – nuo lengvo viduriavimo iki hemoraginio kolito (HC), hemolizinio ureminio sindromo (HUS) ir trombozinės trombocitopeninės purpuros (TTP). Pagrindiniu STEC šaltiniu laikomi galvijai, o žmonės dažniausiai užsikrečia vartojant užterštą maistą ar vandenį, per aplinką ar tiesioginį kontaktą su gyvūnais. Vienas pagrindinių žmonių STEC infekcijos šaltinių yra nepakankamai termiškai apdorota mėsa ir mėsos produktai, ypač malta jautiena.

Šio tyrimo metu nustatyta 40 jautienos ir jos produktų taršos STEC bakterijomis atvejų. Didžioji dalis kamienų izoliuoti iš šaldytos smulkintos jautienos mėšainiams. Atliekant sekoskaitos duomenų analizę identifikuoti 2 Stx1 potipiai (a ir c), bei 6 Stx2 potipiai (a, b, c, d, e, f). Nustatyti 8 kamienai, kuriems būdingas Stx2a toksinas, kuris yra laikomas toksiškiausiu bei yra siejamas su sunkiomis ligos formomis. Tirtiems kamienams būdinga serotipų įvairovė, aptikti ne tik tipiniai serotipai (O26:H11, O45:H2, O111:H8, O113:H4, O128:H2, O157:H7), bet ir retesni serotipai (O9:H30, O20:H8, O83:H42, O87:H8, O101:H18, O148:H8, O168:H10), dažniausi aptikti 3 serotipai O111:H8, O148:H8 ir O157:H7. Virulentiškumo genų analizė parodė, kad STEC kamienams būdingas ne tik Šiga toksinas, bet ir kiti toksinai – subtilazės citotoksinas, kolicinai, karštyje stabilus enterotoksinas. Taip pat pastebėta, kad izoliatai didžiausiu atsparumu pasižymi aminoglikozidų klasės antibiotikams, o mažiausias atsparumas nustatytas chinolonų ir makrolidų klasės antibiotikams.

Dėl savo genetinių savybių izoliuoti STEC kamienai kelia pavojų maisto saugai ir visuomenės sveikatai. STEC kamienų genomo sekoskaita suteikia išsamių įžvalgų apie patogenų virulentiškumą, atsparumą antibiotikams bei padeda nustatyti protrūkių šaltinį. Viso genomo sekoskaitą (VGS) rekomenduojama taikyti ne tik įprastose visuomenės sveikatos srityse (klinikiniuose izoliatuose), bet ir maisto taršos stebėjimo sistemose.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Viktorija Dapkutė

Master thesis

**IDENTIFICATION AND GENOMIC ANALYSIS OF SHIGA TOXIN-PRODUCING
ESCHERICHIA COLI ISOLATED FROM BEEF**

SUMMARY

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is one of the most common foodborne pathogens, characterized by the synthesis of Stx1 and/or Stx2 toxins. STEC is associated with numerous human diseases worldwide, ranging from mild diarrhea to hemorrhagic colitis (HC), hemolytic uremic syndrome (HUS) and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Cattle are considered the primary source of STEC and humans usually become infected by consuming contaminated food or water, through the environment or by direct contact with animals. One of the main sources of STEC infection in humans is undercooked meat and meat products, especially ground beef.

This study identified 40 cases of beef contamination with STEC bacteria. The majority of the strains were isolated from frozen minced beef for hamburgers. Analysis of sequencing data identified 2 Stx1 subtypes (a and c) and 6 Stx2 subtypes (a, b, c, d, e, f). Eight strains were found to produce the Stx2a toxin, which is considered the most toxic and is associated with severe forms of the disease. The analyzed strains exhibited a diversity of serotypes, including not only typical serotypes (O26:H11, O45:H2, O111:H8, O113:H4, O128:H2, O157:H7), but also uncommon serotypes (O9:H30, O20:H8, O83:H42, O87:H8, O101:H18, O148:H8, O168:H10). The most frequently detected serotypes were O111:H8, O148:H8 and O157:H7. Analysis of virulence genes showed that the STEC strains not only produced Shiga toxin but also other toxins such as subtilase cytotoxin, colicins, and heat-stable enterotoxin. Additionally, it was observed that the isolates exhibited the highest resistance to aminoglycoside class antibiotics, while the lowest resistance was found to quinolone and macrolide class antibiotics.

Due to their genetic characteristics, the isolated STEC strains pose a threat to food safety and public health. Whole-genome sequencing (WGS) of STEC strains provides comprehensive insights into pathogen virulence, antibiotic resistance, and helps identify outbreak sources. It is recommended to apply WGS not only in conventional public health areas but also in food contamination monitoring systems.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Achard, A., Guérin-Faubleé, V., Pichereau, V., Villers, C., Leclercq, R., 2008. Emergence of Macrolide Resistance Gene *mph* (B) in *Streptococcus uberis* and Cooperative Effects with *rdmC* -Like Gene. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 2767–2770. <https://doi.org/10.1128/AAC.00481-08>
2. Akaçin, İ., Ersoy, Ş., Doluca, O., Güngörmüşler, M., 2022. Comparing the significance of the utilization of next generation and third generation sequencing technologies in microbial metagenomics. *Microbiological Research* 264, 127154. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127154>
3. Alconcher, L.F., Rivas, M., Lucarelli, L.I., Galavotti, J., Rizzo, M., 2020. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in household members of children with hemolytic uremic syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 39, 427–432. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03738-1>
4. Amézquita-López, B.A., Soto-Beltrán, M., Lee, B.G., Yambao, J.C., Quiñones, B., 2018. Isolation, genotyping and antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 51, 425–434. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.07.004>
5. Askari, N., Ghanbarpour, R., 2019. Molecular investigation of the colicinogenic *Escherichia coli* strains that are capable of inhibiting *E. coli* O157:H7 in vitro. *BMC Vet Res* 15, 14. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1771-y>
6. Bai, X., Mernelius, S., Jernberg, C., Einemo, I.-M., Monecke, S., Ehricht, R., Löfgren, S., Matussek, A., 2018. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infection in Jönköping County, Sweden: Occurrence and Molecular Characteristics in Correlation With Clinical Symptoms and Duration of *stx* Shedding. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 125. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00125>
7. Baschera, M., Cernela, N., Stevens, M.J.A., Liljander, A., Jores, J., Corman, V.M., Nüesch-Inderbinnen, M., Stephan, R., 2019. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from fecal samples of African dromedary camels. *One Health* 7, 100087. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100087>
8. Bergan, J., Dyve Lingelem, A.B., Simm, R., Skotland, T., Sandvig, K., 2012. Shiga toxins. *Toxicon* 60, 1085–1107. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.07.016>
9. Bhunia, A.K., 2018. *Escherichia coli*, in: Bhunia, A.K. (Ed.), *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*. Springer New York, New York, NY, pp. 249–269. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7349-1_14
10. Bibbal, D., Loukiadis, E., Kérourédan, M., Ferré, F., Dilasser, F., Peytavin De Garam, C., Cartier, P., Oswald, E., Gay, E., Auvray, F., Brugère, H., 2015. Prevalence of Carriage of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 among Slaughtered Adult Cattle in France. *Appl Environ Microbiol* 81, 1397–1405. <https://doi.org/10.1128/AEM.03315-14>
11. Browne, A.S., Midwinter, A.C., Withers, H., Cookson, A.L., Biggs, P.J., Marshall, J.C., Benschop, J., Hathaway, S., Rogers, L., Nisa, S., Hranac, C.R., Winkleman, T., French, N.P., 2021. Transmission Dynamics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in New Zealand Cattle from Farm to Slaughter. *Appl Environ Microbiol* 87, e02907-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02907-20>

12. Burian, A.N., Zhao, W., Lo, T., Thurtle-Schmidt, D.M., 2021. Genome sequencing guide: An introductory toolbox to whole-genome analysis methods. *Biochem Molecular Bio Educ* 49, 815–825. <https://doi.org/10.1002/bmb.21561>
13. Byrne, L., Adams, N., Jenkins, C., 2020. Association between Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* O157:H7 *stx* Gene Subtype and Disease Severity, England, 2009–2019. *Emerg. Infect. Dis.* 26, 2394–2400. <https://doi.org/10.3201/eid2610.200319>
14. 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. *Comp Rev Food Sci Food Safe* 16, 1269–1280. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12302>
15. Chan, Y.S., Ng, T.B., 2016. Shiga toxins: from structure and mechanism to applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 1597–1610. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7236-3>
16. Colello, R., Krüger, A., Conza, J., Rossen, J., Friedrich, A., Gutkind, G., Etcheverría, A., Padola, N., 2018. Antimicrobial Resistance in Class 1 Integron-Positive Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Cattle, Pigs, Food and Farm Environment. *Microorganisms* 6, 99. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6040099>
17. Collignon, P.C., Conly, J.M., Andremont, A., McEwen, S.A., Aidara-Kane, A., 2016. World Health Organization Ranking of Antimicrobials According to Their Importance in Human Medicine: A Critical Step for Developing Risk Management Strategies to Control Antimicrobial Resistance From Food Animal Production. *Clin Infect Dis.* 63, 1087–1093. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw475>
18. Díaz, L., Gutierrez, S., Moreno-Switt, A.I., Hervé, L.P., Hamilton-West, C., Padola, N.L., Navarrete, P., Reyes-Jara, A., Meng, J., González-Escalona, N., Toro, M., 2021. Diversity of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Cattle from Central and Southern Chile. *Animals* 11, 2388. <https://doi.org/10.3390/ani11082388>
19. Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A., 2005. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 308, 1635–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1110591>
20. Egervärn, M., Flink, C., 2024. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in meat and leafy greens available in the Swedish retail market – Occurrence and diversity of *stx* subtypes and serotypes. *International Journal of Food Microbiology* 408, 110446. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110446>
21. Espié, E., Grimont, F., Vaillant, V., Montet, M.P., Carle, I., Bavai, C., Valk, H.D., Vernozy-Rozand, C., 2006. O148 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreak: microbiological investigation as a useful complement to epidemiological investigation. *Clinical Microbiology and Infection* 12, 992–998. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01468.x>
22. Etcheverría, A.I., Padola, N.L., 2013. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Factors involved in virulence and cattle colonization. *Virulence* 4, 366–372. <https://doi.org/10.4161/viru.24642>
23. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC), 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFS2* 17. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
24. Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condrón, R., De Reu, K., Govaris, A., Heggum, K., Heyndrickx, M., Hummerjohann, J., Lindsay, D., Miszczycha, S., Moussié, S., Verstraete, K., Cerf, O., 2013. Review of Shiga-

- toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology* 162, 190–212. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008>
25. Franz, E., 2007. Ecology and risk assessment of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in the primary production chain of lettuce. publisher not identified, Wageningen.
 26. Galarce, N., Sánchez, F., Fuenzalida, V., Ramos, R., Escobar, B., Lapierre, L., Paredes-Osses, E., Arriagada, G., Alegría-Morán, R., Lincopán, N., Fuentes-Castillo, D., Vera-Leiva, A., González-Rocha, G., Bello-Toledo, H., Borie, C., 2020. Phenotypic and Genotypic Antimicrobial Resistance in Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated From Cattle and Swine in Chile. *Front. Vet. Sci.* 7, 367. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00367>
 27. Ghimpețeanu, O.M., Pogurschi, E.N., Popa, D.C., Dragomir, N., Drăgotoiu, T., Mihai, O.D., Petcu, C.D., 2022. Antibiotic Use in Livestock and Residues in Food—A Public Health Threat: A Review. *Foods* 11, 1430. <https://doi.org/10.3390/foods11101430>
 28. Gill, A., Dussault, F., McMahon, T., Petronella, N., Wang, X., Cebelinski, E., Scheutz, F., Weedmark, K., Blais, B., Carrillo, C., 2022. Characterization of Atypical Shiga Toxin Gene Sequences and Description of Stx2j, a New Subtype. *J Clin Microbiol* 60, e02229-21. <https://doi.org/10.1128/jcm.02229-21>
 29. Gonzalez, A., Cerqueira, A., 2020. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the animal reservoir and food in Brazil. *J Appl Microbiol* 128, 1568–1582. <https://doi.org/10.1111/jam.14500>
 30. Goodwin, S., McPherson, J.D., McCombie, W.R., 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 17, 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
 31. Henrique, I.D.M., Sacerdoti, F., Ferreira, R.L., Henrique, C., Amaral, M.M., Piazza, R.M.F., Luz, D., 2022. Therapeutic Antibodies Against Shiga Toxins: Trends and Perspectives. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 825856. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.825856>
 32. Health Protection Surveillance Centre (HPSC). (2005). Report of the HPSC Sub-Committee on Verotoxigenic *E. coli*. <http://hdl.handle.net/10147/43718>
 33. Hines, J.Z., Bancroft, J., Powell, M., Hedberg, K., 2017. Case Finding Using Syndromic Surveillance Data During an Outbreak of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O26 Infections, Oregon, 2015. *Public Health Rep* 132, 448–450. <https://doi.org/10.1177/0033354917708994>
 34. Hu, J., Li, J., Huang, X., Xia, J., Cui, M., Huang, Y., Wen, Y., Xie, Y., Zhao, Q., Cao, S., Zou, L., Han, X., 2023. Genomic traits of multidrug resistant enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from diarrheic pigs. *Front. Microbiol.* 14, 1244026. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1244026>
 35. Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., Dinh, A., 2021. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology* 82, 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
 36. Huang, X., Yang, X., Shi, X., Erickson, D.L., Nagaraja, T.G., Meng, J., 2021. Whole-genome sequencing analysis of uncommon Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from cattle: Virulence gene profiles, antimicrobial resistance predictions, and identification of

37. Jordi, B.J.A.M., Boutaga, K., Heeswijk, C.M.E., Knapen, F., Lipman, L.J.A., 2001. Sensitivity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains for colicins under different experimental conditions. *FEMS Microbiology Letters* 204, 329–334. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10906.x>
38. Kavaliauskiene, S., Dyve Lingelem, A., Skotland, T., Sandvig, K., 2017. Protection against Shiga Toxins. *Toxins* 9, 44. <https://doi.org/10.3390/toxins9020044>
39. Lee, W., Kim, M.-H., Sung, S., Kim, E., An, E.S., Kim, Seung Hwan, Kim, Soon Han, Kim, H.-Y., 2023. Genome-Based Characterization of Hybrid Shiga Toxin-Producing and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) Strains Isolated in South Korea, 2016–2020. *Microorganisms* 11, 1285. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051285>
40. Li, M., Wang, K., Tang, Ashley, Tang, Aaron, Chen, A., Huang, Z., 2021. Investigation of the Genes Involved in the Outbreaks of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in the United States. *Antibiotics* 10, 1274. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101274>
41. Lin, B.-X., Qiao, Y., Shi, B., Tao, Y., 2016. Polysialic acid biosynthesis and production in *Escherichia coli*: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7019-x>
42. Liu, Y., Thaker, H., Wang, C., Xu, Z., Dong, M., 2022. Diagnosis and Treatment for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *Toxins* 15, 10. <https://doi.org/10.3390/toxins15010010>
43. Lu, Y., Shen, Y., Warren, W., Walter, R., 2016. Next Generation Sequencing in Aquatic Models, in: Kulski, J.K. (Ed.), *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*. InTech. <https://doi.org/10.5772/61657>
44. Ma, F., Xu, S., Tang, Z., Li, Z., Zhang, L., 2021. Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. *Biosafety and Health* 3, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2020.09.004>
45. Maluta, R.P., Leite, J.L., Rojas, T.C.G., Scaletsky, I.C.A., Guastalli, E.A.L., Ramos, M.D.C., Da Silveira, W.D., 2016. Variants of *ast A* gene among extra-intestinal *Escherichia coli* of human and avian origin. *FEMS Microbiology Letters* fnw285. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw285>
46. Melton-Celsa, A.R., 2014. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr* 2, 2.4.06. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013>
47. Michelacci, V., Tozzoli, R., Caprioli, A., Martínez, R., Scheutz, F., Grande, L., Sánchez, S., Morabito, S., 2013. A new pathogenicity island carrying an allelic variant of the Subtilase cytotoxin is common among Shiga toxin producing *Escherichia coli* of human and ovine origin. *Clinical Microbiology and Infection* 19, E149–E156. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12122>
48. Mir, R.A., Kudva, I.T., 2019. Antibiotic-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview of prevalence and intervention strategies. *Zoonoses and Public Health* 66, 1–13. <https://doi.org/10.1111/zph.12533>
49. Mohammed, M.A., Sallam, K.I., Eldaly, E.A.Z., Ahdy, A.M., Tamura, T., 2014. Occurrence, serotypes and virulence genes of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fresh beef, ground beef, and beef burger. *Food Control* 37, 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.035>

50. Nada, H.G., El-Tahan, A.S., El-Didamony, G., Askora, A., 2023. Detection of multidrug-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in some food products and cattle faeces in Al-Sharkia, Egypt: one health menace. *BMC Microbiol* 23, 127. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02873-2>
51. Nawrocki, E.M., Mosso, H.M., Dudley, E.G., 2020. A Toxic Environment: a Growing Understanding of How Microbial Communities Affect *Escherichia coli* O157:H7 Shiga Toxin Expression. *Appl Environ Microbiol* 86, e00509-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00509-20>
52. Nehoya, K.N., Hamatui, N., Shilangale, R.P., Onywera, H., Kennedy, J., Mwapagha, L.M., 2020. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw beef from informal and commercial abattoirs. *PLoS ONE* 15, e0243828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243828>
53. Nouws, S., Verhaegen, B., Denayer, S., Crombé, F., Piérard, D., Bogaerts, B., Vanneste, K., Marchal, K., Roosens, N.H.C., De Keersmaecker, S.C.J., 2023. Transforming Shiga toxin-producing *Escherichia coli* surveillance through whole genome sequencing in food safety practices. *Front. Microbiol.* 14, 1204630. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1204630>
54. Nüesch-Inderbilen, M., Morach, M., Cernela, N., Althaus, D., Jost, M., Mäusezahl, M., Bloomberg, G., Stephan, R., 2018. Serotypes and virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated during 2017 from human infections in Switzerland. *International Journal of Medical Microbiology* 308, 933–939. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.06.011>
55. Persson, S., Olsen, K.E.P., Ethelberg, S., Scheutz, F., 2007. Subtyping Method for *Escherichia coli* Shiga Toxin (Verocytotoxin) 2 Variants and Correlations to Clinical Manifestations. *J Clin Microbiol* 45, 2020–2024. <https://doi.org/10.1128/JCM.02591-06>
56. Price, V., Ngwira, L.G., Lewis, J.M., Baker, K.S., Peacock, S.J., Jauneikaite, E., Feasey, N., 2023. A systematic review of economic evaluations of whole-genome sequencing for the surveillance of bacterial pathogens. *Microbial Genomics* 9. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000947>
57. Reuter, J.A., Spacek, D.V., Snyder, M.P., 2015. High-Throughput Sequencing Technologies. *Molecular Cell* 58, 586–597. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.004>
58. Rivas, L., Mellor, G.E., Gobius, K., Fegan, N., 2015. Isolation and Detection of Pathogenic *Escherichia coli* in Foods, in: *Detection and Typing Strategies for Pathogenic Escherichia Coli*, SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition. Springer New York, New York, NY, pp. 39–65. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2346-5_2
59. Robert, A., Wiels, J., 2021. Shiga Toxins as Antitumor Tools. *Toxins* 13, 690. <https://doi.org/10.3390/toxins13100690>
60. Saint Martin, C., Caccia, N., Darsonval, M., Gregoire, M., Combeau, A., Jubelin, G., Dubois-Brissonnet, F., Leroy, S., Briandet, R., Desvaux, M., 2023. Spatially localised expression of the glutamate decarboxylase *gadB* in *Escherichia coli* O157:H7 microcolonies in hydrogel matrices. *npj Sci Food* 7, 55. <https://doi.org/10.1038/s41538-023-00229-8>
61. Salvador, F.A., Hernandez, R.T., Vieira, M.A.M., Rockstroh, A.C., Gomes, T.A.T., 2014. Distribution of non-LEE-encoded type 3 secretion system dependent effectors in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Braz. J. Microbiol.* 45, 851–855. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000300014>

62. Sánchez, S., Beristain, X., Martínez, R., García, A., Martín, C., Vidal, D., Díaz-Sánchez, S., Rey, J., Alonso, J.M., Herrera-León, S., 2012. Subtilase cytotoxin encoding genes are present in human, sheep and deer intimin-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O128:H2. *Veterinary Microbiology* 159, 531–535. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.036>
63. Satam, H., Joshi, K., Mangroliya, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R.P., Banday, S., Mishra, A.K., Das, G., Malonia, S.K., 2023. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology* 12, 997. <https://doi.org/10.3390/biology12070997>
64. Scavia, G., Gianviti, A., Labriola, V., Chiani, P., Maugliani, A., Michelacci, V., Minelli, F., Tozzoli, R., Caprioli, A., Morabito, S., 2018. A case of haemolytic uraemic syndrome (HUS) revealed an outbreak of Shiga toxin-2-producing *Escherichia coli* O26:H11 infection in a nursery, with long-lasting shedders and person-to-person transmission, Italy 2015. *Journal of Medical Microbiology* 67, 775–782. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000738>
65. Schwidder, M., Hensel, M., Schmidt, H., 2011. Regulation of *nleA* in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O84:H4 Strain 4795/97. *J Bacteriol* 193, 832–841. <https://doi.org/10.1128/JB.00582-10>
66. Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C., Abe, A., 2001. Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 11638–11643. <https://doi.org/10.1073/pnas.191378598>
67. Sekizuka, T., Lee, K., Kimata, K., Isobe, J., Kuroda, M., Iyoda, S., Ohnishi, M., Sata, T., Watahiki, M., 2019. Complete Genome Sequence of an Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111:H8 Strain Recovered from a Large Outbreak in Japan Associated with Consumption of Raw Beef. *Microbiol Resour Announc* 8, e00882-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00882-19>
68. Sharma, O., Zakharov, S.D., Zhalnina, M.V., Yamashita, E., Cramer, W.A., 2013. Colicins, in: *Handbook of Biologically Active Peptides*. Elsevier, pp. 93–100. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00017-8>
69. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring : report, 2018. . Food and Agriculture Organization of the United Nations ; World Health Organization, Rome, [Geneva].
70. Slatko, B.E., Gardner, A.F., Ausubel, F.M., 2018. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *CP Molecular Biology* 122, e59. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
71. STEC infection Annual Epidemiological Report 2022, 2022.
72. Travert, B., Rafat, C., Mariani, P., Cointe, A., Dossier, A., Coppo, P., Joseph, A., 2021. Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: Specificities of Adult Patients and Implications for Critical Care Management. *Toxins* 13, 306. <https://doi.org/10.3390/toxins13050306>
73. Tristão, L.C.S., Gonzalez, A.G.M., Coutinho, C.A.S., Cerqueira, A.M.F., Gomes, M.J.P., Irino, K., Guth, B.E.C., Andrade, J.R.C., 2007. Virulence markers and genetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from serogroup O111 isolated from cattle. *Veterinary Microbiology* 119, 358–365. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.09.006>
74. Varcasia, B., Tomassetti, F., De Santis, L., Di Giamberardino, F., Lovari, S., Bilei, S., De Santis, P., 2018. Presence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) in Fresh Beef

Marketed in 13 Regions of ITALY (2017). *Microorganisms* 6, 126. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6040126>

75. Wang, X., Yu, D., Chui, L., Zhou, T., Feng, Y., Cao, Y., Zhi, S., 2024. A Comprehensive Review on Shiga Toxin Subtypes and Their Niche-Related Distribution Characteristics in Shiga-Toxin-Producing *E. coli* and Other Bacterial Hosts. *Microorganisms* 12, 687. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12040687>
76. Yang, X., Sun, H., Fan, R., Fu, S., Zhang, J., Matussek, A., Xiong, Y., Bai, X., 2020. Genetic diversity of the intimin gene (*eae*) in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in China. *Sci Rep* 10, 3275. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60225-w>
77. Ylinen, E., Salmenlinna, S., Halkilahti, J., Jahnukainen, T., Korhonen, L., Virkkala, T., Rimhanen-Finne, R., Nuutinen, M., Kataja, J., Arikoski, P., Linkosalo, L., Bai, X., Matussek, A., Jalanko, H., Saxén, H., 2020. Hemolytic uremic syndrome caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children: incidence, risk factors, and clinical outcome. *Pediatr Nephrol* 35, 1749–1759. <https://doi.org/10.1007/s00467-020-04560-0>
78. Zhang, X., Payne, M., Kaur, S., Lan, R., 2022. Improved Genomic Identification, Clustering, and Serotyping of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Using Cluster/Serotype-Specific Gene Markers. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 772574. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.772574>

PADĖKA

Dėkoju Nacionalinio maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo instituto Molekulinės biologijos ir GMO bei Maisto produktų mikrobiologinių tyrimų skyrių darbuotojams už suteiktą galimybę atlikti tyrimus laboratorijose, dėkoju už patarimus ir įvairiapusę pagalbą sprendžiant iškilusias problemas.

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovui dr. Žyгимantui Janeliūnui už kantrybę, vertingas diskusijas ir pastabas rengiant šį baigiamąjį darbą.

Noriu išreikšti nuoširdžią padėką savo darbo konsultantei Gertrūdei Šeškutei, kurios pagalba ir palaikymas buvo neįkainojami viso šio kelio metu. Ačiū už emocinį palaikymą ir ilgus vakarus, kuriuos praleidome su kibiru kavos automobilių aikštelėje klausant automobilių su tiesiu išmetimu bei taisant mano darbą. Esu nepaprastai dėkinga už Gertrūdos bei Žyгимanto mentorystę ir už tai, kad tikėjote manimi kiekviename žingsnyje.

Taip pat noriu padėkoti savo draugams, ypač tiems, kurie yra už tūkstančių kilometrų. Ačiū už palaikymą ir padrąsinančius pokalbius. Esu be galo dėkinga Patricijai už vaizdo skambučius, rūpestį, už visus tuos metus, kai kartu mokėmės ir kartu įveikėme visus sunkumus.

Galiausiai noriu padėkoti savo tėčiui Ričardui, mamai Daivai, sesėms Giedrei ir Modestai už rūpestį, palaikymą ir supratingumą visą mano studijavimo laikotarpį. Jūsų kantrybė, meilė ir tikėjimas manimi yra neišsenkantis stiprybės šaltinis. Noriu padėkoti ir mažajam Vytautui, kurio šypsenos ir špygutės visada pakeldavo mano nuotaiką. Jūsų visų begalinė parama yra nepakeičiama ir aš visada būsiu už tai dėkinga.

*„Don't let this darkness fool you
All lights turned off can be turned on“*

Noah Kahan

PRIEDAI

1 PRIEDAS

1.1 lentelė. Naudojamų pradmenų ir zondų sekos (sekų išdėstymas: tiesioginis pradmuo, atvirkštinis pradmuo, zondas).

Ieškomo geno fragmentas	Pradmenų ir zondų sekos
<i>eae</i>	5' – CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA – 3'
	5' – CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTA – 3'
	5' – FAM– ATA GTC TCG CCA GTA TTC GCC ACC AAT ACC – TAMRA– 3'
<i>stx1</i>	5' – TTT GTY ACT GTS ACA GCW GAA GCY TTA CG – 3'
	5' – CCC CAG TTC ARW GTR AGR TCM ACR TC – 3'
	5' – FAM – CTG GAT GAT CTC AGT GGG CGT TCT TAT GTA A – TAMRA– 3'
<i>stx2</i>	5' – TTT GTY ACT GTS ACA GCW GAA GCY TTA CG – 3'
	5' – CCC CAG TTC ARW GTR AGR TCM ACR TC – 3'
	5' – FAM– TCG TCA GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC – TAMRA– 3'
O26	5' – CGC GAC GGC AGA GAA AAT T– 3'
	5' – AGC AGG CTT TTA TAT TCT CCA ACT TT– 3'
	5' – FAM– CCC CGT TAA ATC AAT ACT ATT TCA CGA GGT TGA – TAMRA– 3'
O103	5' – CAA GGT GAT TAC GAA AAT GCA TGT– 3'
	5' – GAA AAA AGC ACC CCC GTA CTT AT– 3'
	5' – FAM– CAT AGC CTG TTG TTT TAT –MGB– 3'
O111	5' – CGA GGC AAC ACA TTA TAT AGT GCT TT – 3'
	5' – TTT TTG AAT AGT TAT GAA CAT CTT GTT TAG C – 3'
	5' – FAM– TTG AAT CTC CCA GAT GAT CAA CAT CGT GAA – TAMRA– 3'
O145	5' – CGA TAA TAT TTA CCC CAC CAG TAC AG– 3'
	5' – GCC GCC GCA ATG CTT– 3'
	5' – FAM– CCG CCA TTC AGA ATG CAC ACA ATA TCG – TAMRA– 3'
O157	5' – TTT CAC ACT TAT TGG ATG GTC TCA A – 3'
	5' – CGA TGA GTT TAT CTG CAA GGT GAT – 3'
	5' – FAM– AGG ACC GCA GAG GAA AGA GAG GAA TTA AGG – TAMRA– 3'
O104	5' – TGT CGC GCA AAG AAT TTC AAC– 3'
	5' – AAA ATC CTT TAA ACT ATA CGC CC– 3'
	5' – FAM–TTG GTT TTT TTG TAT TAG CAA TAA GTG GTG TC– TAMRA– 3'
O45	5' – CGT TGT GCA TGG TGG CAT– 3'
	5' – TGG CCA AAC CAA CTA TGA ACT G – 3'
	5' – JOE – ATT TTT TGC TGC AAG TGG GCT GTC CA – TAMRA– 3'
O55	5' – AAT TAA CGA ACA TAA CAC CCA ACC – 3'
	5' – ATA TCT CTT CGT TAC TGT GTG TAT TTC– 3'
	5' – FAM– ACC TCC CGC TAA AAC CCC AAC TCT AGT AG – TAMRA– 3'
O91	5' – CGA TTT TCT GGA ATG CTT GAT G– 3'
	5' – CAA TAC ATA GTT TGA TTT GTG TTT AAA GTT TAA T–3'
	5' – FAM– CCT GGG TTG TTA GGA ACA ATT TCA GCA CTT C – TAMRA– 3'
O113	5' – GAG CGT TTC TGA CAT ATG GAG TGA– 3'
	5' – TTG CTA TAA ATG GAA GCC ATT CTT T – 3'
	5' – JOE– TGC ATG AAA TGT TTA AAT GCA GCG GGT – TAMRA– 3'
O121	5' – AGG CGC TGT TTG GTC TCT TAG A– 3'
	5' – GAA CCG AAA TGA TGG GTG CT – 3'
	5' – FAM– CGC TAT CAT GG CGG GAC AAT GAC AGT GC – TAMRA– 3'
O128	5' – TCG ATC GTC TTG TTC AGG TT– 3'
	5' – GAA TGC AAT GGG CAA TTA AC– 3'
	5' – Cy5– GGG TTG CAC AAT TGG CCT CC – TAMRA– 3'

1.1 lentelės tęsinys. Naudojamų pradmenų ir zondų sekos (sekų išdėstymas: tiesioginis pradmuo, atvirkštinis pradmuo, zondas).

O146	5' – ACA TTC GGC GTT TTT ATC TCG T– 3'
	5' – GGT CAA ATC TCG TGC CCA TAG A– 3'
	5' – FAM– AAT TTC AAG GTG CCA ACT TTT CA – TAMRA– 3'
O80	5' – TGA GAG CCA AGA TCC AAG CA– 3'
	5' – TGG GCC ATA TTC GAA GTT TGA A– 3'
	5' – Cy5– TCC CAA GAT TCC ACG TTG AT –BHQ-3– 3'

(Sekose: Y – (C, T); S – (C, G); W – (A, T); R – (A, G), M – (A, C))

DNR išskyrimas pagal ISO/TS 13136:2012

Po pagausinimo atliekamas DNR išskyrimas iš terpės (tiriamas kiekis – 1 ml). Atliekami etapai:

- 1) Ląstelių suspensija centrifuguojama 10 min. apie 14000 rpm. Supernatantas atsargiai pašalinamas.
- 2) Nuosėdos plaunamos 300 µl vandens be nukleazių.
- 3) Mėgintuvėlis centrifuguojamas 5 min. apie 14000 rpm. Supernatantas atsargiai pašalinamas.
- 4) Nuosėdos plaunamos 300 µl vandens be nukleazių.
- 5) Mėgintuvėlis centrifuguojamas 5 minutes apie 14000 rpm. Supernatantas atsargiai pašalinamas.
- 6) Nuosėdos užpilamos 200 – 300 µl vandens be nukleazių.
- 7) Mėgintuvėlis inkubuojamas termostate 15 minučių apie 99 °C.
- 8) Po to mėgintuvėlis greitai atšaldomas termostate apie – 4 °C.
- 9) Mėgintuvėlis centrifuguojamas 5 minutes apie 14000 rpm apie + 4 °C.
- 10) Išskirta DNR saugoma + 5 °C (trumpą laiką) arba – 20 °C (ilgą laiką) temperatūroje.

FastQC Report		FastQC Report	
Summary		Summary	
	Basic Statistics		Basic Statistics
	Per base sequence quality		Per base sequence quality
	Per tile sequence quality		Per tile sequence quality
	Per sequence quality scores		Per sequence quality scores
	Per base sequence content		Per base sequence content
	Per sequence GC content		Per sequence GC content
	Per base N content		Per base N content
	Sequence Length Distribution		Sequence Length Distribution
	Sequence Duplication Levels		Sequence Duplication Levels
	Overrepresented sequences		Overrepresented sequences
	Adapter Content		Adapter Content

3.1 pav. Sekų kokybės patikros ataskaita. Kairėje – aukštos kokybės seka, tinkama analizei. Dešinėje – prastos kokybės seka, analizei netinkama.