

Univerza v Ljubljani  
Veterinarska fakulteta



Majda Golob

**ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM  
IN VIRULENČNI DEJAVNIKI ENTEROKOKOV  
PRI ŽIVALIH IN V ŽIVILIH ŽIVALSKEGA IZVORA**

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2021

Univerza v Ljubljani  
Veterinarska fakulteta



UDK 579.62:579.842.1/.2:615.33:615.015.8(043.3)

Majda Golob, dr. vet. med

**ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM IN  
VIRULENČNI DEJAVNIKI ENTEROKOKOV  
PRI ŽIVALIH IN V ŽIVILIH ŽIVALSKEGA IZVORA**

Doktorska disertacija

**ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND VIRULENCE  
FACTORS IN ENTEROCOCCI FROM ANIMALS AND  
FOOD OF ANIMAL ORIGIN**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2021

Majda Golob

Odpornost proti antibiotikom in virulenčni dejavniki enterokokov pri živalih in v živilih živalskega izvora.

Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani, manjši del pa tudi na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Javni zagovor je bil opravljen:

*Mentorica:* izr. prof. dr. Irena Zdovec

*Somentorica:* viš. znan. sod. dr. Mateja Pate

*Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:*

Predsednik: znan. svet. dr. Matjaž Ocepek  
(Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta)

Član: prof. dr. Andrej Kirbiš  
(Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta)

Članica: prof. dr. Katja Seme  
(Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta)

Izvaja o delu:

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu.

## IZVLEČEK

**Ključne besede:** *Enterococcus* spp; klinični vzorci ljudi in živali; rejne živali; živila živalskega izvora; školjke; odpornost proti protimikrobnim zdravilom; virulenčni dejavniki; filmotvornost

Enterokoki so ubikvitarni mikroorganizmi, indikatorji fekalne kontaminacije in del normalne črevesne mikrobiote, ki lahko povzročajo resne okužbe ljudi in živali, pomembni so tudi kot povzročitelji okužb, povezanih z zdravstvom. Namen naše raziskave je bil pridobiti podatke o odpornosti in virulenčnih dejavnikih pri enterokokih, izoliranih iz vzorcev rejnih in ljubiteljskih živali ter živil živalskega izvora ter jih primerjati z enterokoki, izoliranimi iz kliničnih vzorcev ljudi. Analizirali smo 854 enterokokov 16 različnih vrst. Z mikrodilucijsko metodo določanja minimalne inhibitorne koncentracije smo ugotavljali odpornost enterokokov proti 12 antibiotikom. Z metodo verižne reakcije s polimerazo smo ugotavljali prisotnost sedmih genov za virulenčne dejavnike: *ace*, *asa1*, *cylA*, *efaA*, *esp*, *gelE* in *hyl*. Največji delež odpornosti smo ugotovili proti tetraciklinu, eritromicinu in ciprofloksacinu. Občutljivost enterokokov za skupino kritično pomembnih antibiotikov, ki se uporabljajo za zdravljenje okužb ljudi, je bila večinoma dobro ohranjena. Največji delež odpornosti smo ugotovili pri enterokokih iz kliničnih vzorcev ljudi in živali, mesa piščancev in perutninske klavnice, najmanjšega pa pri enterokokih iz govejega mesa. Pri živalih smo izolirali tudi 10 proti vankomicinu odpornih enterokokov in 59 enterokokov, ki so bili odporni proti visokim koncentracijam aminoglikozidov. Največ genov za virulenčne dejavnike smo ugotovili pri izolatih vrste *Enterococcus faecalis*, od tega najpogosteje gene *efaA*, *gelE* in *ace*. Izolati vrste *Enterococcus faecium* so bili najpogosteje nosilci genov *esp* in *hyl*. Skupaj smo pri vseh testiranih enterokokih določili 28 različnih virulenčnih tipov. Na osnovi predhodno ugotovljenih genov za površinske adhezine (*ace*, *asa1* in *esp*) smo 92 izbranih izolatov testirali glede sposobnosti filmotvornosti na mikrotitrskih ploščicah. Pri izolatih s kombinacijo vseh treh genov smo ugotovili močno značilno povezavo s filmotvornostjo, vendar pa pri primerjavi posameznih genov te povezave nismo ugotovili za gen *asa1*. Rezultati naše raziskave v splošnem ne kažejo na večjo nevarnost zaradi neposrednega prenosa odpornih ali bolj patogenih enterokokov z živali na ljudi, nedvomno pa predstavljajo zelo pomemben rezervoar genov za odpornost in številne virulenčne dejavnike. Raziskava predstavlja pomemben doprinos k oceni tveganja za prenos odpornih enterokokov ter virulenčnih determinant iz živali na ljudi, bodisi preko prehranske verige ali pa preko ljubiteljskih živali.

## ABSTRACT

**Key words:** *Enterococcus* spp; human and animal clinical samples; livestock; food of animal origin; mussels; antimicrobial resistance; virulence factors; biofilm forming ability

Enterococci are ubiquitous microorganisms, indicators of faecal contamination and a part of normal intestinal microbiota, which are also capable of causing serious infections in humans and animals. They are also an important cause of nosocomial infections. The aim of the present study was to collect data about the prevalence of antimicrobial resistance and virulence genes in enterococci isolated from pet animals, livestock and food of animal origin in order to compare them with enterococci isolated from human clinical samples. A total of 854 *Enterococcus* isolates belonging to 16 species were analysed. Broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentrations of 12 antimicrobials. Polymerase chain reaction was used to detect the presence of seven virulence-associated genes (*ace*, *asa1*, *cylA*, *efaA*, *esp*, *gelE* and *hyl*). The highest resistance rate was found for tetracycline, erythromycin and ciprofloxacin. The susceptibility of enterococci for the critically important antimicrobials for human medicine was generally well conserved. The highest resistance rate was detected in isolates from human and animal clinical samples, broiler meat and poultry slaughterhouse, whereas the smallest proportion of resistance was observed in isolates from beef. In animals, 10 vancomycin-resistant isolates and 59 isolates with high-level aminoglycoside resistance were discovered. The highest occurrence of virulence-associated genes was observed in *Enterococcus faecalis* isolates, most commonly genes *efaA*, *gelE* and *ace*. *Enterococcus faecium* isolates most frequently harboured genes *esp* and *hyl*. In total, 28 distinct virulence types were identified. According to the previously detected genes encoding surface adhesins (*ace*, *asa1* and *esp*), 92 isolates were selected to determine their biofilm forming ability on microtiter plates. The presence of all three aforementioned genes was significantly associated with their biofilm forming ability, as well as the sole presence of *ace* or *esp* gene, respectively, whereas no significant association was identified for *asa1* gene. The results of the present study indicate a risk for direct transmission of resistant or highly virulent enterococci from animals to humans. In addition, enterococci represent an important reservoir of resistance and virulence-associated genes. The study is an important contribution to risk assessment regarding the transmission of resistant and virulent enterococci from animals to humans, either via food chain or pet animals.

## KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK.....	5
ABSTRACT .....	6
KAZALO VSEBINE .....	7
KAZALO TABEL .....	10
KAZALO SLIK.....	15
KAZALO PRILOG .....	18
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV .....	21
<b>1 UVOD .....</b>	<b>23</b>
1.1 NAMEN RAZISKAVE.....	24
1.2 HIPOTEZE.....	25
<b>2 PREGLED LITERATURE .....</b>	<b>26</b>
2.1 ENTEROKOKI .....	26
<b>2.1.1 Splošne značilnosti in klasifikacija rodu <i>Enterococcus</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1.2 Mikrobiološka diagnostika .....</b>	<b>29</b>
2.2 PATOGENEZA – OKUŽBE PRI LJUDEH IN ŽIVALIH .....	31
<b>2.2.1 Vir okužbe .....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.2 Virulenčni dejavniki.....</b>	<b>32</b>
2.2.2.1 Ace, protein, ki veže kolagene (angl. <i>collagen binding protein</i> ) .....	33
2.2.2.2 Asa1, agregacijska snov (angl. <i>aggregation substance</i> ).....	33
2.2.2.3 CylA, citolizin – hemolizin (angl. <i>cytolysin</i> ).....	34
2.2.2.4 EfaA, <i>Enterococcus faecalis</i> antigen (angl. <i>endocarditis antigen</i> ) .....	34
2.2.2.5 Esp, enterokokini površinski protein (angl. <i>enterococcal surface protein</i> ) .	34
2.2.2.6 GelE, želatinaza (angl. <i>gelatinase</i> ).....	34
2.2.2.7 Hyl, hialuronidaza (angl. <i>hyaluronidase</i> ).....	34
<b>2.2.3 Tvorba biofilma .....</b>	<b>34</b>
<b>2.2.4 Zdravljenje enterokoknih okužb.....</b>	<b>36</b>
2.3 ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM.....	37
<b>2.3.1 Odpornost enterokokov .....</b>	<b>37</b>
2.3.1.1 Odpornost proti betalaktamskim antibiotikom .....	40
2.3.1.2 Odpornost proti glikopeptidom .....	41
2.3.1.3 Odpornost proti aminoglikozidnim antibiotikom .....	42
2.3.1.4 Odpornost proti tetraciklinom .....	43
2.3.1.5 Odpornost proti makrolidom, linkozaminom in streptograminom.....	43
2.3.1.6 Odpornost proti fluorokinolonom.....	44
2.3.1.7 Odpornost proti linezolidu.....	44
2.3.1.8 Odpornost proti daptomicinu.....	45

2.3.2	<b>Odpornost enterokokov pri ljudeh .....</b>	<b>45</b>
2.3.3	<b>Odpornost enterokokov pri živalih .....</b>	<b>47</b>
2.4	ENTEROKOKI V ŽIVILIH ŽIVALSKEGA IZVORA .....	49
2.4.1	<b>Odpornost enterokokov iz živil živalskega izvora .....</b>	<b>50</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>52</b>
3.1	BAKTERIJSKI IZOLATI .....	52
3.1.1	<b>Humani klinični izolati .....</b>	<b>54</b>
3.1.2	<b>Izolati iz kliničnih vzorcev živali .....</b>	<b>54</b>
3.1.3	<b>Izolati iz mesa .....</b>	<b>56</b>
3.1.4	<b>Izolati iz mleka in mlečnih izdelkov .....</b>	<b>57</b>
3.1.5	<b>Izolati iz školjk .....</b>	<b>58</b>
3.1.6	<b>Izolati iz fecesa .....</b>	<b>58</b>
3.1.7	<b>Ostali izolati iz prehranske verige (od farme do klavnice) .....</b>	<b>59</b>
3.1.7.1	Perutninska klavnica .....	60
3.1.7.2	Prašičja farma in klavnica .....	60
3.2	OPIS METOD .....	62
3.2.1	<b>Izolacija in identifikacija enterokokov iz kliničnih vzorcev živali ter vzorcev živil živalskega izvora, fecesa in vzorcev okolja .....</b>	<b>62</b>
3.2.2	<b>Identifikacija enterokokov do vrste .....</b>	<b>63</b>
3.2.3	<b>Ugotavljanje odpornosti enterokokov proti različnim skupinam protimikrobnih zdravil .....</b>	<b>64</b>
3.2.4	<b>Verižna reakcija s polimerazo (PCR) .....</b>	<b>67</b>
3.2.4.1	Izolacija DNA iz bakterijskih kultur .....	67
3.2.4.2	Ugotavljanje genov za virulenčne dejavnike .....	68
3.2.4.2.1	<i>PCR 1: geni <i>asaI</i>, <i>cylA</i>, <i>esp</i>, <i>gelE</i> in <i>hyl</i> .....</i>	<i>68</i>
3.2.4.2.2	<i>PCR 2: gena <i>ace</i> in <i>efaA</i> .....</i>	<i>69</i>
3.2.4.3	Ugotavljanje genov za odpornost proti vankomicinu .....	70
3.2.4.4	Analiza pomnoženih odsekov DNA .....	71
3.2.5	<b>Test tvorbe biofilma na mikrotitrskih ploščah .....</b>	<b>72</b>
3.2.5.1	Izbor enterokokov za testiranje filmotvornosti .....	72
3.2.5.2	Postopek testiranja .....	73
3.2.5.3	Interpretacija rezultatov .....	74
3.2.6	<b>Statistične analize .....</b>	<b>74</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>76</b>
4.1	ENTEROKOKI IZ KLINIČNIH VZORCEV LJUDI IN ŽIVALI .....	88
4.1.1	<b>Odpornost enterokokov iz kliničnih vzorcev ljudi in živali .....</b>	<b>88</b>
4.1.2	<b>Geni za virulenčne dejavnike pri enterokokih iz kliničnih vzorcev ljudi in živali .....</b>	<b>92</b>

4.2	ENTEROKOKI PRI PERUTNINI.....	95
4.2.1	<b>Odpornost enterokokov iz mesa in fecesa piščancev ter perutninske klavnice</b> .....	<b>95</b>
4.2.1.1	Odpornost enterokokov iz mesa piščancev .....	99
4.2.1.2	Odpornost enterokokov iz fecesa piščancev.....	99
4.2.1.3	Odpornost enterokokov iz perutninske klavnice .....	100
4.2.2	<b>Geni za virulenčne dejavnike pri enterokokih iz vzorcev perutnine .....</b>	<b>102</b>
4.3	ENTEROKOKI PRI PRAŠIČIH.....	104
4.3.1	<b>Odpornost enterokokov iz mesa in fecesa prašičev ter prašičje farme in klavnice.....</b>	<b>104</b>
4.3.1.1	Odpornost enterokokov iz svinjine.....	108
4.3.1.2	Odpornost enterokokov iz fecesa prašičev .....	108
4.3.1.3	Odpornost enterokokov iz prašičje farme in klavnice .....	109
4.3.2	<b>Geni za virulenčne dejavnike pri enterokokih iz vzorcev prašičev.....</b>	<b>109</b>
4.4	ENTEROKOKI PRI PREŽVEKOVALCIH .....	112
4.4.1	<b>Odpornost enterokokov iz govedine ter mleka in mlečnih izdelkov .....</b>	<b>112</b>
4.4.1.1	Odpornost enterokokov iz govedine.....	115
4.4.1.2	Odpornost enterokokov iz mleka in mlečnih izdelkov .....	115
4.4.2	<b>Geni za virulenčne dejavnike pri enterokokih iz vzorcev prežvekovalcev..</b>	<b>116</b>
4.5	ENTEROKOKI IZ ŠKOLJK KLAPAVIC .....	118
4.5.1	<b>Odpornost enterokokov iz školjk klapavic.....</b>	<b>118</b>
4.5.2	<b>Geni za virulenčne dejavnike pri enterokokih iz školjk klapavic.....</b>	<b>119</b>
4.6	TVORBA BIOFILMA .....	121
4.7	REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE .....	124
5	<b>RAZPRAVA .....</b>	<b>126</b>
5.1	ODPORNOST ENTEROKOKOV.....	128
5.2	VIRULENČNI DEJAVNIKI .....	137
5.3	FILMOTVORNOST .....	143
6	<b>ZAKLJUČKI .....</b>	<b>145</b>
7	<b>POVZETEK.....</b>	<b>147</b>
8	<b>SUMMARY.....</b>	<b>150</b>
9	<b>ZAHVALE .....</b>	<b>153</b>
10	<b>LITERATURA .....</b>	<b>154</b>
11	<b>PRILOGE .....</b>	<b>172</b>



## KAZALO TABEL

<b>Tabela 1:</b> Vrste enterokokov (povzeto po LPSN, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature).....	27
<i>Table 1: Enterococcal species (adopted from LPSN, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature).</i>	
<b>Tabela 2:</b> Skupine testiranih antibiotikov in njihov mehanizem delovanja.....	39
<i>Table 2: Antimicrobial groups tested and their resistance mechanism.</i>	
<b>Tabela 3:</b> Delež odpornih invazivnih (hemokultura in cerebrospinalna tekočina) izolatov vrst <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> v letih 2017 in 2018 (EARS-Net Slovenija).....	46
<i>Table 3: Proportion of resistant invasive E. faecalis and E. faecium isolates in years 2017 and 2018 (EARS-Net Slovenija).</i>	
<b>Tabela 4:</b> Pregled števila [ <i>n</i> ] in vrst enterokokov, ki so bili zajeti v raziskavo, ter izolirani iz različnih vrst vzorcev.....	53
<i>Table 4: Overview of the number [<i>n</i>] and enterococcal species, isolated from different types of samples included in the study.</i>	
<b>Tabela 5:</b> Izvor in število [ <i>n</i> ] enterokokov iz humanih kliničnih vzorcev.....	54
<i>Table 5: Origin and number [<i>n</i>] of enterococci from human clinical samples.</i>	
<b>Tabela 6:</b> Izvor in število [ <i>n</i> ] enterokokov iz živalskih kliničnih vzorcev. ....	55
<i>Table 6: Origin and number [<i>n</i>] of enterococci from animal clinical samples.</i>	
<b>Tabela 7:</b> Izvor in število [ <i>n</i> ] enterokokov iz kravjega mleka in mlečnih izdelkov. ....	57
<i>Table 7: Origin and number [<i>n</i>] of enterococci from cow`s milk and milk products.</i>	
<b>Tabela 8:</b> Izvor in število [ <i>n</i> ] enterokokov iz ovčjega in kozjega mleka ter mlečnih izdelkov. ....	58
<i>Table 8: Origin and number [<i>n</i>] of enterococci from sheep or goat milk and milk products.</i>	
<b>Tabela 9:</b> Izvor in število [ <i>n</i> ] enterokokov iz perutninske klavnice. ....	61
<i>Table 9: Origin and number [<i>n</i>] of enterococci from a poultry slaughterhouse.</i>	
<b>Tabela 10:</b> Izvor in število [ <i>n</i> ] enterokokov iz prašičje farme in klavnice. ....	61
<i>Table 10: Origin and number [<i>n</i>] of enterococci from a pig farm and slaughterhouse.</i>	
<b>Tabela 11:</b> Razporeditev in koncentracija protimikrobnih zdravil na mikrotitrski plošči EUVENC (Trek, Diagnostic Systems). ....	64
<i>Table 11: Antimicrobial distribution and concentration on microtitre plate formate EUVENC (Trek, Diagnostic Systems).</i>	
<b>Tabela 12:</b> Epidemiološke mejne vrednosti (ECOFFs), na osnovi katerih smo interpretirali občutljivost posameznih enterokokov za testirane antibiotike, ter klinične mejne vrednosti za enterokoke po podatkih standarda EUCAST.....	67
<i>Table 12: Epidemiological cutoff values (ECOFFs), which were used for the interpretation of antimicrobial susceptibility for the tested antimicrobials, and clinical cutoff values for enterococci according to the EUCAST standard.</i>	

<b>Tabela 13:</b> Zaporedja začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili za določanje genov <i>asaI</i> , <i>cylA</i> , <i>esp</i> , <i>gelE</i> in <i>hyl</i> v reakciji PCR 1 in pričakovana velikost pomnoženih odsekov DNA. ....	68
<i>Table 13: Primers used for determination of asaI, cylA, esp, gelE and hyl genes in PCR 1 reaction and the expected PCR product sizes.</i>	
<b>Tabela 14:</b> Program pomnoževanja DNA za ugotavljanje genov <i>asaI</i> , <i>cylA</i> , <i>esp</i> , <i>gelE</i> in <i>hyl</i> v reakciji PCR 1. ....	69
<i>Table 14: DNA amplification program for detection of asaI, cylA, esp, gelE and hyl genes in PCR 1 reaction.</i>	
<b>Tabela 15:</b> Zaporedja začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili za določanje genov <i>ace</i> in <i>efaA</i> v reakciji PCR 2 in pričakovana velikost pomnoženih odsekov DNA. ....	69
<i>Table 15: Primers used for determination of ace and efaA genes in PCR 2 reaction and the expected PCR product sizes.</i>	
<b>Tabela 16:</b> Program pomnoževanja DNA za ugotavljanje genov <i>ace</i> in <i>efaA</i> v reakciji PCR 2. ....	70
<i>Table 16: DNA amplification program for detection of ace and efaA genes in PCR 2 reaction.</i>	
<b>Tabela 17:</b> Zaporedja začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili za določanje genov <i>vanA</i> in <i>vanB</i> v reakciji PCR in pričakovana velikost pomnoženih odsekov DNA. ....	70
<i>Table 17: Primers used for determination of vanA and vanB genes in PCR reaction and the expected PCR product sizes.</i>	
<b>Tabela 18:</b> Program pomnoževanja DNA za ugotavljanje genov <i>vanA</i> in <i>vanB</i> v reakciji PCR. ....	71
<i>Table 18: DNA amplification program for detection of vanA and vanB genes in PCR reaction.</i>	
<b>Tabela 19:</b> Sestava in priprava fosfatnega pufera (PBS) za spiranje mikrotitrskih ploščic. ....	73
<i>Table 19: Composition and preparation of Phosphate Buffered Saline (PBS) for microtiter plate washing.</i>	
<b>Tabela 20:</b> Razporeditev enterokokov glede na možnost tvorbe biofilmov v mikrotitrskih ploščicah; povzeto po Stepanović in sod. (2000). ....	74
<i>Table 20: Distribution of enterococci according to the ability of biofilm formation in microtiter plates; adopted from Stepanović et al. (2000).</i>	
<b>Tabela 21:</b> Število in delež odpornih enterokokov pri posameznih vrstah za vse testirane izolate ( $n = 854$ ). ....	78
<i>Table 21: Number and proportion of resistant enterococci according to species for all the tested isolates (<math>n = 854</math>).</i>	
<b>Tabela 22:</b> Število in delež enterokokov z geni za virulenčne dejavnike pri posameznih vrstah za vse testirane izolate ( $n = 854$ ). ....	82
<i>Table 22: Number and proportion of enterococci harboring virulence genes according to species for all the tested isolates (<math>n = 854</math>).</i>	
<b>Tabela 23:</b> Število in delež izolatov vrst <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> glede na virulenčni tip. ....	84
<i>Table 23: Number and proportion of E. faecalis and E. faecium isolates according to the virulence pattern.</i>	

- Tabela 24:** Število in delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz kliničnih vzorcev ljudi in živali glede na občutljivost za različne skupine antibiotikov..... 89  
*Table 24:* Number and proportion of resistant *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from human and animal clinical samples according to the susceptibility to different groups of antimicrobials.
- Tabela 25:** Število in delež odpornih izolatov drugih vrst enterokokov kliničnih vzorcev živali glede na občutljivost za različne skupine antibiotikov..... 90  
*Table 25:* Number and proportion of resistant other enterococcal isolates from animal clinical samples according to susceptibility to different groups of antimicrobials.
- Tabela 26:** Prisotnost genov za virulenčne dejavnike pri izolatih vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz kliničnih vzorcev ljudi in živali. .... 93  
*Table 26:* The presence of virulence genes in *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from human and animal clinical samples.
- Tabela 27:** Virulenčni tipi, ugotovljeni pri izolatih vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz kliničnih vzorcev ljudi in živali. .... 94  
*Table 27:* Virulence patterns observed in *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from human and animal clinical samples.
- Tabela 28:** Število in delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz mesa in fecesa piščancev ter perutninske klavnice glede na občutljivost za različne skupine antibiotikov..... 97  
*Table 28:* Number and proportion of resistant isolates of *E. faecalis* and *E. faecium* from broiler meat, feces and poultry slaughterhouse according to susceptibility to different groups of antimicrobials.
- Tabela 29:** Število in delež odpornih izolatov drugih vrst enterokokov iz mesa in fecesa piščancev ter perutninske klavnice glede na občutljivost za različne skupine antibiotikov..... 97  
*Table 29:* Number and proportion of resistant isolates of other enterococcal species from broiler meat, feces and poultry slaughterhouse according to susceptibility to different groups of antimicrobials.
- Tabela 30:** Vzorci odpornosti proti antibiotikom pri enterokokih iz piščančjih farm A, B in C na klavni liniji. .... 101  
*Table 30:* Antimicrobial resistance patterns in enterococci from broiler farms A, B and C at the slaughter line.
- Tabela 31:** Prisotnost genov za virulenčne dejavnike pri izolatih vrste *E. faecalis* iz mesa in fecesa piščancev ter perutninske klavnice. .... 102  
*Table 31:* The presence of virulence genes in *E. faecalis* isolates from broiler meat, feces and poultry slaughterhouse.
- Tabela 32:** Virulenčni tipi, ugotovljeni pri izolatih vrste *E. faecalis* iz mesa in fecesa piščancev ter perutninske klavnice. .... 103  
*Table 32:* Virulence patterns observed in *E. faecalis* isolates from broiler meat, feces and poultry slaughterhouse.
- Tabela 33:** Število in delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz svinjine, fecesa prašičev ter iz prašičje farme in klavnice glede na občutljivost za različne skupine protimikrobnih zdravil..... 106  
*Table 33:* Number and proportion of resistant isolates of *E. faecalis* and *E. faecium* from pork, pig feces, pig farm and pig slaughterhouse according to susceptibility to different groups of antimicrobials.

- Tabela 34:** Število in delež odpornih izolatov drugih vrst enterokokov iz iz svinjine, fecesa prašičev ter iz prašičje farme in klavnice glede na občutljivost za različne skupine protimikrobnih zdravil. .... 106  
*Table 34: Number and proportion of resistant isolates of other enterococcal species from pork, pig feces, pig farm and pig slaughterhouse according to susceptibility to different groups of antimicrobials.*
- Tabela 35:** Prisotnost genov za virulenčne dejavnike pri izolatih vrste *E. faecalis* iz mesa in fecesa prašičev ter prašičje farme in klavnice. .... 110  
*Table 35: The presence of virulence genes in E. faecalis isolates from pig meat, feces, farm and slaughterhouse.*
- Tabela 36:** Virulenčni tipi, ugotovljeni pri izolatih vrste *E. faecalis* iz mesa in fecesa pašičev ter prašičje farme in klavnice. .... 111  
*Table 36: Virulence patterns observed in E. faecalis isolates from pig meat, feces, farm and slaughterhouse.*
- Tabela 37:** Število in delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* pri prežvekovalcih glede na občutljivost za različne skupine protimikrobnih zdravil. .... 114  
*Table 37: Number and proportion of resistant E. faecalis and E. faecium isolates from ruminants according to susceptibility to different groups of antimicrobials.*
- Tabela 38:** Prisotnost genov za virulenčne dejavnike pri enterokokih iz govedine, mleka in mlečnih izdelkov. .... 116  
*Table 38: The presence of virulence genes in enterococci from beef, milk and dairy products.*
- Tabela 39:** Virulenčni tipi, ugotovljeni pri izolatih vrste *E. faecalis* iz govedine ter mleka in mlečnih izdelkov. .... 117  
*Table 39: Virulence patterns observed in E. faecalis isolates from beef, milk and dairy products.*
- Tabela 40:** Število in delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis*, *E. faecium* in drugih vrst enterokokov iz školjk klapavic glede na občutljivost za različne skupine protimikrobnih zdravil. .... 119  
*Table 40: Number and proportion of resistant isolates of E. faecalis, E. faecium and other enterococcal species from mussels according to susceptibility to different groups of antimicrobials.*
- Tabela 41:** Prisotnost genov za virulenčne dejavnike pri izolatih vrst *E. faecalis*, *E. faecium* in ostalih vrstah enterokokov iz školjk. .... 120  
*Table 41: The presence of virulence genes in E. faecalis, E. faecium and other enterococcal isolates from mussels.*
- Tabela 42:** Virulenčni tipi, ugotovljeni pri izolatih *E. faecalis* in *E. faecium* iz školjk klapavic. .... 120  
*Table 42: Virulence patterns observed in E. faecalis and E. faecium isolates from mussels.*
- Tabela 43:** Kategorije filmotvornosti med izbranimi vrstami enterokokov. .... 121  
*Table 43: Biofilm-forming categories among the selected Enterococcus species.*
- Tabela 44:** Kategorije filmotvornosti glede na različne kombinacije genov za virulenčne dejavnike. .... 122  
*Table 44: Biofilm-forming categories according to different virulence patterns.*

**Tabela 45:** Statistična primerjava izolatov kliničnega in nekliničnega izvora v povezavi z odpornostjo proti antibiotikom. .... 124

*Table 45: Statistical comparison of isolates of clinical and non-clinical origin with respect to antimicrobial resistance.*

**Tabela 46:** Statistična primerjava izolatov kliničnega in nekliničnega izvora v povezavi s prisotnostjo genov za virulenčne dejavnike. .... 125

*Table 46: Statistical comparison of isolates of clinical and non-clinical origin with respect to the presence of virulence genes.*

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Kolonije bakterij vrste <i>E. faecalis</i> in vrste <i>E. faecium</i> na krvnem agarju.....	29
<i>Figure 1: Clonies of E. faecalis and E. faecium isolates on blood agar.</i>	
<b>Slika 2:</b> Stopnje razvoja biofilma pri enterokokih (Ch'ng in sod., 2019).....	36
<i>Figure 2: Stages of biofilm development in enterococci (Ch'ng et al., 2019).</i>	
<b>Slika 3:</b> Mehanizmi sekundarne odpornosti pri enterokokih (Arias in Murray, 2012).....	38
<i>Figure 3: Mechanisms of enterococcal antimicrobial resistance (Arias and Murray, 2012).</i>	
<b>Slika 4:</b> Enterokoki skozi čas: pomembnejši dogodki glede okužb pri ljudeh, odpornosti proti antibiotikom in čas uvedbe novega antibiotika za zdravljenje (García-Solache in Rice, 2019). ....	40
<i>Figure 4: Timeline of relevant events in the history of enterococci as human pathogens, appearance of antibiotic resistance and antibiotic debut (García-Solache and Rice, 2019).</i>	
<b>Slika 5:</b> Vrste enterokokov, analiziranih v raziskavi. ....	52
<i>Figure 5: Enterococcal species analyzed in the study.</i>	
<b>Slika 6:</b> Izvor in vrste testiranih enterokokov iz vzorcev živali.....	55
<i>Figure 6: Origin and species of enterococci tested from animal samples.</i>	
<b>Slika 7:</b> Število posameznih vrst enterokokov, izoliranih iz mesa piščancev, svinjine in govedine. ....	56
<i>Figure 7: Number of enterococcal species from chicken, pork and beef.</i>	
<b>Slika 8:</b> Število posameznih vrst enterokokov, izoliranih iz fecesa piščancev in prašičev.....	59
<i>Figure 8: Number of enterococcal species from broiler and pig feces.</i>	
<b>Slika 9:</b> Število posameznih vrst enterokokov, izoliranih iz prehranske verige. ....	60
<i>Figure 9: Number of enterococcal species from food chain.</i>	
<b>Slika 10:</b> Kultura vrste <i>E. faecalis</i> na krvnem agarju in kromogenem URI agarju po 24-h inkubaciji pri 37 °C. ....	62
<i>Figure 10: Culture of E. faecalis on blood agar and chromogenic URI agar after 24-h incubation at 37 °C.</i>	
<b>Slika 11:</b> Kolonije bakterije vrste <i>E. faecalis</i> in vrste <i>E. faecium</i> na gojičsu SBA.....	63
<i>Figure 11: Colonies of E. faecalis and E. faecium isolates on SBA agar.</i>	
<b>Slika 12:</b> Testiranje enterokokov glede odpornosti proti protimikrobnim zdravilom z mikrodilucijsko metodo: inokulacija suspenzije enterokokov z avtomatskim razlivalcem. ....	65
<i>Figure 12: Antimicrobial susceptibility testing of enterococci by microdilution method: inoculation of enterococcal suspension with automatic dispenser.</i>	
<b>Slika 13:</b> Mikrodilucijska metoda za določanje minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK): rast bakterij v obliki gumbka na dnu jamice, kjer antibiotik ni preprečil bakterijske rasti. ....	66
<i>Figure 13: Microdilution method for determination of the minimum inhibitory concentration (MIC): bacterial growth at the bottom of wells, where antimicrobial did not inhibit bacterial growth.</i>	

<b>Slika 14:</b> Prikaz rezultatov pomnoževanja genov <i>asa1</i> , <i>cylA</i> , <i>esp</i> , <i>gelE</i> in <i>hyl</i> s kapilarno elektroforezo QIAxcel. ....	72
<i>Figure 14:</i> Example of QIAxcel capillary electrophoresis results for <i>asa1</i> , <i>cylA</i> , <i>esp</i> , <i>gelE</i> and <i>hyl</i> genes.	
<b>Slika 15:</b> Delež odpornih enterokokov pri posameznih skupinah vzorcev. ....	76
<i>Figure 15:</i> Proportion of resistant enterococcal isolates from individual groups of samples.	
<b>Slika 16:</b> Delež večkratno odpornih (VOB) enterokokov pri posameznih skupinah vzorcev. ....	77
<i>Figure 16:</i> Proportion of multidrug resistant (MDR) enterococcal isolates from individual groups of samples.	
<b>Slika 17:</b> Delež odpornosti pri izolatih vrste <i>E. faecalis</i> pri posameznih skupinah vzorcev. ...	79
<i>Figure 17:</i> Percentage of resistance in <i>E. faecalis</i> isolates from individual groups of samples.	
<b>Slika 18:</b> Delež odpornosti pri izolatih vrste <i>E. faecium</i> pri posameznih skupinah vzorcev. ...	80
<i>Figure 18:</i> Percentage of resistance in <i>E. faecium</i> isolates from individual groups of samples.	
<b>Slika 19:</b> Število enterokokov, odpornih proti visokim koncentracijam aminoglikozidov (HLAR), in proti vankomicinu odporni enterokoki (VRE) pri posameznih skupinah vzorcev. ....	81
<i>Figure 19:</i> Number of high-level resistant enterococci (HLAR) and vancomycin-resistant enterococci (VRE) from individual groups of samples.	
<b>Slika 20:</b> Število različnih virulenčnih tipov pri posameznih skupinah vzorcev glede na vrsto enterokokov. ....	83
<i>Figure 20:</i> Number of different virulence types from individual groups of samples according to the species of enterococci.	
<b>Slika 21:</b> Virulenčni tipi izolatov vrst <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> pri posameznih skupinah vzorcev. ....	85
<i>Figure 21:</i> Virulence types of <i>E. faecalis</i> and <i>E. faecium</i> isolates from individual groups of samples.	
<b>Slika 22:</b> Delež izolatov vrste <i>E. faecalis</i> z geni za virulenčne dejavnike v posameznih skupinah vzorcev. ....	86
<i>Figure 22:</i> Proportion of <i>E. faecalis</i> isolates with virulence genes from individual groups of samples.	
<b>Slika 23:</b> Delež izolatov vrste <i>E. faecium</i> z geni za virulenčne dejavnike v posameznih skupinah vzorcev. ....	87
<i>Figure 23:</i> Proportion of <i>E. faecium</i> isolates with virulence genes from individual groups of samples.	
<b>Slika 24:</b> Število odpornih enterokokov iz kliničnih vzorcev ljudi in živali. ....	88
<i>Figure 24:</i> Number of resistant enterococci from human and animal clinical samples.	
<b>Slika 25:</b> Delež odpornih izolatov vrst <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> iz kliničnih vzorcev ljudi in živali. ....	91
<i>Figure 25:</i> Proportion of resistant <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> isolates from human and animal clinical samples.	
<b>Slika 26:</b> Število odpornih enterokokov iz mesa in fecesa piščancev ter iz perutninske klavnice. ....	96
<i>Figure 26:</i> Number of resistant enterococci from broiler meat, feces and poultry slaughterhouse.	

<b>Slika 27:</b> Delež odpornih izolatov vrst <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> iz mesa in fecesa piščancev ter perutninske klavnice.....	98
<i>Figure 27:</i> Proportion of resistant <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> isolates from broiler meat, feces and poultry slaughterhouse.	
<b>Slika 28:</b> Število odpornih enterokokov iz svinjine fecesa prašičev ter prašičje farme in klavnice.....	105
<i>Figure 28:</i> Number of resistant enterococci from pork, pig feces, pig farm and pig slaughterhouse.	
<b>Slika 29:</b> Delež odpornih izolatov vrst <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> iz svinjine, fecesa prašičev ter iz prašičje farme in klavnice.....	107
<i>Figure 29:</i> Proportion of resistant <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> isolates from pork, pig feces, pig farm and pig slaughterhouse.	
<b>Slika 30:</b> Število odpornih enterokokov iz govedine ter iz mleka in mlečnih izdelkov. ....	113
<i>Figure 30:</i> Number of resistant enterococci from beef, milk and dairy products.	
<b>Slika 31:</b> Delež odpornih izolatov vrst <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> iz govedine ter mleka in mlečnih izdelkov. ....	114
<i>Figure 31:</i> Proportion of resistant <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> isolates from beef milk and dairy products.	
<b>Slika 32:</b> Število odpornih enterokokov iz školjk klapavic. ....	118
<i>Figure 32:</i> Number of resistant enterococci from mussels.	
<b>Slika 33:</b> Povprečje vseh izmerjenih vrednosti OD <sub>540</sub> za izbrane izolate enterokokov. ....	123
<i>Figure 33:</i> Average OD <sub>540</sub> values for selected enterococcal isolates.	



## KAZALO PRILOG

<b>Priloga 1:</b> Seznam 92 enterokokov za fenotipsko testiranje filmotvornosti. ....	172
<i>Supplementary data 1: List of 92 enterococcal isolates for phenotypic testing of biofilm formation.</i>	
<b>Priloga 2:</b> Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> iz humanih kliničnih vzorcev ( $n = 101$ ). ....	173
<i>Supplementary data 2: Distribution of MICs and proportion of resistant <i>E. faecalis</i> and <i>E. faecium</i> isolates from human clinical samples (<math>n = 101</math>).</i>	
<b>Priloga 3:</b> Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> iz kliničnih vzorcev živali ( $n = 71$ ). ....	174
<i>Supplementary data 3: Distribution of MICs and proportion of resistant <i>E. faecalis</i> and <i>E. faecium</i> isolates from animal clinical samples (<math>n = 71</math>).</i>	
<b>Priloga 4:</b> Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst <i>E. cecorum</i> in <i>E. hirae</i> iz kliničnih vzorcev živali ( $n = 30$ ). ....	175
<i>Supplementary data 4: Distribution of MICs and proportion of resistant <i>E. cecorum</i> and <i>E. hirae</i> isolates from animal clinical samples (<math>n = 30</math>).</i>	
<b>Priloga 5:</b> Distribucija MIK in delež odpornih izolatov drugih vrst enterokokov iz kliničnih vzorcev živali ( $n = 5$ ). ....	176
<i>Supplementary data 5: Distribution of MICs and proportion of resistant isolates of other enterococcal species from animal clinical samples (<math>n = 5</math>).</i>	
<b>Priloga 6:</b> Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> iz piščančjega mesa ( $n = 78$ ). ....	177
<i>Supplementary data 6: Distribution of MICs and proportion of resistant <i>E. faecalis</i> and <i>E. faecium</i> isolates from broiler meat (<math>n = 78</math>).</i>	
<b>Priloga 7:</b> Distribucija MIK in delež odpornih ostalih vrst enterokokov iz piščančjega mesa ( $n = 3$ ). ....	178
<i>Supplementary data 7: Distribution of MICs and proportion of resistant other enterococcal species from broiler meat (<math>n = 3</math>).</i>	
<b>Priloga 8:</b> Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> iz piščančjega fecesa ( $n = 76$ ). ....	179
<i>Supplementary data 8: Distribution of MICs and proportion of resistant <i>E. faecalis</i> and <i>E. faecium</i> isolates from broiler feces (<math>n = 76</math>).</i>	
<b>Priloga 9:</b> Distribucija MIK in delež odpornih ostalih vrst enterokokov iz piščančjega fecesa ( $n = 8$ ). ....	180
<i>Supplementary data 9: Distribution of MICs and proportion of resistant isolates of other enterococcal species from broiler feces (<math>n = 8</math>).</i>	
<b>Priloga 10:</b> Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> iz perutninske klavnice ( $n = 21$ ). ....	181
<i>Supplementary data 10: Distribution of MICs and proportion of resistant <i>E. faecalis</i> and <i>E. faecium</i> isolates from poultry slaughterhouse (<math>n = 21</math>).</i>	

<b>Priloga 11:</b> Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrste <i>E. avium</i> iz perutninske klavnice ( $n = 1$ ).....	182
<i>Supplementary data 11: Distribution of MICs and proportion of resistant E. avium from poultry slaughterhouse (n = 1).</i>	
<b>Priloga 12:</b> Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> iz svinjine ( $n = 78$ ).....	183
<i>Supplementary data 12: Distribution of MICs and proportion of resistant E. faecalis and E. faecium isolates from pork (n = 78).</i>	
<b>Priloga 13:</b> Distribucija MIK in delež odpornih ostalih vrst enterokokov iz svinjine ( $n = 7$ ). .....	184
<i>Supplementary data 13: Distribution of MICs and proportion of resistant isolates of other enterococcal species from pork (n = 7).</i>	
<b>Priloga 14:</b> Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> iz prašičjega fecesa ( $n = 57$ ). .....	185
<i>Supplementary data 14: Distribution of MICs and proportion of resistant E. faecalis and E. faecium isolates from pig feces (n = 57).</i>	
<b>Priloga 15:</b> Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrste <i>E. hirae</i> ter ostalih vrst enterokokov iz prašičjega fecesa ( $n = 37$ ). .....	186
<i>Supplementary data 15: Distribution of MICs and proportion of resistant E. hirae and other enterococcal species from pig feces (n = 37).</i>	
<b>Priloga 16:</b> Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> iz prašičje farme in klavnice ( $n = 15$ ). .....	187
<i>Supplementary data 16: Distribution of MICs and proportion of resistant E. faecalis and E. faecium isolates from pig farm and slaughterhouse (n = 15).</i>	
<b>Priloga 17:</b> Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrste <i>E. hirae</i> iz prašičje farme in klavnice ( $n = 12$ ). .....	188
<i>Supplementary data 17: Distribution of MICs and proportion of resistant E. hirae isolates from pig farm and slaughterhouse (n = 12).</i>	
<b>Priloga 18:</b> Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> iz govedine ( $n = 75$ ). .....	189
<i>Supplementary data 18: Distribution of MICs and proportion of resistant E. faecalis and E. faecium isolates from beef (n = 75).</i>	
<b>Priloga 19:</b> Distribucija MIK in delež odpornih ostalih vrst enterokokov iz govedine ( $n = 11$ ). .....	190
<i>Supplementary data 19: Distribution of MICs and proportion of resistant isolates of other enterococcal species from beef (n = 11).</i>	
<b>Priloga 20:</b> Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> iz mleka in mlečnih izdelkov ( $n = 65$ ). .....	191
<i>Supplementary data 20: Distribution of MICs and proportion of resistant E. faecalis and E. faecium isolates from milk and dairy products (n = 65).</i>	

**Priloga 21:** Distribucija MIK in delež odpornih ostalih vrst enterokokov iz mleka in mlečnih izdelkov ( $n = 21$ ). ..... 192

*Supplementary data 21: Distribution of MICs and proportion of resistant isolates of other enterococcal species from milk and dairy products ( $n = 21$ ).*

**Priloga 22:** Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz školjk klapavic ( $n = 64$ ). ..... 193

*Supplementary data 22: Distribution of MICs and proportion of resistant *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from mussels ( $n = 64$ ).*

**Priloga 23:** Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrste *E. hirae* ter ostalih vrst enterokokov iz školjk klapavic ( $n = 18$ ). ..... 194

*Supplementary data 23: Distribution of MICs and proportion of resistant *E. hirae* and other enterococcal species from mussels ( $n = 18$ ).*

## SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

AME	aminioglikozid-spreminjajoči encimi; angl. <i>aminoglycoside-modifying enzymes</i>
Ace	protein, ki veže kolagen; angl. <i>collagen binding protein</i>
ARE	enterokoki, odporni proti ampicilinu; angl. <i>ampicillin-resistant enterococci</i>
Asa1	agregacijska snov (substanca); angl. <i>aggregation substance</i>
ATCC	Ameriška zbirka tipskih kultur; angl. <i>American Type Culture Collection</i>
bp	bazni par
CIA	kritična protimikrobna zdravila; angl. <i>critically important antimicrobials</i>
CylA	citolizin – hemolizin; angl. <i>cytolysin</i>
DNA	deoksiribonukleinska kislina; angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
EARS-Net	Evropska mreža za spremljanje odpornosti nekaterih invazivnih bakterij; angl. <i>European Antimicrobial Resistance Surveillance Network</i>
ECDC	Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni; angl. <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
ECOFF	epidemiološka mejna vrednost; angl. <i>epidemiological cutoff value</i>
EfaA	<i>Enterococcus faecalis</i> antigen; angl. <i>endocarditis antigen</i>
<i>E. faecalis</i>	bakterija vrste <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	bakterija vrste <i>Enterococcus faecium</i>
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane; angl. <i>European Food Safety Authority</i>
Esp	enterokokini površinski protein; angl. <i>enterococcal surface protein</i>
EUCAST	Evropski odbor za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila; angl. <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
GeI	želatinaza; angl. <i>gelatinase</i>
HLAR	enterokoki, odporni proti visokim koncentracijam aminoglikozidov; angl. <i>high-level aminoglycoside resistant enterococci</i>
Hyl	hialuronidaza ; angl. <i>hyaluronidase</i>
IMP VF	Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete
KA	gojišče krvni agar
LAB	mlečnokislinske bakterije; angl. <i>lactic acid bacteria</i>
MALDI-TOF MS	masna spektrometrija, ionizacija v matriksu z lasersko desorpcijo – čas preleta ionov; angl. <i>matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija; angl. <i>minimum inhibitory concentration</i>
MRSA	proti meticilinu odporna bakterija <i>Staphylococcus aureus</i> ; angl. <i>methicillin resistant Staphylococcus aureus</i>
OD	optična gostota; angl. <i>optical density</i>
PCR	verižna reakcija s polimerazo; angl. <i>polymerase chain reaction</i>
SBA	gojišče Slanetz and Bartley agar
VOB	večkratno odporne bakterije; angl. <i>multidrug resistant (MDR) bacteria</i>

VRE	proti vankomicinu odporni enterokoki; angl. <i>vancomycin-resistant enterococci</i>
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija, angl. <i>World Health Organization</i>

## 1 UVOD

Rod *Enterococcus* obsega skupino številnih ubikvitarnih, po Gramu pozitivnih bakterij, ki sicer sodijo med normalne predstavnike črevesne mikrobiote (komezale) ljudi in živali, vendar pa lahko povzročajo različne bolezni in so pogosti povzročitelji ponavljajočih se, težko ozdravljivih okužb. Zbolijo predvsem pacienti s kroničnimi ali sistemskimi boleznimi ali z drugače oslabiljenim imunskim sistemom. Najpogostejši vir okužbe so pacienti sami, lahko pa tudi kontaminirano okolje ali kontaminirana hrana/krma. Trenutno poznamo več kot 60 vrst enterokokov, med katerimi so najpomembnejše in tudi največkrat izolirane bakterije iz vrst *Enterococcus faecalis* in *Enterococcus faecium*. Poleg teh so, še posebej v veterinarski medicini, pomembne tudi nekatere druge vrste: *Enterococcus avium*, *Enterococcus canis*, *Enterococcus canitestini*, *Enterococcus cecorum*, *Enterococcus gallinarum* in *Enterococcus hirae*. Enterokoki so najpogosteje povzročitelji okužb sečil in ran, enteritisa, bakterijskega endokarditisa, peritonitisa in sepse. Poleg tega se v veterini pri piščancih brojlerjih pogosto srečujemo tudi s specifičnimi obolenji (arthritis, nekroza glavice stegenice, perikarditis) in povečano smrtnostjo, ki jih povzročata vrsti *E. cecorum* in *E. hirae*.

V humani medicini so v zadnjih desetletjih enterokoki pomembni predvsem kot večkratno odporni povzročitelji okužb, povezanih z zdravstvom, še posebej proti vankomicinu odporni enterokoki (angl. *vancomycin-resistant enterococci*, *VRE*). V Sloveniji se že od leta 2006 redno spremljajo podatki o invazivnih izolatih *VRE E. faecium* iz hemokultur. Poleg tega se pojavljajo tudi okužbe z enterokoki, odpornimi proti visokim koncentracijam aminoglikozidov (HLAR) in enterokoki, odpornimi proti ampicilinu (ARE). Po svetu ugotavljajo t.i. klone z visokim tveganjem, kar nakazuje, da se nekateri sevi enterokokov obnašajo kot pravi patogeni. Številni virulenčni dejavniki, ki so jih odkrili v zadnjih letih, omogočajo enterokokom vezavo na gostiteljske celice, kolonizacijo sluznice črevesja ter širjenje v druge organe, kjer povzročajo resnejše okužbe. Najpogosteje opisani dejavniki virulence so hemolizin – citolizin (Cyl), proteaza želatinaza (GelE) in različni površinski adhezini, npr. enterokokni površinski protein (Esp), površinski glikoproteini (Asa1) in drugi. Enterokoki sicer ne tvorijo spor, vendar so med nesporogenimi bakterijami eni izmed najbolj odpornih proti ekstremnim pogojem okolja, sposobni pa so tudi tvoriti biofilm.

Poleg različnih dejavnikov patogenosti pri enterokokih težavo predstavlja tudi njihova naravna odpornost proti številnim skupinam protimikrobnih zdravil. Primarno so odporni proti cefalosporinom, aminoglikozidom v nižjih koncentracijah in klindamicinu, *in vivo* (klinično) pa izkazujejo odpornost tudi proti trimetoprim–sulfametoksazolu. Zanje je značilno, da imajo zmožnost pridobivanja sekundarne odpornosti proti vsem trenutno znanim antibiotikom, bodisi z mutacijami ali s sprejemanjem tujega genetskega materiala preko plazmidov in transpozonov. S številnimi raziskavami so ugotovili, da se po začetku uporabe novega antibiotika poveča odpornost tako patogenih kot tudi komenzalnih bakterij. Enterokoki tako predstavljajo rezervoar genov za odpornost, ki se lahko prenašajo na druge, bolj patogene bakterije. Raven odpornosti komenzalnih bakterij je dober pokazatelj, kako močan je selektivni pritisk na

bakterije z uporabo določenega antibiotika ter kakšno odpornost lahko pričakujemo pri patogenih bakterijah.

Iz literature je znano, da so ljudje lahko preko kontaminirane hrane živalskega izvora potencialno izpostavljeni odpornim komenzalnim bakterijam. Zato Evropska agencija za varno hrano (EFSA) zaradi varovanja zdravja ljudi še posebej poudarja pomen rednega spremljanja odpornosti indikatorskih mikroorganizmov, med katere se, poleg bakterije *Escherichia coli*, uvrščajo tudi enterokoki. Komisija za Codex Alimentarius je na 34. zasedanju v Ženevi poudarila, da je odpornost bakterij proti protimikrobnim zdravilom velik svetovni problem na področju javnega zdravja in varnosti živil ter sprejela smernice za analizo tveganja odpornosti pri bakterijah, ki se prenašajo z živili. Uporaba protimikrobnih zdravil pri rejnih živalih je lahko pomemben dejavnik tveganja za selekcijo in širjenje odpornih bakterij ali genov za odpornost z živali na ljudi preko prehranske verige.

## 1.1 NAMEN RAZISKAVE

Z raziskavo smo želeli pridobiti podatke o odpornosti ter virulenčnih dejavnikih pri enterokokih, izoliranih iz vzorcev ljubiteljskih in rejnih živali ter živil živalskega izvora na slovenskem tržišču ter jih primerjati z enterokoki, izoliranimi iz kliničnih vzorcev ljudi. Podatki o odpornih enterokokih pri živalih in v živilih so v Sloveniji namreč zelo skopi, prav tako ni podatkov, kateri virulenčni dejavniki se pojavljajo pri posameznih vrstah enterokokov, izoliranih iz različnih skupin vzorcev. Želeli smo raziskati tudi, katere vrste enterokokov se pojavljajo kot patogeni pri okužbah živali ter pri teh izolatih opredeliti njihovo odpornost proti protimikrobnim zdravilom in prisotnost genov za virulenčne dejavnike. Preverili smo tudi, ali obstajajo razlike v odpornosti in pojavnosti virulenčnih dejavnikov med izolati iz kliničnih vzorcev ter izolati iz vzorcev zdravih rejnih živali in živil živalskega izvora. S tem smo želeli dobiti vpogled v to, ali komenzalni enterokoki predstavljajo tveganje za širjenje odpornih bakterij oz. njihovih genov z živali na ljudi preko prehranske verige. Raziskovali smo še, v kolikšni meri se izolati VRE pojavljajo pri rejnih živalih in v živilih živalskega izvora. Nenazadnje smo pri izbranih izolatih enterokokov želeli preveriti še, če izolati z geni za tvorbo biofilma, to lastnost izkazujejo tudi fenotipsko.

## 1.2 HIPOTEZE

Postavili smo naslednje delovne hipoteze:

1. Prisotnost enterokokov bo visoka ne glede na izvor preiskovanih vzorcev, ugotovili pa bomo razlike v pogostosti pojavljanja posameznih enterokoknih vrst. Iz vzorcev bomo najpogosteje izolirali vrsti *E. faecalis* in *E. faecium*.
2. Izolirali bomo enterokoke s pridobljeno odpornostjo proti eni ali več skupinam protimikrobnih zdravil. Izolirali bomo seve z odpornostjo proti ampicilinu (ARE) in z odpornostjo proti visokim koncentracijam aminoglikozidov (HLAR), le izjemoma pa odporne proti vankomicinu (VRE).
3. Proti vankomicinu odporni enterokoki pri rejnih živalih bodo praviloma nosilci gena *vanA*, za razliko od človeških izolatov, pri katerih najdemo *vanA* in *vanB*.
4. Pri izolatih enterokokov iz kliničnih vzorcev bo raznolikost in število virulenčnih dejavnikov praviloma večje kot pri komenzalnih enterokokih.
5. Izolati enterokokov z geni, ki kodirajo tvorbo biofilma, bodo to lastnost izrazili tudi fenotipsko.



## 2 PREGLED LITERATURE

### 2.1 ENTEROKOKI

#### 2.1.1 Splošne značilnosti in klasifikacija rodu *Enterococcus*

Enterokoki so fakultativno anaerobni, po Gramu pozitivni ovalni koki, ki se urejajo v pare ali kratke verižice in ne proizvajajo katalaze. So ubikvitarne bakterije, ki jih lahko izoliramo iz zemlje, površinskih in morskih voda, rastlin in živil. Hkrati so tudi normalni predstavniki črevesne mikrobiote (komezali), ki lahko naseljujejo tudi kožo in sluznice ljudi in živali (Arias in sod., 2012; García-Solache in Rice, 2019; Germ in Seme, 2020; Lebreton in sod., 2014). Enterokoki sicer ne tvorijo spor, vendar so izredno dobro prilagodljivi na različne dejavnike okolja. Preživijo v matriksu s povišano koncentracijo soli, saj večina vrst lahko raste v 6,5 % raztopini NaCl. Prav tako rastejo v širokem temperaturnem razponu (10–45 °C); njihov optimum je okrog 37 °C, preživijo pa tudi 30 minut pri 60 °C in so izredno odporni proti izsušitvi. Dobro uspevajo tudi v širokem območju pH (4,8–9,6, optimum 7,5), rastejo v prisotnosti žolča ter hidrolizirajo eskulin. Poleg tega so sposobni tvoriti tudi biofilm. Vse te lastnosti prispevajo h kolonizaciji različnih gostiteljskih niš, k obstojnosti v okolju in uporabnosti enterokokov kot indikatorjev za fekalno kontaminacijo (Ch'ng in sod., 2019; Germ in Seme, 2020; Vu in Carvalho, 2011). Med vsemi enterokoki sta samo dve vrsti gibljivi: *E. gallinarum* in *Enterococcus casseliflavus* / *Enterococcus flavescens* (García-Solache in Rice, 2019).

Enterokoki imajo nizko razmerje baznih parov GC (34–45 %), njihov genom je velik 2,3–5,4 Mb in zapisuje 2154–5107 genov. Osrednji genom zapisuje 605–1037 genov, odvisno od nabora genomov in uporabljenih kriterijev za analizo. Pangenom enterokokov je velik in odraža plastičnost genoma kot tudi prilagoditev izolatov na specifične ekološke niše (García-Solache in Rice, 2019; Zhong in sod., 2017). Zhong in sodelavci (2017) so v primerjalni genomski analizi 37 enterokokov ugotovili pomembno vlogo habitata pri evoluciji enterokokov; genetske povezave so bile bližje med izolati iz podobnih habitatov. Predvidevali so tudi, da bi bili lahko ljudje in sesalci originalni gostitelji enterokokov, od tam pa naj bi se razširili na rastline, ptice, živila in v druga okolja.

Prvi, ki je skoval izraz „enterocoque” in opisal to bakterijo, je bil francoski učenjak Thiercelin leta 1899. S tem poimenovanjem je želel poudariti izvor na novo odkritih, po Gramu pozitivnih saprofitnih diplokokov iz črevesja, ki lahko povzročajo okužbe. Istega leta sta MacCallum in Hastings prvič poročala o primeru endokarditisa, povzročene s hemolitičnim enterokokom pri bolniku, vendar sta povzročitelja takrat poimenovala *Micrococcus zymogenes*. Ime *Streptococcus faecalis* sta prva uporabila Andrewes in Horder leta 1906, Orla-Jensen pa je leta 1919 prvič opisal *Streptococcus faecium* (Murray, 1990). Enterokoke so tako do leta 1984 uvrščali med fekalne streptokoke v serološko skupino D po Lancefieldovi, nato pa so jih na osnovi genomskih analiz, ki sta jih izvedla Schleifer in Kilpper-Bälz, uvrstili v samostojen rod *Enterococcus* (Schleifer in Kilpper-Bälz, 1984). Poimenovanje družine *Enterococcaceae*, v

katero so na osnovi podobnosti 16S rRNA uvrstili rodove *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus* in *Melissococcus*, je prvi predlagal Ludwig s sodelavci leta 2009 (Ludwig in sod., 2009). Rod *Enterococcus* uvrščamo v družino *Enterococcaceae*, red *Lactobacillales*, razred *Bacilli* in deblo *Firmicutes*

Trenutno poznamo 70 vrst enterokokov (**Tabela 1**), med katerimi jih je 60 uradno priznanih in opisanih skladno s pravili Mednarodnega kodeksa o nomenklaturi bakterij (International Code of Nomenclature of Bacteria) (LPSN, 2021). Najpomembnejši in tudi največkrat izolirani sta vrsti *E. faecalis* in *E. faecium*. Poleg njiju pa so klinično pomembne tudi nekatere druge vrste: *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *Enterococcus durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *Enterococcus mundtii* in *Enterococcus raffinosus* (EUCAST, 2020; García-Solache in Rice, 2019; Guzman-Prieto in sod., 2016; Torres in sod., 2018).

**Tabela 1:** Vrste enterokokov (povzeto po LPSN, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature).

**Table 1:** Enterococcal species (adopted from LPSN, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature).

Vrste enterokokov	Prvi opisal	Nomenklaturni status (taksonomski status)
<i>Enterococcus alcedinis</i>	Frolková in sod., 2013	uradno objavljeno
<i>Enterococcus aquimarinus</i>	Švec in sod., 2005	uradno objavljeno
<i>Enterococcus asini</i>	de Vaux in sod., 1998	uradno objavljeno
<i>Enterococcus avium</i>	(Nowlan in Deibel, 1967) Collins in sod., 1984	uradno objavljeno
<i>Enterococcus bulliens</i>	Kadri in sod., 2016	uradno objavljeno
<i>Enterococcus burkinafasonensis</i>	Gouba in sod., 2020	ni veljavno objavljeno*
<i>Enterococcus caccae</i>	Carvalho in sod., 2006	uradno objavljeno
<i>Enterococcus camelliae</i>	Sukontasing in sod., 2007	uradno objavljeno
<i>Enterococcus canintestini</i>	Naser in sod., 2005	uradno objavljeno
<i>Enterococcus canis</i>	De Graef in sod., 2003	uradno objavljeno
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	(Vaughan in sod., 1979) Collins in sod., 1984	uradno objavljeno
<i>Enterococcus cecorum</i>	(Devriese in sod., 1983) Williams in sod., 1989	uradno objavljeno
<i>Enterococcus columbae</i>	Devriese in sod., 1993	uradno objavljeno
<i>Enterococcus crotal</i>	McLaughlin in sod., 2017	uradno objavljeno
<i>Enterococcus devriesei</i>	Švec in sod., 2005	uradno objavljeno
<i>Enterococcus diestrammenae</i>	Kim in sod., 2013	uradno objavljeno
<i>Enterococcus dispa</i>	Collins in sod., 1991	uradno objavljeno
<i>Enterococcus dongliensis</i>	Li in Gu, 2019	uradno objavljeno
<i>Enterococcus durans</i>	(Sherman in Wing, 1937) Collins in sod., 1984	uradno objavljeno
<i>Enterococcus eurekensis</i>	Cotta in sod., 2013	uradno objavljeno
<i>Enterococcus faecalis</i>	(Andrewes in Horder, 1906) Schleifer in Kilpper-Bälz, 1984	uradno objavljeno
<i>Enterococcus faecium</i>	(Orla-Jensen, 1919) Schleifer in Kilpper-Bälz, 1984	uradno objavljeno
<i>Enterococcus flavescens</i>	Pompei in sod., 1992	uradno objavljeno (sin. za <i>casseliflavus</i> )
<i>Enterococcus florum</i>	Techo in sod., 2019	uradno objavljeno
<i>Enterococcus gallinarum</i>	(Bridge in Sneath, 1982) Collins in sod., 1984	uradno objavljeno
<i>Enterococcus gilvus</i>	Tyrrell in sod., 2002	uradno objavljeno

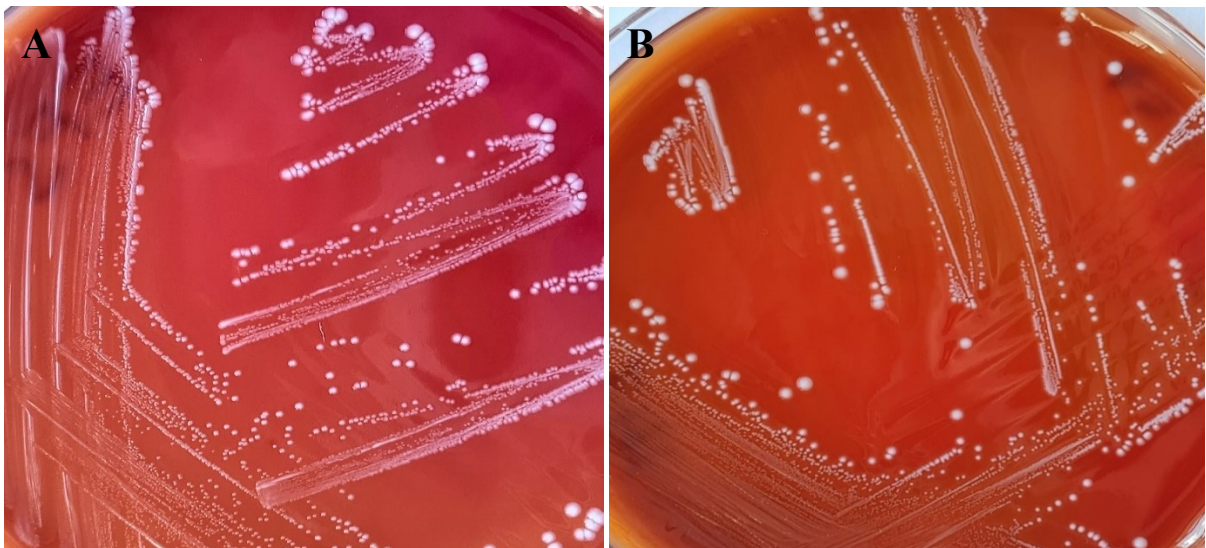
Tabela se nadaljuje na naslednji strani.

<i>Enterococcus haemoperoxidus</i>	Švec in sod., 2001	uradno objavljeno
<i>Enterococcus hermanniensis</i>	Koort in sod., 2004	uradno objavljeno
<i>Enterococcus hirae</i>	Farrow in Collins, 1985	uradno objavljeno
<i>Enterococcus hulanensis</i>	Li in Gu, 2019	uradno objavljeno
<i>Enterococcus italicus</i>	Fortina in sod., 2004	uradno objavljeno
<i>Enterococcus lactis</i>	Morandi in sod., 2012	uradno objavljeno
<i>Enterococcus lemanii</i>	Cotta in sod., 2013	uradno objavljeno
<i>Enterococcus malodoratus</i>	(Pette, 1955) Collins in sod., 1984	uradno objavljeno
<i>Enterococcus massiliensis</i>	Le Page in sod., 2016	ni veljavno objavljeno*
<i>Enterococcus mediterraneensis</i>	Takakura in sod., 2019	ni veljavno objavljeno*
<i>Enterococcus moraviensis</i>	Švec in sod., 2001	uradno objavljeno
<i>Enterococcus mundtii</i>	Collins in sod., 1986	uradno objavljeno
<i>Enterococcus nangangensis</i>	Li in Gu, 2019	uradno objavljeno
<i>Enterococcus olivae</i>	Lucena-Adrós in sod., 2014	uradno objavljeno
<i>Enterococcus pallens</i>	Tyrrell in sod., 2002	uradno objavljeno
<i>Enterococcus phoeniculicola</i>	Law-Brown in Meyers, 2003	uradno objavljeno
<i>Enterococcus pingfangensis</i>	Li in Gu, 2019	uradno objavljeno
<i>Enterococcus plantarum</i>	Švec in sod., 2012	uradno objavljeno
<i>Enterococcus porcinus</i>	Teixeira in sod., 2001	uradno objavljeno
		(sin. za <i>villorum</i> )
<i>Enterococcus pseudoavium</i>	Collins in sod., 1989	uradno objavljeno
<i>Enterococcus quebecensis</i>	Sistek in sod., 2012	uradno objavljeno
<i>Enterococcus raffinosus</i>	Collins in sod., 1989	uradno objavljeno
<i>Enterococcus ratti</i>	Teixeira in sod., 2001	uradno objavljeno
<i>Enterococcus rivorum</i>	Niemi in sod., 2012	uradno objavljeno
<i>Enterococcus rota</i>	Sedláček in sod., 2013	uradno objavljeno
<i>Enterococcus saccharolyticus</i>	(Farrow in sod., 1985) Rodrigues in Collins, 1991	uradno objavljeno
<i>Enterococcus saccharominimus</i>	Vancanneyt in sod., 2004	uradno objavljeno
		(sin. za <i>italicus</i> )
<i>Enterococcus saigonensis</i>	Harada in sod., 2016	uradno objavljeno
<i>Enterococcus sanguinicola</i>	Carvalho in sod., 2008	ni veljavno objavljeno*
<i>Enterococcus seriolicida</i>	Kusuda in sod., 1991	uradno objavljeno
		(sin. za <i>garvieae</i> )
<i>Enterococcus silesiacus</i>	Švec in sod., 2006	uradno objavljeno
<i>Enterococcus solitarius</i>	Collins in sod., 1989	uradno objavljeno
<i>Enterococcus songbeiensis</i>	Li in Gu, 2019	uradno objavljeno
<i>Enterococcus sulfureus</i>	Martinez-Murcia in Collins, 1991	uradno objavljeno
<i>Enterococcus termitis</i>	Švec in sod., 2006	uradno objavljeno
<i>Enterococcus thailandicus</i>	Tanasupawat in sod., 2008	uradno objavljeno
<i>Enterococcus timonensis</i>	Mbogning Fonkou in sod., 2019	ni veljavno objavljeno*
<i>Enterococcus ureasiticus</i>	Sistek in sod., 2012	uradno objavljeno
<i>Enterococcus ureilyticus</i>	Sedláček in sod., 2013	uradno objavljeno
<i>Enterococcus viikkiensis</i>	Rahkila in sod., 2011	uradno objavljeno
<i>Enterococcus villorum</i>	Vancanneyt in sod., 2001	uradno objavljeno
<i>Enterococcus wangshanyuanii</i>	Jin in sod., 2017	uradno objavljeno
<i>Enterococcus xiangfangensis</i>	Li in sod., 2014	uradno objavljeno

Legenda: \*To taksonomsko ime je bilo sicer objavljeno, vendar ne v skladu s pravili Mednarodnega kodeksa o nomenklaturi bakterij (International Code of Nomenclature of Bacteria; *ni veljavno objavljeno*); sin., sinonim

## 2.1.2 Mikrobiološka diagnostika

Večino vrst enterokokov iz različnih vzorcev lahko izoliramo z uporabo neselektivnih (krvni agar) ali selektivnih trdnih gojišč po predhodni inkubaciji pri temperaturi 37 °C v aerobni atmosferi. Izjema so nekatere vrste enterokokov, npr. vrsta *E. cecorum*, ki ne raste na selektivnih gojiščih, poleg tega pa za boljšo rast potrebuje CO<sub>2</sub> ali mikroaerofilno atmosfero (Golob in sod., 2015; Jung in sod., 2018). Pri kliničnih vzorcih za izolacijo enterokokov najpogosteje uporabljamo krvni agar, na katerem *E. faecalis* raste v obliki sivih gladkih kolonij, *E. faecium* pa kot drobne sive kolonije z ozkim obročom alfa hemolize (**Slika 1**). Za izolacijo enterokokov iz vzorcev živil in okolja pa najpogosteje uporabljamo selektivna gojišča, npr. Slanetz and Bartley agar. Selektivna gojišča za izolacijo enterokokov, glede na njihove presnovne sposobnosti, pogosto vsebujejo žolčne soli, natrijev azid, antibiotike in eskulinske oz. tetrazolijeve soli. Taka gojišča niso primerna za rast vseh vrst enterokokov, vendar pa klinično najpomembnejše vrste na njih dobro rastejo (García-Solache in Rice, 2019).



**Slika 1:** Kolonije bakterij vrste *E. faecalis* (A) in vrste *E. faecium* (B) na krvnem agarju. (foto: M. Golob)  
**Figure 1:** Clonies of *E. faecalis* (A) and *E. faecium* (B) isolates on blood agar.

Identifikacija enterokokov temelji na mikroskopski preiskavi, morfoloških značilnostih kolonij, barvanju po Gramu, odsotnosti encima katalaze, testu za pirolidonil arilamidazo (PYR) in različnih drugih biokemijskih testih. Vendar pa so za dokončno identifikacijo do vrste najprimernejše molekularne metode ali pa metoda masne spektrometrije MALDI-TOF MS (angl. *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*) (García-Solache in Rice, 2019; Germ in Seme, 2020; Golob in sod., 2018; Markey in sod., 2013b).

Identifikacija bakterij z metodo MALDI-TOF MS predstavlja nov pristop pri identifikaciji bakterij in kvasovk, ki temelji na primerjavi proteinskega spektra preiskovanega izolata s spektri referenčnih bakterij v bazah podatkov. Postopek identifikacije je hiter, poceni, zanesljiv in zelo uporaben tako v humanih kot v veterinarskih kliničnih laboratorijih (Bizzini in Greub,

2010; Singhal in sod., 2015), poleg tega pa je primeren za hitro identifikacijo enterokokov do vrste (Ledina in sod., 2018; Nowakiewicz in sod., 2015; Stępien-Pyśniak in sod., 2017).

Odpornost enterokokov iz kliničnih vzorcev živali in vzorcev živil ugotavljamo na osnovi mikrodilucijske metode določanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) ali z disk-difuzijsko metodo. Z molekularno metodo verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) pa dokazujemo prisotnost genov za odpornost proti protimikrobnim zdravilom ter genov za virulenčne dejavnike (Golob in sod., 2018).

Metoda PCR je ena izmed najbolj uporabljenih molekularnih diagnostičnih metod za pomnoževanje tarčnih odsekov nukleinskih kislin. Omogoča nam *in vitro* pomnoževanje tarčnih genov za namen diagnostike, tipizacije ali kvantifikacije izbranih organizmov. Za vsak test PCR so potrebni matrična DNA (v našem primeru izolirana bakterijska DNA iz čistih kultur enterokokov), vodilni in povratni začetni oligonukleotid (angl. *forward and reverse primer*, ki se prilegata na začetek in konec tarčnega odseka v genomu), mešanica vseh štirih deoksinukleotidov (dNTP: dATP, dGTP, dCTP, dTTP), termostabilna polimeraza DNA, pufer za delovanje polimeraze in magnezijevi ioni, reakcijo PCR pa do končnega volumna dopolnimo s sterilno destilirano vodo brez DNaz in RNaz. Metoda temelji na cikličnem pomnoževanju tarčnih odsekov DNA, pri čemer cikel sestavljajo tri faze: (i) denaturacija dvoverižne DNA pri 95 °C, (ii) prileganje para začetnih oligonukleotidov na tarčni odsek DNA (angl. *annealing*) in (iii) sinteza nove (komplementarne) verige DNA s termostabilno polimerazo pri 72 °C. Običajno se v PCR-pomnoževalnikih izvede 30–40 ciklov pomnoževanja, število pa se določi med vpeljavo metode.

Pomnožene odseke DNA analiziramo s klasično elektroforezo v agaroznem gelu ali s kapilarno elektroforezo. Elektroforeza temelji na ločevanju pomnoženih odsekov glede na njihovo velikost, njihov naboj pa omogoča potovanje v električnem polju elektroforetske kadičke ali kapilarah. Vizualizacija pomnoženih odsekov temelji na obarvanju DNA z etidijevim bromidom, ki se veže z dvojno vijačnico in sveti, če ga osvetlimo z UV. Intenziteta je sorazmerna s količino nastalega pomnožka PCR, velikost pa je odvisna od tarčnega odseka DNA in se podaja v baznih parih [bp]. Kapilarna elektroforeza v celoti nadomešča klasično agarozno elektroforezo, omogoča analizo večjega števila vzorcev v krajšem času in lažjo primerjavo velikosti pomnoženih fragmentov DNA vzorcev in PCR-kontrol, saj analiza poteka s pomočjo računalniškega sistema (digitalizirana slika gela, možnost za prekrivanje elektroferogramov različnih vzorcev) (Markey in sod., 2013a; QIAxcel User Manual, version 1.0, 2018).

## 2.2 PATOGENEZA – OKUŽBE PRI LJUDEH IN ŽIVALIH

Enterokoki so oportunistični mikroorganizmi, ki povzročajo različne okužbe ljudi in živali. Vendar pa v zadnjem času ugotavljajo t.i. klone z visokim tveganjem, kar nakazuje, da se nekateri sevi enterokokov obnašajo kot prave patogene bakterije (Arias in Murray, 2012; Guzman-Prieto in sod., 2016). Enterokoke uvrščamo tudi med najpogosteje izolirane povzročitelje okužb, povezanih z zdravstvom (García-Solache in Rice, 2019).

Najpomembnejša povzročitelja okužb pri ljudeh sta vrsti *E. faecalis* (90–95 %) in *E. faecium* (5–10 %). Druge vrste enterokokov redkeje povzročajo okužbe, večinoma pri bolnikih s kroničnimi ali sistemskimi boleznimi ter z oslabljenim imunskim sistemom. Enterokoki povzročajo okužbe sečil, bakteriemijo, endokarditis, okužbe kirurških ran, opeklin, žolčnih poti, peritonitis in ognjke v trebušni votlini ter okužbe katetrov in implantatov (Arias in Murray, 2012; Foulquié Moreno in sod., 2006; García-Solache in Rice, 2019; Germ in Seme, 2020; Hollenbeck in Rice, 2012).

Epidemiološki podatki, zbrani v zadnjih dveh desetletjih, kažejo na pojav širjenja posebnih, bolnišničnih klonov (angl. *health care-associated clones*), in sicer klonalni kompleks CC17 pri vrsti *E. faecium* ter klona CC2 in CC9 pri vrsti *E. faecalis*. Vzporedno s pojavom teh klonov so opazili tudi povečano odpornost enterokokov proti skupinam antibiotikov, ki jih običajno uporabljamo za zdravljenje (glikopeptidom in aminoglikozidom v visokih koncentracijah) (Arias in Murray, 2012; Lebreton in sod., 2013; Werner in sod., 2013).

Pri živalih enterokoki povzročajo podobno klinično sliko kot pri ljudeh: enteritis, okužbe sečil, bakteriemijo, endokarditis, mastitis, okužbe ran in sluhovoda. Med najpogosteje izolirane vrste enterokokov iz kliničnih vzorcev živali sodita prav tako vrsti *E. faecalis* in *E. faecium*; poleg njiju pa še vrste *E. durans*, *E. hirae*, *E. cecorum* in *E. villorum* (Aarestrup in sod., 2002; Stewart, 2013; Torres in sod., 2018).

Klinična slika okužb z enterokoki je pri posameznih vrstah živali precej podobna. Pri psih in mačkah enterokoki najpogosteje povzročajo vnetje zunanjšega sluhovoda, običajno v kombinaciji z drugimi bakterijskimi ali glivičnimi povzročitelji otitisa. Poleg tega jih pogosto izoliramo tudi pri vnetju spodnjih sečil (predvsem vrsto *E. faecalis*), okužbah ran in driski, tako pri mladih kot pri starejših živalih (Stewart, 2013). Pred leti smo prvič v Sloveniji opisali klinični primer sepse, povzročene z večkratno odporno bakterijo *E. faecalis* (HLAR) pri psu, ki se je končala s poginom (Golob in sod., 2011). Pri konjih se enterokokne okužbe največkrat izrazijo z driskami pri žrebetih ali z abscesi oz. okužbami ran. Pri govedu je situacija podobna, klinična slika je najpogosteje opazna pri teletih kot driska, poleg tega pa so enterokoki tudi povzročitelji mastitisa pri kravah. Pri prašičih se, podobno kot pri ostalih rejnih živalih, okužbe z enterokoki klinično kažejo predvsem pri pujskih kot driske ali kot okužbe ran (posledica kontaminacije iz okolja) (Stewart, 2013). Pri perutnini sta, poleg vrst *E. faecalis* in *E. faecium*, klinično pomembni tudi vrsti *E. hirae* in *E. cecorum* (Jung in sod., 2018; Stewart, 2013).

Slednja se je, kot pravi patogen, začela pojavljati pri perutnini v zadnjih petnajstih letih; pri piščancih brojlerih povzroča artritis, osteomielitis in povečan pogin. Pogin piščancev brojlerjev je v zgodnji fazi rasti posledica sepse, medtem ko je v pozni fazi rasti navadno posledica stradanja in dehidracije, saj živali zaradi paralize okončin (zloma stegnene glave) ne morejo priti do hrane in vode. Zaradi večjega pogina, slabe konverzije krme in nujnega zdravljenja z antibiotiki prihaja v rejah piščancev do velikih ekonomskih zgub (deHerdt in sod., 2008; Jung in sod., 2018). Okužbe z bakterijami vrste *E. cecorum* (endokarditis, bakteriemija, peritonitis, okužbe sečil) so opisane tudi pri ljudeh, večinoma pri bolnikih z motnjami v delovanju imunskega sistema zaradi prejetja imunopresivnih zdravil, debelosti, podhranjenosti, dekompenzirane jetrne ciroze, transplantacije ledvic in daljše terapije s steroidnimi zdravili (Delaunay in sod., 2015; Grmek Košnik in sod., 2015; Pang in sod., 2016).

### 2.2.1 Vir okužbe

Najpogostejši vir okužbe so pacienti sami, večino okužb namreč povzročijo enterokoki črevesne mikrobiote, če preidejo v sečila ali če ob invazivnih posegih vdrejo v primarno sterilne predele (Germ in Seme, 2020; Selleck in sod., 2019). Enterokoki po naravni poti v manjšem deležu kolonizirajo prebavila, saj predstavljajo približno 1 % celotne črevesne mikrobiote (Lebreton, 2014). Pomemben korak k nastanku okužb z enterokoki je povečan delež enterokokov v črevesju na račun drugih bakterij, predvsem zaradi izpostavljanja številnim antibiotikom. Do okužbe pride zaradi motenj v ravnovesju črevesne mikrobiote, zaradi česar se enterokoki v črevesju močno namnožijo, prehajajo črevesno bariero ter posledično vstopajo v krvni obtok. Možen vir okužbe je tudi z enterokoki kontaminirano okolje, še posebej znotraj bolnišničnega okolja. Zdravstveno osebje ob nezadovoljivi higieni rok prenaša enterokoke (tudi odporne) preko kontakta na druge bolnike, prenos z medicinskimi pripomočki je redkejši (Arias in Murray, 2012; Germ in Seme, 2020; Selleck in sod., 2019). Prav tako so enterokoki stalno prisotni v farmskem okolju in predstavljajo rezervoar za okužbe (Novais in sod., 2013). Vir okužbe ljudi in živali pa je lahko tudi z enterokoki kontaminirana hrana in krma (Foulquié Moreno in sod., 2006; Vu in Carvalho, 2011).

### 2.2.2 Virulenčni dejavniki

Enterokoki ne sodijo med zelo virulentne bakterije, prav tako ne proizvajajo vnetnih toksinov kot npr. druge po Gramu pozitivne bakterije (stafilokoki, streptokoki). Patogeneza okužb, ki jih povzročajo enterokoki, še ni v celoti pojasnjena, vendar pa je njihov patogeni potencial povezan predvsem s sposobnostjo kolonizacije prebavil, izogibanja imunskemu sistemu, pritrditvijo na gostiteljske celice ali beljakovine zunajceličnega matriksa in druge snovi (tudi inertne materiale medicinskih pripomočkov, npr. katetre) ter tvorbo biofilma (Arias in Murray, 2012; García-Solache in Rice, 2019; Germ in Seme, 2020; Selleck in sod., 2019; Vu in Carvalho, 2011). Več virulenčnih dejavnikov najdemo pri vrsti *E. faecalis*, kar pojasnjuje njihovo vodilno vlogo pri enterokoknih okužbah (García-Solache in Rice, 2019).

Pri nastanku okužb, ki jih povzročajo enterokoki, sodelujejo različni virulenčni dejavniki, med katerimi so v prvi fazi okužbe najpomembnejši površinski adhezini (angl. *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*, MSCRAMMs), kamor uvrščamo enterokokni površinski protein, agregacijsko snov ter protein, ki veže kolagene. Površinski adhezini omogočajo vezavo na gostiteljske celice pri vrstah *E. faecalis* in *E. faecium*. Pomembno vlogo imajo tudi sekrecijski faktorji (toksin citolizin in želatinaza) in drugi dejavniki, med njimi megaplazmid, ki je pogost pri kliničnih izolatih vrste *E. faecium* in se prenaša na komenzalne seve, pri katerih poveča virulenco. Nekateri sevi enterokokov lahko tvorijo tudi polisaharidno kapsulo, ki jih ščiti pred fagocitozo, s čimer se povečuje njihova invazivnost, hkrati pa ima pomembno vlogo tudi pri nastanku biofilma in pritrjevanju bakterije na različne površine (Arias in Murray, 2012; Germ in Seme, 2020; Gilmore in sod., 2002; Selleck in sod., 2019).

Pri enterokokih so opisali različne gene za virulenčne dejavnike, ki naj bi imeli pomembno vlogo pri okužbah ljudi (Anderson in sod., 2016). Veliko teh genov najdemo tudi pri enterokokih, izoliranih iz živali in živil živalskega izvora (Eaton in Gasson, 2001; Franz in sod., 2003). Geni, ki kodirajo virulenčne dejavnike, so v številnih primerih locirani na mobilnih genetskih elementih (konjugativnih plazmidih in transpozonih) ali na kromosomalnih otokih patogenosti in so lahko prenosljivi med bakterijami znotraj istega rodu ali celo med rodovi (Palmer in sod., 2010; Vu in Carvalho, 2011). Med pomembnejše gene za virulenčne determinante uvrščamo: *ace*, gen, ki kodira protein za vezavo kolegena; *asal*, gen na plazmidu, ki kodira agregacijsko snov; *cylA*, gen na plazmidu ali kromosomu (na otokih patogenosti), ki kodira citolizin; *efaA*, gen, ki kodira antigen *Enterococcus faecalis*; *esp*, gen, ki kodira enterokokni površinski protein; *gelE*, gen, ki kodira želatinazo in *hyl*, gen, ki kodira hialuronidazo (Barbosa in sod., 2010; Foulquié Moreno in sod., 2006; Vankerckhoven in sod., 2004).

#### 2.2.2.1 Ace, protein, ki veže kolagene (angl. *collagen binding protein*)

Adhezin, površinski protein, ki posreduje vezavo na kolagene, laminin in dentin, ima pomembno vlogo pri nastanku matriksa ter ima vpliv na razvoj endokarditisa (kolonizacija srčnih zaklopk) ter vnetje sečil pri obeh vrstah, *E. faecalis* (Ace) in *E. faecium* (Acm) (Arias in Murray, 2012; García-Solache in Rice, 2019; Gilmore in sod., 2002; Soares in sod., 2014).

#### 2.2.2.2 Asa1, agregacijska snov (angl. *aggregation substance*)

Adhezin, površinski protein, induciran s feromoni, ki omogoča prenos mobilnih genetskih elementov (plazmidov). Igra pomembno vlogo v prvi fazi nastanka biofilma pri pritrjevanju enterokokov na gostiteljske celice, omogoča medsebojno zlepljanje (tvorbo agregatov), poveča adhezijo bakterij na ledvične tubularne celice ter srčne endokardialne celice. Prisoten je pri obeh vrstah, *E. faecalis* in *E. faecium* (Selleck in sod., 2019; Soares in sod., 2014; Vankerckhoven in sod., 2004).



#### 2.2.2.3 CylA, citolizin – hemolizin (angl. *cytolysin*)

Citolizin je toksin, ki poškoduje gostiteljske celice; ima izraženo hemolitično aktivnost proti humanim, konjskim in zajčjim eritrocitom. Lizira rdeče krvne celice, retinalne celice, polimorfonuklearne nevtrofilce in makrofage. Poleg tega ima sposobnost poškodovanja tudi drugih po Gramu pozitivnih bakterij. Je sekrecijski faktor, ki ga proizvajajo približno 30 % bakterij vrste *E. faecalis* (Arias in Murray, 2012; García-Solache in Rice, 2019; Gilmore in sod., 2002; Selleck in sod., 2019).

#### 2.2.2.4 EfaA, *Enterococcus faecalis* antigen (angl. *endocarditis antigen*)

Površinski adhezin, ki ima pomembno vlogo pri adheziji bakterije *E. faecalis* na srčne celice pri endokarditisu (Lowe in sod., 1995).

#### 2.2.2.5 Esp, enterokokini površinski protein (angl. *enterococcal surface protein*)

Površinski protein pri vrstah *E. faecalis* in *E. faecium*, ki sodeluje pri vezavi na gostiteljske celice, še posebej pri okužbah sečil in endokarditisu ter ima pomembno vlogo pri nastanku biofilma (Arias in Murray, 2012; García-Solache in Rice, 2019; Gilmore in sod., 2002; Selleck in sod., 2019).

#### 2.2.2.6 GelE, želatinaza (angl. *gelatinase*)

Sekrecijski faktor (ekstracelularna metaloproteaza), ki hidrolizira želatino, kolagen, kazein, hemoglobin in druge beljakovine. Želatinaza poškoduje tkiva gostitelja in olajša širjenje bakterij. Ima vlogo pri različnih vnetjih (endokarditis, peritonitis, endoftalmitis), vpliva na translokacijo skozi črevesne epitelne celice in poveča oprijem na zobne korenine, poleg tega pa aktivira avtolizin in tvorbo biofilma. Prisotna je pri vrsti *E. faecalis* (Arias in Murray, 2012; Eaton in Gasson, 2001; García-Solache in Rice, 2019; Gilmore, 2002).

#### 2.2.2.7 Hyl, hialuronidaza (angl. *hyaluronidase*)

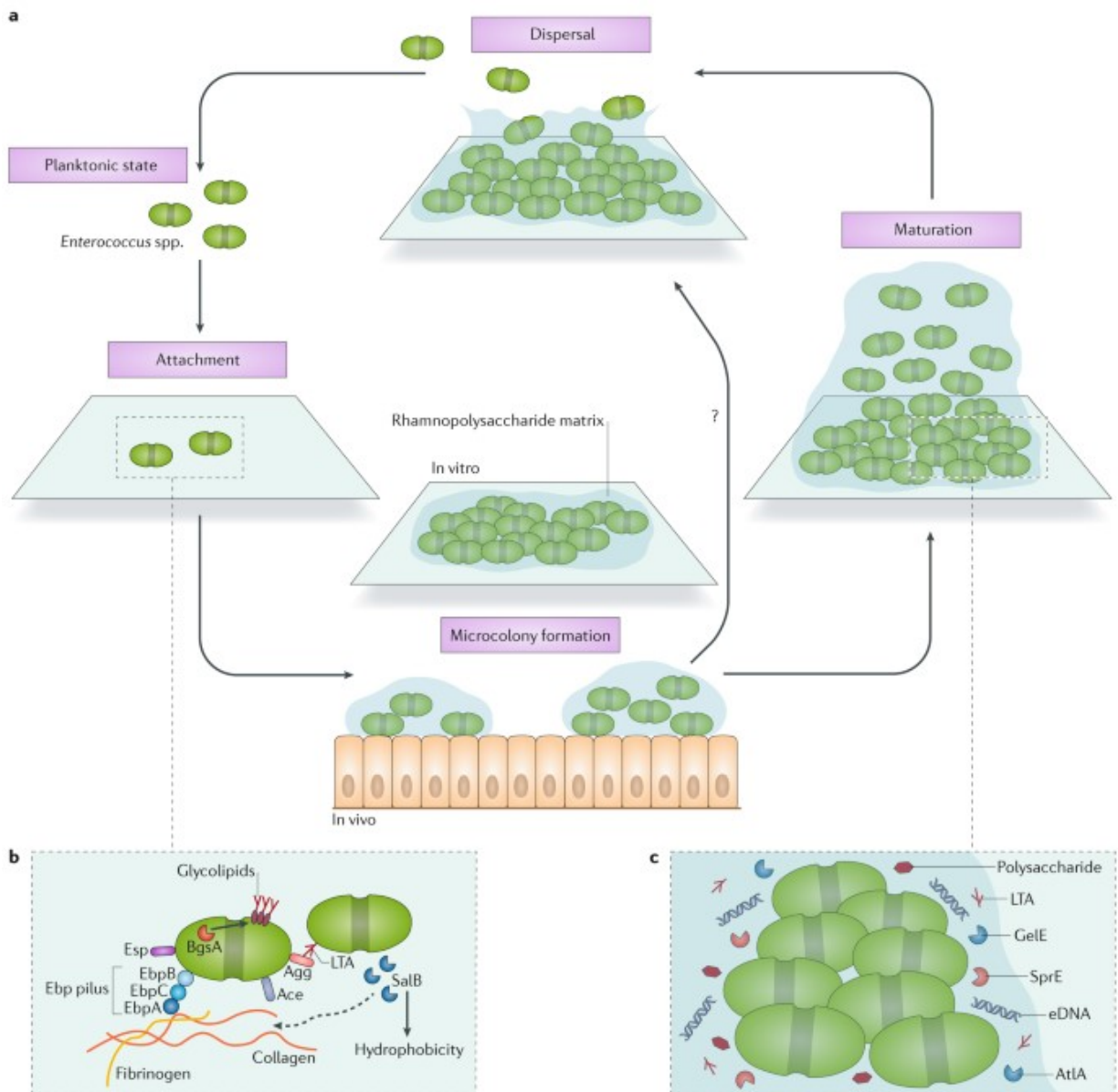
Hidrolizira hialuronsko kislino v tkivu, s čimer omogoča prodiranje v tkiva. Ima podobno vlogo kot hialuronidaza pri bakterijah *Staphylococcus aureus* in streptokokih (Anderson in sod., 2016; Rice in sod., 2003; Vankerckhoven in sod., 2004).

### 2.2.3 Tvorba biofilma

Pomembna lastnost enterokokov je sposobnost tvorbe biofilma, ki je pomemben vir kontaminacije površin v živilski industriji, poleg tega pa prispeva k večji virulenci pri okužbah, še posebej pri okužbah sečil in ran ter endokarditisu. Zdravljenje takih okužb je precej težavno, saj antibiotiki težje prodirajo skozi matriks biofilma. Poleg tega biofilmi predstavljajo stalno

možnost ponovne okužbe in rezervoar genov za odpornost proti antibiotikom, saj obstaja večja možnost horizontalnega prenosa genov med bakterijami (Ch'ng in sod., 2019).

Nastanek biofilma je odvisen od različnih dejavnikov in površine, kamor se biofilm pripenja. Nastanek biofilma, vključno z dejavniki, ki pripomorejo k nastanku biofilma, je prikazan na **Sliki 2** (Ch'ng in sod., 2019) in poteka v štirih fazah: (i) pritrjevanje enterokokov na podlago oz. gostiteljsko celico, (ii) oblikovanje mikrokolonij, (iii) bujna rast mikrobnih celic in razvoj zrelega biofilma ter (iv) delni razkroj biofilma in sprostitvev mikrobnih celic, ki nato naseljujejo nove površine za ponovni razvoj biofilma.



Opis slike je na naslednji strani.

**Slika 2:** Stopnje razvoja biofilma pri enterokokih (Ch'ng in sod., 2019). **a, b;** Prva stopnja tvorbe biofilma pri vrsti *E. faecalis* se začne s pritrditvijo enterokoknih celic na površino. V procesu pritrjevanja sodelujejo površinski adhezini, vključno s pili za biofilm (EbP), agregacijsko snovjo (Agg), enterokoknim površinskim proteinom (Esp), proteini, ki vežejo kolagen (Ace), proteazami in glikolipidi. Po pritrditvi se oblikujejo mikrokolonije, ki začnejo proizvajati polisaharidni matriks. Sledi razvoj zrelega biofilma z debelejším in kompleksnejšim matriksom. **c;** Faza zrelega biofilma, ki ji sledi delni razkroj in disperzija posameznih celic.

**Figure 2:** Stages of biofilm development in enterococci (Ch'ng et al, 2019). **a, b;** Enterococcus faecalis biofilm formation begins with planktonic cells that attach to a surface in a process involving adhesins, including the endocarditis and biofilm-associated pilus (Ebp), aggregation substance (Agg), enterococcal surface protein (Esp), adhesin to collagen from *E. faecalis* (Ace), proteases and glycolipids. Following attachment, microcolonies form, and rhamnopolysaccharide is produced. Some microcolonies may be readily dispersed, but others may further develop into a mature biofilm with a thicker and more complex matrix. **c;** Phase of the mature enterococcal biofilm; progression from mature biofilms to the dispersal stage.

V tvorbo biofilma pri vrstah *E. faecalis* in *E. faecium* so vključeni različni dejavniki; v prvi fazi pritrditve so poleg proteaz in glikolipidov zelo pomembni površinski adhezini (agregacijska snov (Asa1), enterokokni površinski antigen (Esp) in protein, ki veže kolagen (Ace). V primeru njihove odsotnosti se oprijem enterokokov na gojene človeške celice zmanjša in tvorba biofilma je oslABLJENA (Ch'ng in sod., 2019; Heikens in sod., 2011; Rozdzinski in sod., 2001; Toledo-Arana in sod., 2001). Medtem ko je vrsta *E. faecium* primarno bolj odporna proti antibiotikom, izolati vrste *E. faecalis* tvorijo debelejšje biofilme, ki jim omogočajo toleranco na antibiotike (Soares in sod., 2014). Po dostopnih podatkih raziskav o filmotvornosti drugih enterokoknih vrst še ni (Ch'ng in sod., 2019).

#### 2.2.4 Zdravljenje enterokoknih okužb

Če izolati enterokokov ne izkazujejo odpornosti proti visokim koncentracijam aminoglikozidov in so hkrati občutljivi za zaviralce sinteze celične stene (peniciline in glikopeptide), lahko zaradi njihovega sinergističnega in baktericidnega delovanja za zdravljenje uporabimo kombinacijo teh antibiotikov (EUCAST, 2020b).

Za zdravljenje okužb z bakterijami vrste *E. faecalis* uporabljamo ampicilin, vankomicin ter kombinacije aminoglikozidov (najpogosteje gentamicin) in antibiotika, ki deluje na celično steno (ampicilin ali vankomicin). Izbor antibiotikov je pri zdravljenju okužb z bakterijami vrste *E. faecium* navadno bolj omejen, saj pri tej vrsti pogosto ugotovimo odpornost proti betalaktamskim antibiotikom (Germ in Seme, 2020). Pri izolatih, ki so odporni proti antibiotikom prve izbire, lahko za zdravljenje okužb pri ljudeh uporabimo tudi novejšje antibiotike: kvinupristin/dalfopristin, linezolid in daptomicin (García-Solache in Rice, 2019; Hammerum in sod., 2010). Ti antibiotiki, vključno z vankomicinom, so uvrščeni v skupino kritičnih antibiotikov (angl. *critically important antimicrobials*, CIA), namenjenih samo za zdravljenje hujših okužb pri ljudeh in ne za zdravljenje živali (WHO, 2017a).

## 2.3 ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM

Odpornost bakterij proti antibiotikom delimo na naravno (intrinzično) in pridobljeno (sekundarno). O naravni odpornosti govorimo, kadar so bakterije naravno odporne proti nekaterim antibiotikom, ker nimajo tarčnih mest, na katera lahko antibiotiki delujejo ali kadar je antibiotikom zaradi značilne sestave celične stene bakterije preprečen dostop do tarčnega mesta njihovega delovanja. Naravno odpornost najdemo pri večini predstavnikov določene vrste ali rodu, geni za odpornost se nahajajo na kromosomu in se načeloma ne prenašajo na druge bakterijske vrste. Nasprotno pa pridobljeno odpornost najdemo le pri posameznih izolatih bakterije znotraj določene vrste ali rodu. Pridobljena odpornost bakterij je sposobnost organizma, da postane odporen proti antibiotiku, na katerega je sicer naravno občutljiv. Lahko je posledica mutacije kromosomskega ali plazmidnega gena posamezne bakterijske celice za tarčo antibiotika ali pridobljene nove genetske informacije z genskim prenosom iz druge bakterijske celice. Geni za odpornost se z odpornih sevov prenesejo na občutljive z mobilnimi genetskimi elementi (npr. plazmidi, transpozoni, integri), predvsem s transformacijo, konjugacijo ali transdukcijo. Pridobljena odpornost proti antibiotikom temelji na štirih glavnih mehanizmih: spremembi tarčnega mesta oz. prijemališča antibiotika ali spremembi presnovne poti, na katero deluje antibiotik, zmanjšani prepustnosti celične membrane za antibiotik, encimski razgradnji ali modifikaciji antibiotika ter aktivnem izčrpavanju antibiotika iz celice. Sposobnost mobilnih genetskih elementov, da zberejo različne gene, ki kodirajo odpornost proti različnim skupinam antibiotikov, pa povzroči nastanek večkratno odpornih sevov (Müller Premru in Pirš, 2020; Seme, 2002).

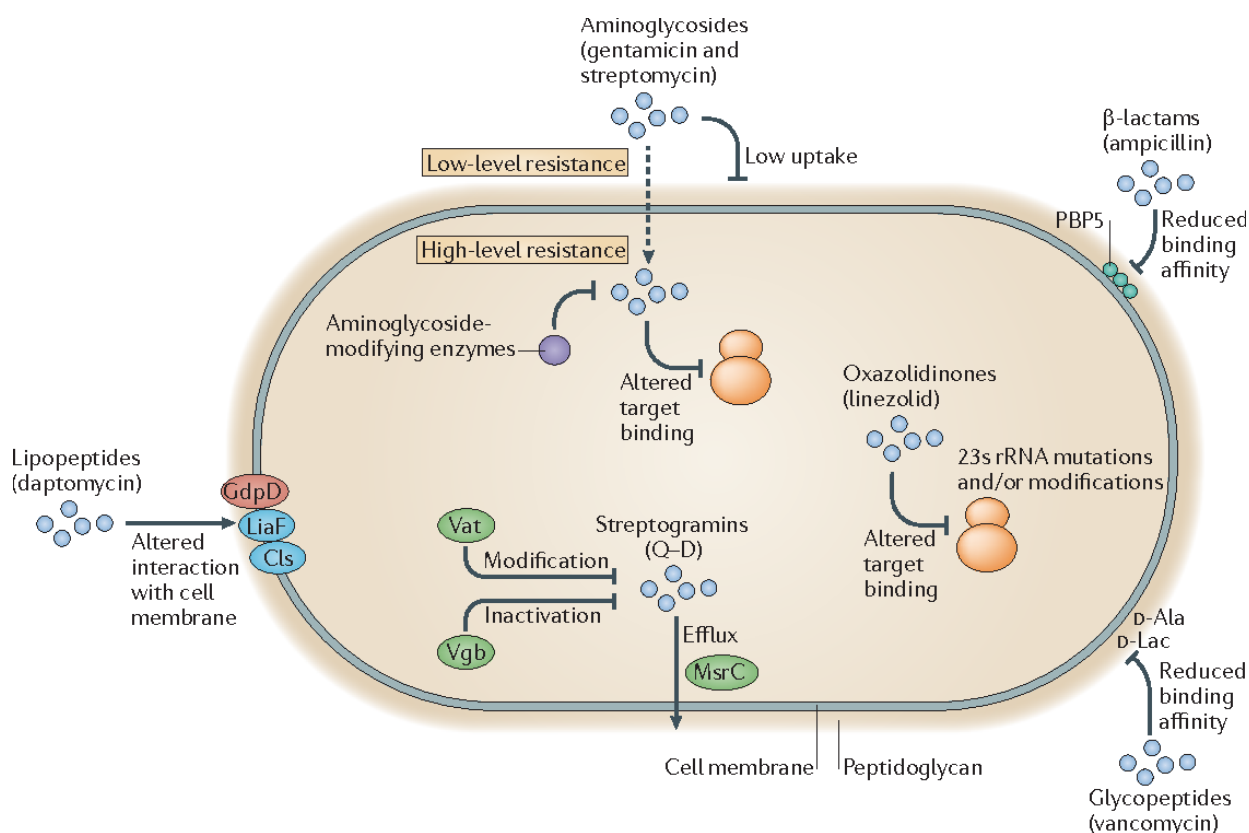
Večkratno odporne bakterije (VOB, angl. *multidrug-resistant bacteria*, MDR) so bakterije, ki so odporne proti vsaj enemu antibiotiku iz treh ali več različnih skupin protimikrobnih zdravil. Kot ekstremno odporne bakterije (angl. *extensively drug-resistant*, XDR) opredelimo tiste, ki so občutljive samo še za eno ali dve skupini testiranih protimikrobnih zdravil, panrezistentne (angl. *pandrug-resistant*, PDR) pa so bakterije, ki so odporne proti vsem testiranim protimikrobnim zdravilom v vseh skupinah protimikrobnih zdravil (Magiorakos in sod., 2012).

### 2.3.1 Odpornost enterokokov

Enterokoki so naravno odporni proti številnim skupinam protimikrobnih zdravil (Arias in Murray, 2012; Hollenbeck in Rice, 2012). Primarno so odporni proti cefalosporinom, nizkim koncentracijam aminoglikozidov, klindamicinu, sulfonamidom in trimetoprim-sulfametoksazolu (Arias in Murray, 2012; EUCAST, 2020a; EUCAST, 2020b; García-Solache in Rice, 2019; Hollenbeck in Rice, 2012). Izolati vrste *E. faecalis* so primarno odporni tudi proti kvinupristinu/dalfopristinu, vrst *E. gallinarum* in *E. casseliflavus* pa proti vankomicinu (EUCAST, 2020b).

Poleg tega je zanje značilno tudi, da imajo zmožnost hitrega pridobivanja sekundarne odpornosti (**Slika 3**) proti vsem trenutno obstoječim antibiotikom, vključno z rezervnimi

antibiotiki kot so daptomicin, kvinupristin/dalfopristin in linezolid. Enterokoki razpolagajo s širokim spektrom mehanizmov za pridobljeno odpornost, bodisi z mutacijami ali s horizontalnim prenosom genetskega materiala preko plazmidov in transpozonov (Ahmed in Baptiste, 2017; Arias in Murray, 2012; Cetinkaya in sod., 2000; Furuya in Lowy, 2006; Kak in Chow, 2002; Miller in sod., 2014; Werner in sod., 2013). Sposobnost mobilnih genetskih elementov, da zberejo različne gene, ki kodirajo odpornost proti različnim skupinam antibiotikov, pa povzroči nastanek večkratno odpornih sevov. Nekateri izolati pridobijo odpornost tudi proti trem ali celo več različnim skupinam antibiotikov in jih zato uvrščamo v skupino večkratno odpornih enterokokov (Hollenbeck in Rice, 2012; Klare in sod., 2003; Magiorakos in sod., 2012).



**Slika 3:** Mehanizmi sekundarne odpornosti pri enterokokih (Arias in Murray, 2012).

**Figure 3:** Mechanisms of enterococcal antimicrobial resistance (Arias and Murray, 2012).

Večkratno odporni izolati, še posebej če so hkrati odporni tudi proti vankomicinu, otežujejo zdravljenje, poleg tega pa imajo pomembno vlogo pri možnosti prenosa genov za odpornost znotraj rodu ali celo med različnimi rodovi (Hollenbeck in Rice, 2012; Klare in sod., 2003; Miller in sod., 2014; Tenover in McDonald, 2005; Giraffa, 2002).

Antibiotiki, ki smo jih testirali v tej nalogi, so glede na njihov mehanizem delovanja prikazani v **Tabeli 2**.

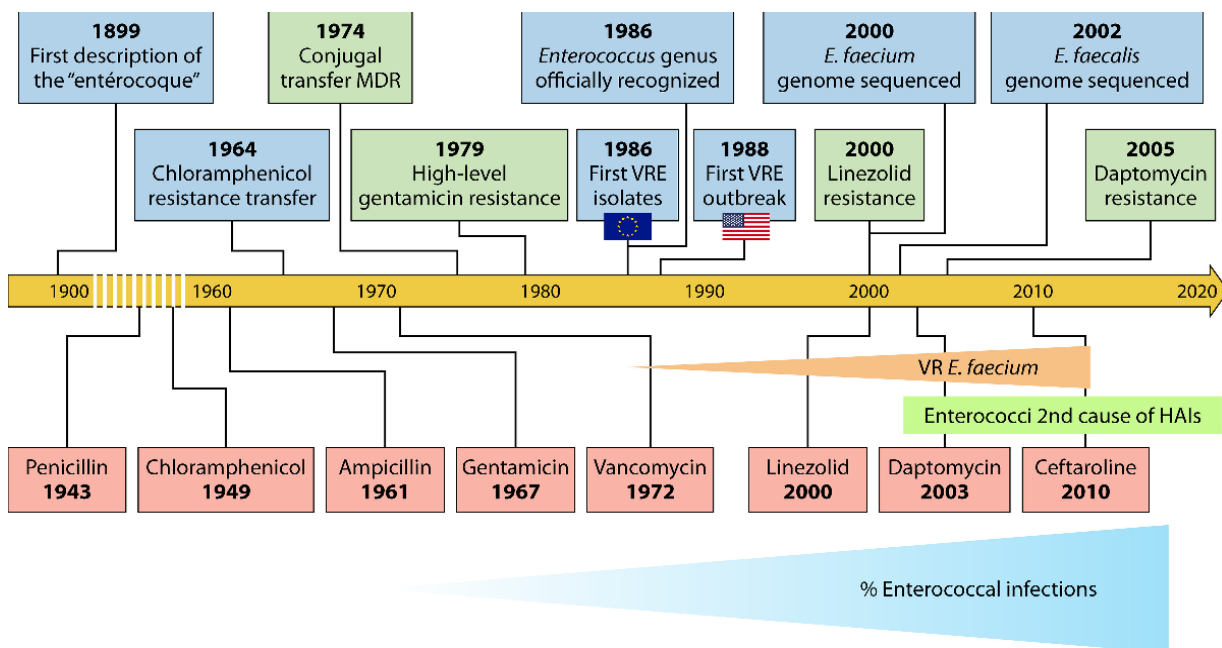
**Tabela 2:** Skupine testiranih antibiotikov in njihov mehanizem delovanja.

**Table 2:** Antimicrobial groups tested and their resistance mechanism.

Skupine protimikrobnih zdravil	Antibiotik	Mehanizem delovanja v bakterijski celici
aminoglikozidi	gentamicin	zaviralci sinteze celičnih beljakovin
betalaktamski antibiotiki	ampicilin	zaviralci sinteze celične stene
fenikoli	kloramfenikol	zaviralci sinteze celičnih beljakovin
fluorokinoloni	ciprofloksacin	zaviralci sinteze nukleinskih kislin
glikopeptidi	teikoplanin vankomicin	zaviralci sinteze celične stene
lipopeptidi	daptomicin	zaviralci delovanja celične membrane
makrolidi	eritromicin	zaviralci sinteze celičnih beljakovin
oksazolidinoni	linezolid	zaviralci sinteze celičnih beljakovin
streptogramini	kvinupristin- dalfopristin	zaviralci sinteze celičnih beljakovin
tetraciklini	tetraciklin tigeciklin	zaviralci sinteze celičnih beljakovin

Enterokoki so primarno dobro občutljivi za tetracikline in eritromicin, vendar pri teh skupinah antibiotikov pogosto ugotovljamo pridobljeno odpornost (razen za tigeciklin). Prav tako so primarno dobro občutljivi tudi za nekatera novejša zdravila (linezolid, tedizolid, daptomicin, televancin, oritavancin), vrsta *E. faecium* tudi za kombinacijo kvinupristin/dalfopristin (García-Solache in Rice, 2019). Proti enterokokom delujejo tudi fluorokinoloni, vendar je pri vrsti *E. faecium* pogosto ugotovljena pridobljena odpornost proti ciprofloksacinu (de Lastours in sod., 2017).

Na **Sliki 4** (García-Solache in Rice, 2019) je predstavljena časovnica pomembnejših dogodkov v zgodovini, povezanih z enterokoki kot patogenimi bakterijami. Časovni trak se začne s prvim opisom enterokokov leta 1899, nadaljuje se s prvim opisom prenosa odpornosti proti kloramfenikole leta 1964, le 15 let po začetku njegove uporabe za zdravljenje. Podobno se je zgodilo tudi pri aminoglikozidih in glikopeptidih. Pojavu proti vankomicinu odpornih izolatov vrste *E. faecium* v poznih 80-ih letih prejšnjega stoletja je sledil še pojav odpornosti proti novjšim antibiotikom, linezolidu in daptomicinu, kmalu po začetku uporabe. Medtem ko prevalenca bakterij VRE vrste *E. faecium* v povezavi z okužbami v zdravstvu narašča, večina enterokokov še vedno ostaja dobro občutljiva za novejša antibiotike.



**Slika 4:** Enterokoki skozi čas: pomembnejši dogodki glede okužb pri ljudeh (modro obarvani kvadratki), odpornosti proti antibiotikom (zeleni kvadratki) in čas uvedbe novega antibiotika za zdravljenje (rdeči kvadratki) (García-Solache in Rice, 2019).

**Figure 4:** Timeline of relevant events in the history of enterococci as human pathogens (blue rectangles), appearance of antibiotic resistance (green rectangles) and antibiotic debut (red rectangles) (García-Solache in Rice, 2019).

### 2.3.1.1 Odpornost proti betalaktamskim antibiotikom

Enterokoki so že naravno odporni proti določenim skupinam znotraj betalaktamskih antibiotikov (cefalosporinom), medtem ko so praviloma občutljivi za peniciline (ampicilin, piperacilin) in karpabeneme (García-Solache in Rice, 2019; Kak in Chow, 2002). Betalaktamski antibiotiki delujejo baktericidno, tako da zavirajo sintezo celične stene bakterije (peptidoglikana). Vstopajo skozi bakterijsko steno in se vežejo na proteine PBP (penicilin vezoči proteini, angl. *penicillin-binding protein*), ki so na citoplazemski membrani, s tem preprečujejo zamreženje peptidoglikana in rast bakterijske stene (Kak in Chow, 2002; Kotnik, 2002; Müller Premru in Pirš, 2020). Za razliko od stafilokokov, pri katerih je glavni mehanizem odpornosti proti betalaktamskim antibiotikom izločanje encimov betalaktamaz, je pri enterokokih glavni mehanizem odpornosti povezan s točkastimi mutacijami v regiji PBP5 pri vrsti *E. faecium* in v regiji PBP4 pri vrsti *E. faecalis*. Posledično pride do slabše vezave betalaktamskih antibiotikov v celični steni in bakterija pridobi odpornost proti tej skupini antibiotikov. Gen, ki nosi zapis za proizvodnjo PBP5, je *pbp5* in se lahko med bakterijskimi celicami prenaša s transpozonom *Tn5382*, ki hkrati nosi tudi gene za odpornost proti vankomicinu (Arias in Murray, 2012; EFSA, 2012; Hollenbeck in Rice, 2012; Kak in Chow, 2002). Pri vrsti *E. faecalis* je odpornost proti ampicilinu redka (večinoma gre za mutacijo gena *pbp5*), nasprotno pa je pri vrsti *E. faecium* pogosta (EUCAST, 2020a; García-Solache in Rice, 2019; Torres in sod., 2018).

Molekularne analize kažejo, da je pri humanih izolatih vrste *E. faecium*, ki so zelo odporni proti ampicilnu (MIK  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$ ), relativno malo genetskih linij (večina pripada klonalnemu kompleksu CC 17), ki so se uspešno razširile po bolnišnicah in povzročajo klinične okužbe ter kolonizacijo bolnikov, zdravljenih z različnimi antibiotiki. Na drugi strani izolati vrste *E. faecium*, ki izvirajo iz zdravih ljudi in niso povzročitelji okužb, izkazujejo dobro občutljivost za ampicilin (MIK  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$ ), pri živalskih izolatih vrste *E. faecium* pa vrednost MIK za ampicilin zelo variira, od 0,5 do 128  $\mu\text{g/ml}$  (Galloway-Peña in sod., 2009; Montealegre in sod., 2016).

### 2.3.1.2 Odpornost proti glikopeptidom

Glikopeptidi delujejo le proti po Gramu pozitivnim bakterijam, vendar jih zaradi manjše učinkovitosti v primerjavi z betalaktamskimi antibiotiki večinoma uporabljamo pri zdravljenju težjih okužb z odpornimi bakterijami (npr. s proti meticilinu odporno bakterijo *S. aureus*, MRSA). Najbolj znana predstavnika iz skupine glikopeptidov sta vankomicin in teikoplanin (Kak in Chow, 2002; Müller Premru in Pirš, 2020; Seme, 2002). Glikopeptidi so velike kompleksne molekule, ki so sestavljene iz heptapeptidov, aromatskih obročev in različnih sladkorjev (Kak in Chow, 2002). So baktericidni antibiotiki, njihov način delovanja pa temelji na zaviranju sinteze celične stene, in sicer s transglikolizacijo peptidoglikana preden pride do zamreženja, ki ga omogočajo encimi PBP (Müller Premru in Pirš, 2020; Seme, 2002). Za razliko od penicilinov, glikopeptidi delujejo na sintezo celične stene tako, da delujejo na substrate encimov, ki sodelujejo pri sintezi celične stene. Odpornost naj bi bila posledica nenavadne poti biosinteze peptidoglikana, kjer se namesto normalnega prekursorja UDP-muramilpentapeptida sintetizira UDP-muramiltetrapeptid-D-laktat. Encimi, ki katalizirajo sledeče reakcije, prepoznajo spremenjen vmesni produkt kot substrat. Struktura nastalega peptidoglikana ima na koncu pentapeptida namesto D-alanil-D-alanina vezan D-alanil-D-laktat ali D-alanin-D-serin, ki pa ga glikopeptid ne prepozna in zato ne tvori kompleksa (Kak in Chow, 2002; Müller Premru in Pirš, 2020; Torres in sod., 2018). Odpornost proti glikopeptidom je zapisana na genih (operonih) *van*, ki se izražajo v treh fenotipih odpornosti; fenotip VanA in VanB sta pridobljeni obliki odpornosti, fenotip VanC pa je intrinzična lastnost bakterij vrst *E. gallinarum* in *E. casseliflavus* in se ne prenaša na druge enterokoke. Fenotip VanA omogoča odpornost proti obema, vankomicinu in teikoplaninu, fenotip VanB pa samo proti vankomicinu (Müller Premru in Pirš, 2020). V zadnjih desetletjih so opisali devet različnih operonov za odpornost proti glikopeptidom, ki jih lahko razdelimo v dve kategoriji. V prvo skupino uvrščamo operone, ki so odgovorni za zamenjavo D-alanil-D-alanina z D-alanil-D-laktatom (*vanA*, *vanB*, *vanD* in *vanM*), v drugo pa operone, ki omogočajo zamenjavo D-alanil-D-alanina z D-alanin-D-serinom (*vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* in *vanN*). Prvi opisani operon za odpornost proti glikopeptidom je bil operon *vanA*, ki ostaja najpogostejši operon v kliničnem okolju (García-Solache in Rice, 2019). Geni za zapis odpornosti proti glikopeptidom so locirani na kromosomu ali na mobilnih elementih, transpozonih. Med bakterijskimi celicami se operon *vanA* najpogosteje prenaša na transpozonu Tn1546, operon *vanB* pa na transpozonu Tn5382/1549 (García-Solache in Rice, 2019; Hollenbeck in Rice, 2012; Kak in Chow, 2002; Torres in sod., 2018).



Vankomicin in teikoplanin sta se klinično uspešno uporabljala skoraj 30 let, preden se je pojavila odpornost bakterij proti tema dvema antibiotikoma (Kak in Chow, 2002). V začetku devetdesetih let 20. stoletja se je zaradi povečane uporabe vankomicina in drugih širokospektralnih antibiotikov v ameriških bolnišnicah pojavilo značilno večje število izolatov vrste *E. faecium*, ki so razvili sekundarno odpornost proti vankomicinu. Prva poročila o izolaciji VRE v Evropi pa so se pojavila v poznih osemdesetih, vendar so bili to večinoma sevi, izolirani iz prebavnega trakta živali oz. iz ljudi, ki niso bili hospitalizirani. Pojav VRE v Evropi je bil močno povezan z uporabo avoparcina v krmi živali. Avoparcin je glikopeptidni antibiotik, ki so ga v subkliničnih koncentracijah uporabljali za pospeševanje rasti živali, vendar so se kmalu pojavila poročila, da avoparcin povzroča odpornost proti glikopeptidom, ki se v medicini uporabljajo izključno za zdravljenje težjih okužb ljudi (Arias in Murray, 2012; EFSA, 2012). Danska in Nemčija sta bili prvi državi, ki sta prepovedali uporabo avoparcina v živalski krmi, leta 1997 pa je bila z Direktivo Komisije 97/6/ES uporaba tega antibiotika v Evropi popolnoma prepovedana. Posledično se je znižala prevalenca VRE pri rejnih živalih in nehospitaliziranih, zdravih ljudeh (Klare in sod. 1999), vendar pa so bili izolati VRE po umiku avoparcina še dolgo časa prisotni v rejah živali (Bortolaia in sod., 2015). V času velike razširjenosti izolatov VRE pri živalih v Evropski uniji je bila pogostost okužb ljudi nizka, vendar pa se je število okužb ljudi, povezanih z VRE, pri ljudeh od leta 1999 povečalo (Ahmed in Baptiste, 2017).

### 2.3.1.3 Odpornost proti aminoglikozidnim antibiotikom

V skupino aminoglikozidnih antibiotikov uvrščamo streptomycin, gentamicin, kanamicin, neomicin, tobramicin, amikacin in druge. Njihov način delovanja je vezava na specifičen proteinski receptor na ribosomski podenoti 30 S, s čimer preprečijo vezavo t-RNK na ribosom in prenos t-RNK, s tem pa zavirajo sintezo proteinov in delujejo baktericidno (Kotnik, 2002; Müller Premru in Pirš, 2020). Zaradi slabše prepustnosti celične stene za velike molekule aminoglikozidov so enterokoki že naravno odporni proti nizkim (kliničnim) koncentracijam, zato je zdravljenje z antibiotiki iz te skupine v monoterapiji neučinkovito (Arias in Murray, 2012; Aslangul in sod., 2006; EUCAST, 2020a; García-Solache in Rice, 2019). Za zdravljenje hujših enterokoknih okužb jih lahko zaradi sinergističnega delovanja uporabimo v kombinaciji z zaviralci sinteze celične stene, če enterokoki ne kažejo odpornosti proti aminoglikozidom v visokih koncentracijah, kar izniči sinergistični učinek (EUCAST, 2020b; García-Solache in Rice, 2019). Za testiranje odpornosti proti visokim koncentracijam aminoglikozidov (HLAR) se uporablja gentamicin; izolate z vrednostjo MIK > 128 µg/l uvrščamo v skupino HLAR (EUCAST, 2020a). Odpornost proti aminoglikozidom je najpogosteje posledica delovanja različnih encimov (acetiltransferaze, adeniltransferaze in fosfotransferaze), ki jih kodirajo geni na plazmidih in transpozonih. Ti aminoglikozid-spreminjajoči encimi (angl. *aminoglycoside-modifying enzymes*, *AME*) tako spremenijo strukturo antibiotika, da ta ni več učinkovit. Vzrok pridobljene odpornosti proti visokim koncentracijam aminoglikozidov so lahko tudi mutacije, ki spremenijo ribosomsko beljakovino S12 ali motijo prenos antibiotika skozi celično steno. Pridobljena odpornost pa je lahko tudi posledica aktivnega črpanja antibiotika iz celice. Izmed vseh genov, ki nosijo zapis za odpornost proti visokim koncentracijam aminoglikozidov, so

klinično najpomembnejši tisti, ki kodirajo odpornost proti gentamicinu in streptomycinu, saj se omenjena antibiotika najpogosteje uporabljata pri zdravljenju resnih enterokoknih okužb (Arias in Murray, 2012; García-Solache in Rice, 2019; Hollenbeck in Rice, 2012; Müller Premru in Pirš, 2020). Izolati vrste *E. faecium* tvorijo še kromosomski AAC(6')-I encim, ki je odgovoren za izgubo sinergizma med aminoglikozidi (z izjemo gentamicina, amikacina in streptomicina) in penicilini oz. glikopeptidi (EUCAST, 2020b).

Odpornost proti visokim koncentracijam glikopeptidov je bila pri enterokokih iz vzorcev rejnih živali ter živil živalskega izvora prvič opisana leta 1998 na Danskem (Torres in sod., 2018).

#### 2.3.1.4 Odpornost proti tetraciklinom

Tetraciklini so širokospektralni bakteriostatični antibiotiki, ki preprečujejo sintezo beljakovin v bakterijski celici, tako da se reverzibilno vežejo na ribosomsko podenoto 30 S in preprečijo vezavo aminoacil-t-RNK na akceptorsko mesto (Müller Premru in Pirš, 2020). V veterinarski medicini se najpogosteje uporabljajo tetraciklin, klortetraciklin, oksitetraciklin in doksiciklin. Odpornost enterokokov proti njim je precej pogosta, opisanih je več kot 60 genov, ki jo kodirajo, med njimi najpogosteje *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(K)* in *tet(L)*. Gen *tet(M)*, ki se najpogosteje pojavlja pri protitetraciklinu odpornih enterokokih in drugih po Gramu pozitivnih bakterijah, je lociran na transpozonu Tn916/Tn1545 (Torres in sod., 2018). Do nastanka odpornosti proti tetraciklinom pride zaradi spremembe tarčnega mesta, encimske razgradnje, zmanjšane prepustnosti ali aktivnega črpanja antibiotikov iz celice s posebnimi membranskimi črpalkami (García-Solache in Rice, 2019; Müller Premru in Pirš, 2020).

V skupino tetraciklinov v širšem pomenu spadajo tudi glicilciklini, med katerimi je najpomembnejši predstavnik tigeciklin. Delujejo na enak način, imajo širok spekter delovanja in so zaviralci sinteze beljakovin. Prednost tigeciklina je, da se proti njemu redko pojavijo mehanizmi za odpornost (redko nastane odpornost zaradi črpanja antibiotika iz bakterije) (García-Solache in Rice, 2019; Müller Premru in Pirš, 2020).

#### 2.3.1.5 Odpornost proti makrolidom, linkozaminom in streptograminom

V skupino makrolidov uvrščamo različne kemične spojine, za vse pa je značilen makrociklični laktoski obroč. Makrolidi so širokospektralni bakteriostatični antibiotiki, ki zavirajo sintezo beljakovin, tako da se reverzibilno vežejo s 23S rRNK ribosomske podenote 50S in z zaviranjem encima peptidil transferaze preprečijo translacijo in podaljševanje beljakovinske verige. Najbolj znan makrolid je eritromicin. Odpornost proti eritromicinu je bila opisana že takoj po začetku klinične uporabe antibiotika pri ljudeh leta 1952, kodirana pa je z različnimi genetskimi determinantami. Med več kot 92 opisanimi geni, ki kodirajo pridobljeno odpornost proti eritromicinu pri enterokokih iz ljudi in živali, je najpogostejši gen *erm(B)*, ki se po navadi prenaša na transpozonu Tn917 (Torres in sod., 2018; Müller Premru in Pirš, 2020). Pri vrsti

*E. faecium* je opisana primarna kromosomalna odpornost proti makrolidom z genom *msr(A)* in linkozamide z genom *linB* (Portillo in sod., 2000; Torres in sod.; 2018).

Proti linkomicinu in klindamicinu so enterokoki primarno odporni (Torres in sod., 2018).

Streptogramini so skupina antibiotikov, ki so naravni produkti nekaterih bakterij v zemlji in zavirajo sintezo proteinov. Uvrščamo jih v skupino rezervnih antibiotikov (Müller Premru in Pirš, 2020). Najpomembnejši predstavnik je kvinupristin-dalfopristin (Q/D), ki je bil prvi antibiotik, priznan s strani ameriške Uprave za hrano in zdravila (Food and Drug Administration, FDA) za zdravljenje okužb s sevi vrste *E. faecium*, odpornimi proti vankomicinu (Arias in Murray, 2012; Hollenbeck in Rice, 2012). Omenjeni antibiotik je sestavljen iz dveh komponent – semisintetičnih streptograminov B in A, ki delujeta sinergistično. Podobno kot pri makrolidnih in linkozamidnih antibiotikih, Q/D zavira sintezo proteinov, tako da se veže na specifičen receptor, ki je na ribosomski podenoti 50S (Müller Premru in Pirš, 2020). Izolati vrste *E. faecalis* so naravno odporni proti dalfopristinu in zaradi tega tudi proti Q/D. Pri izolatih vrste *E. faecium* pa je sekundarna odpornost najpogosteje posledica delovanja encima virginiamicin acetiltransferaze (Vat), ki povzroča spremembo strukture antibiotika, inaktivacijo antibiotika in aktivno izčrpavanje antibiotika iz bakterijske celice (Arias in Murray, 2012; Hollenbeck in Rice, 2012; Kak in Chow, 2002).

#### 2.3.1.6 Odpornost proti fluorokinolonom

Osnova kinolonov, ki so trenutno ena najpomembnejših skupin potimikrobnih zdravil, je nalidiksinska kislina. Njihova nadgradnja so fluorokinoloni, med katerimi so najbolj znani ciprofloksacin, levofloksacin in moksifloksacin, v veterinarski medicini tudi enrofloksacin in marbofloksacin. So širokospektralni, baktericidni kemoterapevtiki, ki zavirajo sintezo nukleinskih kislin. Pri po Gramu pozitivnih bakterijah zavirajo delovanje bakterijske DNK-topoizomeraze IV, pri po Gramu negativnih bakterijah pa DNA-giraze; obe sta potrebni za podvojevanje bakterijskega kromosoma (Müller Premru in Pirš, 2020). Ciprofloksacin in levofloksacin se uporabljata predvsem za zdravljenje enterokoknih okužb sečil. Pridobljena odpornost bakterij proti kinolonom je večinoma posledica mutacij na genih za bakterijska encima (*gyrA* in *parC*), v manjši meri pa tudi kot posledica črpanja antibiotika iz bakterijske celice s črpalkami (EmeA in NorA-like) (García-Solache in Rice, 2019; Torres in sod., 2018). Odpornost proti ciprofloksacinu je ohranjena pri izolatih vrste *E. faecium* klonalnega kompleksa CC17 pri okužbah, povezanim z zdravstvom in pri skoraj vseh izolatih z odpornostjo proti glikopeptidom (Werner in sod., 2010).

#### 2.3.1.7 Odpornost proti linezolidu

Linezolid uvrščamo v skupino oksazolidinonov in je pomemben antibiotik za zdravljenje okužb z VRE in tudi z MRSA (leta 2000 je bil priznan s strani FDA za zdravljenje okužb z VRE) (Bi in sod. 2018). Je bakteriostatičen antibiotik, ki se veže na podenoto 50 S kromosoma ter z

oviranjem tvorbe iniciacijskega kompleksa med tRNA, mRNA in ribosomom prepreči začetek sinteze beljakovin (Müller Premru in Pirš, 2020; Torres in sod., 2018). Pomembno odkritje je bila identifikacija gena *cfz* v enterokokih humanega in živalskega izvora. Gen *cfz* kodira rRNA metiltransferazo, ta pa preprečuje vezavo antibiotika na specifična mesta (Torres in sod., 2018). Gen so prvič odkrili pri kliničnih primerih okužb ljudi s stafilokoki in postavili hipotezo, da gen verjetno izvira iz živalskih izolatov (Hollenbeck in Rice, 2012). V letu 2011 je Liu s sodelavci (2012) prvi opisal in določil lokacijo gena pri sevu vrste *E. faecalis*, izoliranem na goveji farmi. Poleg omenjenega gena je pomemben še gen *optrA*, ki je lahko lociran na kromosomu ali na plazmidu izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* pri ljudeh in živalih ter kodira ABC-transporter (García-Solache in Rice, 2019). Odpornost enterokokov proti linezolidu lahko predstavlja težavo, saj sodi linezolid med kritične antibiotike, namenjene zdravljenju ljudi. Geni za odpornost proti linezolidu (večinoma gen *optrA*) so bili ugotovljeni pri enterokokih iz rejnih živali in v živilih živalskega izvora, niso pa bili ugotovljeni pri domačih ljubljenskih in divjih živalih. Kljub temu, da se linezolid ne uporablja za zdravljenje živali, pa pojav odpornih enterokokov, ki nosijo gene na mobilnih genetskih elementih, predstavlja tveganje za javno zdravje (Torres in sod., 2018; Tyson in sod., 2018).

#### 2.3.1.8 Odpornost proti daptomicinu

Daptomicin je ciklični lipopeptidni antibiotik, ki deluje na membrano po Gramu pozitivnih bakterij, jo depolarizira in okvari ionski gradient, kar povzroči bakterijsko smrt. Primeren je za zdravljenje zapletenih okužb kože in podkožja ter bakteriemije in endokarditisa, predvsem tistih, ki jih povzročajo večkratno odporni enterokoki (vključno z VRE); uvrščamo ga med rezervne antibiotike in se uporablja samo v bolnišnicah (Arias in sod., 2011; Müller Premru in Pirš, 2020; Torres in sod., 2018). Mehanizmi odpornosti enterokokov so po navadi posledica mutacij na genih, ki kodirajo protein LiaF, odvisno od vrste. Pri vrsti *E. faecalis* je odpornost proti daptomicinu povezana s premikom membranskih fosfolipidov, pri vrsti *E. faecium* pa zaradi sprememb v fosfolipidni sestavi celične membrane (García-Solache in Rice, 2019).

#### 2.3.2 Odpornost enterokokov pri ljudeh

Najpogostejša povzročitelja enterokoknih okužb pri ljudeh sta vrsti *E. faecalis* (90–95 %) in *E. faecium* (5–10 %) (Germ in Seme, 2020). Enterokoke pogosto povezujemo z okužbami, povezane z zdravstvom, zanje pa lahko v literaturi najdemo različne epidemiološke podatke. V ZDA so enterokoki drugi najpogosteje izolirani povzročitelji okužb, povezanih z zdravstvom (Arias in Murray, 2012), medtem ko so v Evropi na tretjem oz. četrtem mestu (Werner in sod., 2008).

V skupini EARS-Net (angl. *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*), ki jo koordinira Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. *European Centre for Disease Prevention and Control*; ECDC) že dve desetletji zbirajo podatke o občutljivosti izbranih invazivnih bakterij v državah Evropske unije in državah Evropskega gospodarskega

prostora. Podatki se zbirajo po enotni metodologiji, in sicer za prve invazivne okužbe (iz vzorcev hemokultur ali likvorja), povzročene z določeno bakterijo (tudi za enterokoke) v opazovanem letu pri posameznem bolniku. Izmed vseh poročanih bakterijskih okužb v letu 2019 je bil delež okužb z bakterijami vrste *E. faecalis* 6,8 %, z bakterijami vrste *E. faecium* pa 4,5 %. Opisan je tudi trend pojavnosti za izolate vrste *E. faecalis*, odporne proti visokim koncentracijam aminoglikozidov (HLAR) ter trend za proti vankomicinu odporne izolate vrste *E. faecium* (VRE). Med pojavnostjo HLAR in VRE so bile med posameznimi državami EU razlike, vendar je bil pri izolatih HLAR med leti 2015 in 2019 statistično značilen padajoči trend z 31,9 % v letu 2015 na 26,6 % v letu 2019. Zaskrbljajoče je bilo povečanje deleža izolatov vrste *E. faecium* VRE z 10,5 % v letu 2015 na 18,3 % v letu 2019 vendar brez posebnega geografskega vzorca znotraj EU. V skoraj vseh državah EU pa so v letu 2019 poročali o zelo visokem deležu (> 75 %) proti ampicilinu odpornih (ARE) invazivnih izolatov vrste *E. faecium* (ECDC, 2020).

Po podatkih mreže EARS-Net Slovenija vsako leto narašča število prvih primerov invazivnih okužb pri nas; v letu 2017 je naraslo za 5,8 %, v letu 2018 pa za 6,6 %, glede na prejšnje leto. Število prvih primerov invazivnih okužb se je od leta 2015 do leta 2018 povečalo pri vseh bakterijah, spremljanih v EARS-Net, od tega pri vrsti *E. faecalis* za 21,8 %, pri vrsti *E. faecium* pa za 8,1 %. Deležev odpornih enterokokov za leti 2017 in 2018 je predstavljen v **Tabeli 3**. (Sočan in sod., 2018; Sočan in sod., 2019)

**Tabela 3:** Delež odpornih invazivnih (hemokultura in cerebrospinalna tekočina) izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* v letih 2017 in 2018 (EARS-Net Slovenija).

**Table 3:** Proportion of resistant invasive (blood and cerebrospinal fluid) *E. faecalis* and *E. faecium* isolates in years 2017 and 2018 (EARS-Net Slovenia).

	Delež odpornih invazivnih izolatov v Sloveniji (EARS-Net Slovenija)			
	2017		2018	
	<i>E. faecalis</i> [%]	<i>E. faecium</i> [%]	<i>E. faecalis</i> [%]	<i>E. faecium</i> [%]
<b>ARE</b>	0,6	91,3	0,0	94,8
<b>VRE</b>	0,0	0,7	0,0	0,0
<b>HLAR</b>	33,5	41,8	20,5	24,0

ARE, proti ampicilinu odporni enterokoki; VRE, proti vankomicinu odporni enterokoki; HLAR, enterokoki, odporni proti visokim koncentracijam aminoglikozidov.

Podatke o odpornosti enterokokov in drugih bakterij iz kliničnih vzorcev bolnikov, brez nadzornih kužnin, v Sloveniji spremlja Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ). V letu 2017 je bilo glede odpornosti testiranih 7943 prvih izolatov vrste *E. faecalis* in 1897 izolatov vrste *E. faecium*. Izolati vrste *E. faecalis* so bili najbolj odporni proti nitrofurantioinu (24,2 %), v manjšem deležu pa tudi proti ampicilinu (0,6 %), ciprofloksacinu (0,5 %), linezolidu (0,4 %) ter trije izolati še proti vankomicinu (0,04 %). Pri izolatih vrste *E. faecium* je bil delež odpornosti precej višji proti ciprofloksacinu (94,3 %) in ampicilinu (89,9 %), manjši pa proti vankomicinu (0,6 %) in linezolidu (0,5 %) (Štrumbelj in sod., 2018).

Prvi invazivni izolati *E. faecium* VRE so se v Sloveniji pojavili leta 2006. Opisani so tudi posamezni izbruhi okužb z bakterijami vrste *E. faecium* VRE z genom *vanB* iz Splošne bolnišnice Novo mesto v letu 2012 in iz Splošne bolnišnice Jesenice v letu 2014 ter z genom *vanA* iz bolnišnice v osrednjeslovenski regiji v letu 2012 (Ribič in sod., 2007; Schouten in sod., 2000; Triglav in sod., 2013).

### 2.3.3 Odpornost enterokokov pri živalih

Pri živalih enterokoke glede namena ugotavljanja odpornosti uvrščamo v dve skupini. V prvo skupino uvrščamo enterokoke, ki izkazujejo patogeni potencial in povzročajo različne okužbe. Te enterokoke spremljamo s terapevtskega vidika, da ugotovimo, kateri antibiotiki so primerni za zdravljenje in kateri, zaradi pridobljene odpornosti, niso primerni. Podobno kot pri ljudeh, so tudi pri živalih najpogostejše povzročiteljice okužb bakterije vrst *E. faecalis* in *E. faecium*, pri perutnini je pomemben patogen še vrsta *E. cecorum*. V drugo skupino, pri katerih ugotavljamo odpornost proti antibiotikom, uvrščamo komenzalne enterokoke pri rejnih živalih (perutnini, prašičih in govedu), ki služijo kot indikatorski mikroorganizmi za skupino po Gramu pozitivnih bakterij. Tako lahko spremljamo stanje glede odpornosti in posredno spremljamo selekcijski pritisk uporabe antibiotikov na populacijo črevesne mikrobiote pri rejnih živalih. Za ta namen iz fecesa zdravih živali na farmi (tik preden gredo v klanje) ali v klavnici izoliramo vrsti *E. faecalis* in *E. faecium*, s poudarkom na spremljanju proti vankomicinu odpornih izolatov vrste *E. faecium* (EFSA, 2015). Pregled odpornosti indikatorskih bakterij izvajajo vse države EU po usklajenem protokolu, zato rezultate lahko uporabimo tako na nacionalnem nivoju kot tudi za mednarodno spremljanje v okviru Izvedbenega sklepa EU o spremljanju in poročanju odpornosti zoonotskih in komenzalnih bakterij proti protimikrobnim zdravilom. Uradno poročilo je običajno na voljo z dveletnim zamikom od časa vzorčenja, vendar so podatki kljub temu zelo uporabni, ker nakazujejo trende odpornosti pri različnih vrstah in kategorijah živali v EU.

V poročilu EFSA za leto 2013 (EFSA, 2015) so predstavljeni rezultati testiranja indikatorskih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz fecesa pri piščancih (iz šestih evropskih držav (Danska, Finska, Hrvaška, Španija, Švedska in Švica) in fecesa pri kokoših nesnicah (Norveška). Pri obeh vrstah enterokokov iz piščančjega fecesa so v večini držav ugotovili največji delež odpornosti proti tetraciklinu (53,7–88,9 %) in eritromicinu (20,2–78,7 %), pri izolatih vrste *E. faecium* pa tudi visok delež odpornosti proti kvinupristinu/dalfopristinu (65,2–86,3 %) in nekoliko nižji delež proti ampicilinu (18,8–32,9 %). Večina držav ni poročala o odpornosti proti vankomicinu, razen posameznih izolatov vrste *E. faecalis* na Hrvaškem (4,3 %, 2013) ter posameznih izolatov vrste *E. faecium* v Belgiji (1,4 %, 2013) in Franciji (1,0 %, 2012). Enterokoki iz fecesa kokoši nesnic (Norveška) so bili v splošnem manj odporni kot pri piščancih (EFSA, 2015). Pri prašičih so o odpornosti pri enterokokih iz fecesa poročale štiri države: Belgija, Danska, Finska, Španija. Največji delež odpornosti pri izolatih vrste *E. faecalis* je bil ugotovljen proti tetraciklinu (58,3–95,7 %) in eritromicinu (33,3–76,1 %), pri izolatih *E. faecium* pa proti kvinupristinu/dalfopristinu (68,1–94,7 %). Deleži odpornosti so se precej

razlikovali med posameznimi državami. O posameznih izolatih bakterij VRE vrste *E. faecium* so poročali le iz Belgije (1,5 % v 2013; 4,1 % v 2012) in Francije (1,1 % v 2012).

Odpornost enterokokov, izoliranih iz vzorcev živali, je bila predmet tudi drugih različnih raziskav, predvsem za skupini betalaktamskih antibiotikov in glikopeptidov.

**Betalaktamski antibiotiki:** Pri izolatih vrste *E. faecalis*, razen nekaj izjem, niso ugotovili odpornosti proti ampicilinu, medtem ko se je prevalenca odpornih izolatov vrste *E. faecium* razlikovala med državami in vrstami živali. Odpornost proti ampicilinu (30 %) so odkrili v fecesu perutnine na Portugalskem, ne pa tudi pri govedu na klavnici v Avstraliji (Poeta in sod., 2006; Barlow in sod., 2017). Pri psih se je delež proti ampicilinu odpornih izolatov vrste *E. faecium* iz vzorcev fecesa zelo razlikoval: 3 % na Portugalskem, 23 % v Veliki Britaniji, 63 % v ZDA ter 76 % na Danskem (Damborg in sod., 2009; Jackson in sod., 2009; Poeta in sod., 2006).

**Glikopeptidi:** O odpornosti enterokokov proti vankomicinu, kot najbolj značilnem predstavniku skupine, so poročale številne raziskave, ki so jih Torres in sod. (2018) povzeli v preglednem članku. Vrsta *E. faecium* z genotipom *vanA* je bila najpogosteje opisana kot odporna proti vankomicinu pri rejnih živalih. Gen *vanA* je, po do zdaj dostopnih podatkih, najpogostejši vzrok pridobljene odpornosti proti vankomicinu, ugotovili pa so ga tudi pri vrstah *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. hirae* in *E. mundtii*. Pri živalih se pojavljata tudi gen *vanB* (opisan pri vrstah *E. faecalis*, *E. faecium* in *E. hirae* pri prašičih in perutnini) in gen *vanCI* (opisan pri vrstah *E. faecalis*, *E. faecium* in *E. mundtii* pri perutnini). Delež odpornih enterokokov se razlikuje glede na skupino rejnih živalih; najvišji je pri perutnini (0–77 %), nižji pa pri prašičih (0–25,3 %) in govedu (0–0,5 %). Pri psih so proti vankomicinu odporne enterokoke do sedaj ugotovili le v fecesu, in sicer pri vrsti *E. faecium* z genotipom *vanA* v obdobju med 1996 in 2003 (prevalenca 2,8–22,7 %). Pozneje bakterije VRE vrste *E. faecium* pri psih, niti pri bolnih, niso bile več opisane (povzeto po Torres in sod., 2018). Znan pa je primer iz Nove Zelandije, kjer so pri psički z mastitisom izolirali bakterije VRE vrste *E. faecalis* z genotipom *vanA* (Manson in sod., 2003).

## 2.4 ENTEROKOKI V ŽIVILIH ŽIVALSKEGA IZVORA

Enterokoke uvrščamo v skupino mlečno-kisliniskih bakterij (angl. *lactic acid bacteria*, LAB), ki jih lahko najdemo v številnih, tako v surovih kot v toplotno obdelanih živilih rastlinskega in živalskega izvora (Franz in sod., 2003; Foulquié Moreno in sod., 2006; Klein, 2003; Müller, 2001). Zaradi njihove sposobnosti preživetja pri višjih temperaturah in v okolju s povečano koncentracijo soli jih uvrščamo med kvarljivce živil (Franz in sod., 2011; Foulquié Moreno in sod., 2006).

Prisotnost enterokokov v prebavnem traktu živali in v okolju predstavlja veliko možnost kontaminacije surovega mesa in mleka vzdolž celotne prehranske verige. Z enterokoki je lahko kontaminirana že sama surovina, lahko pa pri procesu proizvodnje živila pride do naknadne kontaminacije končnega produkta (Giraffa, 2002; Torres in sod., 2018). Enterokoke lahko uporabljamo kot indikatorje fekalne kontaminacije živil (Foulquié Moreno in sod., 2006; Franz in sod., 2007). Njihova prisotnost v živilih je lahko povezana z nezadostno higiensko prakso, npr. kontaminacijo mesa med procesom evisceracije na klavni liniji. Nekateri raziskave kažejo, da se več kot 90 % živil živalskega izvora z enterokoki kontaminira že v klavnici (Franciosi in sod., 2009; Hammerum in sod., 2010; Torres in sod., 2018; Tyson in sod., 2017). Vendar pa to ne drži vedno, na kar lahko sklepamo tudi iz določil Uredbe evropske komisije o mikrobioloških merilih za živila, v kateri ni predpisanih mej glede prisotnosti enterokokov v hrani (Uredba komisije št. 1441/2007).

Prisotnost enterokokov v hrani pa še zdaleč nima samo negativne plati. Enterokoki namreč igrajo pomembno vlogo v procesu fermentacije pri proizvodnji različnih tradicionalnih fermentiranih živil z edinstvenimi organoleptičnimi lastnostmi (tradicionalni siri in klobase) (Franz in sod., 2003; Foulquié Moreno in sod., 2006; Müller, 2001). Zaradi proizvodnje mlečne kisline ter proteolitičnih in encimskih aktivnosti jih pri proizvodnji živil uporabljamo kot štarterske kulture, ki vplivajo na okus, aromo in teksturo živil (Gaglio in sod., 2016; Jaouani in sod., 2015). Prav tako so pomembni tudi pri naravni konzervaciji živil zaradi njihove sposobnosti tvorbe baktericidnih substanc, npr. mlečne kisline in bakteriocinov (enterocinov) (Reis in sod., 2012; Jaouani in sod., 2015). Znano je, da imajo enterocini, ki jih proizvajajo enterokoki, v živilih močno protimikrobno delovanje proti patogenim bakterijam kot so *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* in *Pseudomonas aeruginosa*, poleg tega pa tudi proti kvaljivcem in nekaterim glivam (Cleveland in sod., 2001; Franz in sod. 2007; Ben Braïek in sod., 2018).

Enterokoki se lahko uporabljajo tudi kot probiotiki za ljudi in živali. V prehrani ljudi se največkrat pojavljajo v kombinaciji z drugimi mlečno-kislinskimi bakterijami (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*), in sicer v jogurtih in drugih fermentiranih mlečnih izdelkih, lahko pa tudi v obliki farmacevtskih pripravkov. Glavni namen uporabe probiotikov je blagodejni vpliv na zdravje gostitelja s pospeševanjem presnove laktoze, zatiranje drugih, patogenih, bakterij v črevesju ter blaženje driske. Vendar pa je pred uporabo enterokokov kot biokonzervansov,



štarterskih kultur ali probiotikov nujno izvesti oceno varnosti glede možnosti prenosa genov za virulenčne dejavnike in/ali za odpornost proti protimikrobnim zdravilom (Ben Braïek in sod., 2018; Franz in sod., 2003; Franz in sod. 2007; Franz in sod., 2011; Baccouri in sod., 2019).

Najpogostejši vrsti enterokokov, ki jih izoliramo iz živil, sta vrsti *E. faecalis* in *E. faecium*, redkeje pa izoliramo tudi druge vrste - *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum*, odvisno od živila (Aarestrup in sod., 2002; Foulquié Moreno in sod., 2006; Franciosi in sod., 2009; Gelsomino in sod., 2001; Klein, 2003). V slovenskih tradicionalnih sirih so poleg najpogostejših vrst *E. faecalis* in *E. faecium* ugotovili še vrste *E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* in *E. mundtii* (Mohar Lorbeg, 2008). Pogosto iz mlečnih izdelkov izolirajo tudi vrsto *E. italicus* (Maietti in sod., 2007).

#### 2.4.1 Odpornost enterokokov iz živil živalskega izvora

V poročilu EFSA za leto 2013 (EFSA, 2015) so predstavljeni rezultati testiranja indikatorskih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz mesa piščancev in svinjine iz štirih držav (Danska, Madžarska, Nizozemska in Slovenija) ter iz vzorcev govedine iz treh držav (Danska, Madžarska, Nizozemska). Izolati vrste *E. faecalis* iz mesa piščancev so bili v največji meri odporni proti tetraciklinu (46,8–80,0 %) in eritromicinu (51,6 %), medtem ko so izolati vrste *E. faecium* izkazovali različno stopnjo odpornosti proti tema dvema antibiotikoma, glede na posamezno državo. Pri izolatih vrste *E. faecium* v mesu piščancev so poročali tudi o visokem deležu odpornosti proti kvinupristinu/dalfopristinu (54,5–73,3 %). Nižji delež (< 10 %) odpornosti proti ampicilinu, kloramfenikolu in gentamicinu pa so ugotovili pri izolatih obeh vrst iz piščančjega mesa. Podobna situacija je bila tudi pri enterokokih iz svinjine in govedine, najvišji delež odpornosti so ugotovili proti tetraciklinu in eritromicinu, vendar pa je bil delež zelo različen glede na posamezno državo. Proti vankomicinu odporne izolate so ugotovili le pri vrsti *E. faecalis* iz mesa piščancev na Madžarskem. Poročali pa so tudi o posameznih izolatih vrste *E. faecalis*, odpornih proti linezolidu v mesu piščancev in v govedini (EFSA, 2015). Enterokoki izolirani iz tradicionalnih slovenskih sirov so bili dobro občutljivi za betalaktamske antibiotike, vankomicin, teikoplanin in visoke koncentracije gentamicina, medtem ko so izkazovali odpornost proti rifampicinu (36 %), tetraciklinu (11 %), eritromicinu in kloramfenikolu (oba 8 %) ter ciprofloksacinu (2 %) (Mohar Lorbeg, 2008). Enterokoki, izolirani vzdolž celotne proizvodnje tradicionalnih siciljanskih sirov, pa so bili odporni proti eritromicinu (52,5 %), ciprofloksacinu (35 %), kvinupristinu/dalfopristinu (20 %), tetraciklinu (17,5 %) in visokim koncentracijam streptomicina (5 %) (Gaglio in sod., 2016). Pri vrsti *E. italicus* iz mlečnih izdelkov so ugotovili le odpornost proti tetraciklinom (17 %), medtem ko so bili izolati za vse ostale testirane antibiotike dobro občutljivi (Maietti in sod., 2007). Enterokoki različnih vrst iz morske hrane v Tuniziji so bili odporni proti ciprofloksacinu (43,2 %), streptomicinu (29,5 %), tetraciklinu (27,3 %), eritomicinu (25 %), kloramfenikolu (9,1 %) in gentamicinu (6,8 %) (Ben Said in sod., 2017). Enterokoki iz školjk klapavic, nabranih leta 2011 v slovenskem morju, so bili odporni proti tetraciklinu (68,8 %) in eritromicinu

(56,2 %), daptomicinu (12,5 %) in visokim koncentracijam aminoglikozidov (3,1 %) (Golob in sod., 2018b).

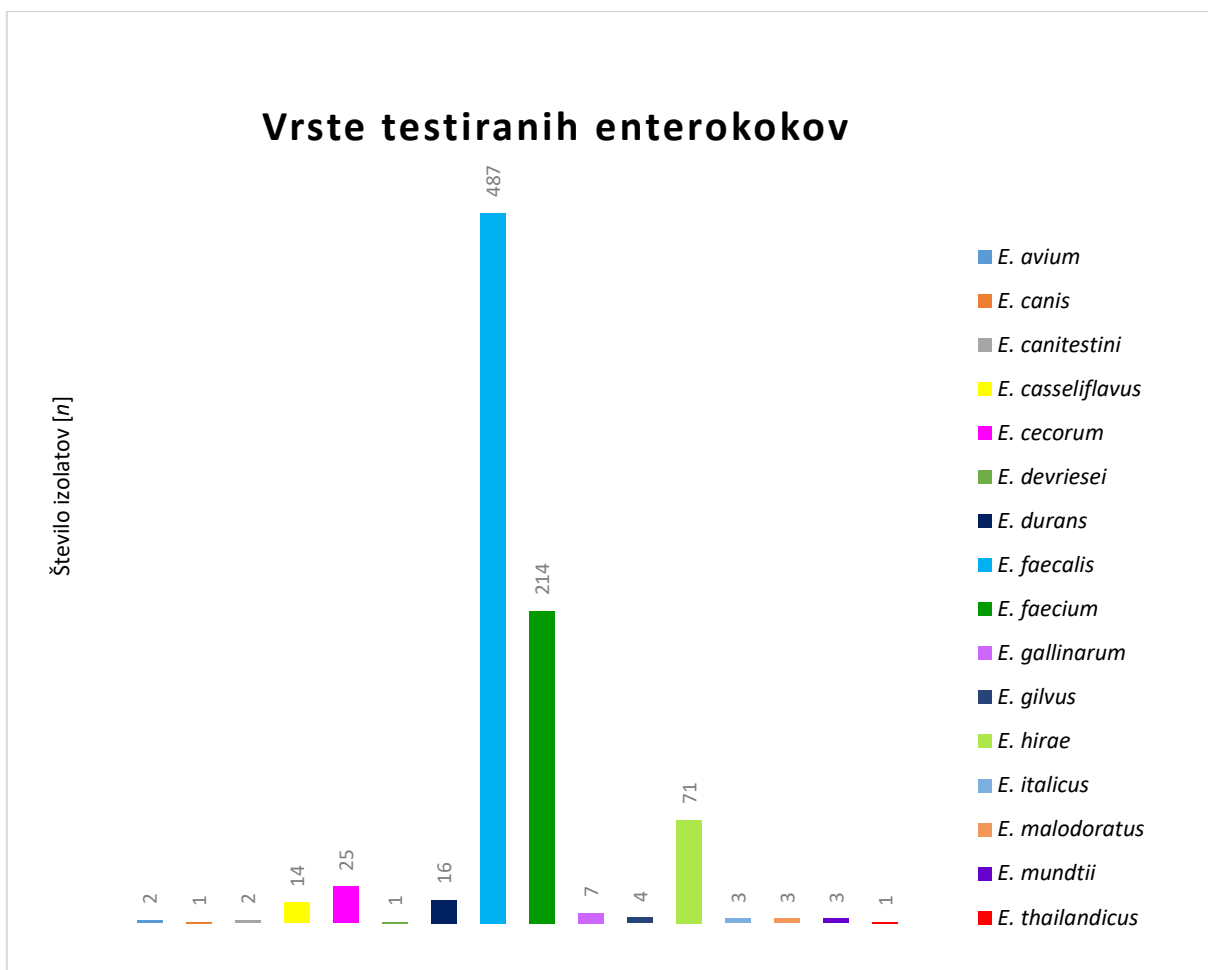
V obsežni raziskavi v ZDA so pri izolatih vrste *E. faecium* iz mesa v ugotovili nizko prevelanco odpornosti pri izolatih iz govedine (4 %) in svinjine (2,7 %), za razliko iz mesa piščancev, kjer je bilo odpornih 26 % izolatov, iz puranjega mesa pa celo 62,6 % izolatov (Tyson in sod., 2017). Bortolaia in sodelavci (2016) so primerjali podatke glede odpornih izolatov vrste *E. faecium* iz mesa perutnine in humanimi kliničnimi izolati iz nekaterih držav EU (Danska, Nizozemska, Slovenija, Švedska) ter ZDA. Ugotovili so, da so humani izolati kazali visok delež odpornosti proti ampicilinu (> 80 %), ne glede na državo, medtem ko je bila odpornost pri izolatih iz mesa značilno nižja.

Podobno kot pri rejnih živalih, je bila tudi v živilih živalskega izvora proti vankomicinu najpogosteje ugotovljena vrsta *E. faecium* z genotipom *vanA*. Gen *vanA* so ugotovili tudi pri drugih vrstah *E. faecalis*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. gallinarum* in *E. hirae* iz različnih živil. V živilih pa so ugotovili tudi gen *vanB* (opisan pri vrsti *E. faecium* iz različnih vzorcev živil v Španiji in Grčiji) in gen *vanN* (opisan na Japonskem pri petih izolatih vrste *E. faecium* iz mesa piščancev). Prevalenca VRE v živilih živalskega izvora je bila različna glede na vrsto živali in državo porekla (povzeto po Torres in sod., 2018).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 BAKTERIJSKI IZOLATI

V raziskavo smo vključili 854 izolatov, pridobljenih iz različnih vzorcev ljudi, živali, živil živalskega izvora in okolja, ki so pripadali šestnajstim vrstam enterokokov. Več kot polovica vseh izolatov je pripadala vrsti *E. faecalis*, četrtnina vrsti *E. faecium*, ostali izolati pa še drugim vrstam enterokokov: *E. hirae*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. italicus*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. avium*, *E. canitestini*, *E. canis*, *E. devriesei* in *E. thailandicus* (Slika 5).



Slika 5: Vrste enterokokov, analiziranih v raziskavi.

Figure 5: Enterococcal species analyzed in the study.

Število, vrste in izvor enterokokov, pri katerih smo ugotavljali občutljivost za različna protimikrobna zdravila ter prisotnost genov za sedem najpogostejših dejavnikov virulence, so prikazani v Tabeli 4.

**Tabela 4:** Pregled števila [*n*] in vrst enterokokov, ki so bili zajeti v raziskavo, ter izolirani iz različnih vrst vzorcev.  
**Table 4:** Overview of the number [*n*] and enterococcal species, isolated from different types of samples included in the study.

Vrsta vzorca		Vsi izolati [ <i>n</i> ]	<i>E. faecalis</i> [ <i>n</i> ]	<i>E. faecium</i> [ <i>n</i> ]	Drugi enterokoki [ <i>n</i> ]	
humani klinični vzorci		101	71	30	0	
živalski klinični vzorci		106	46	25	<i>E. canis</i>	1
					<i>E. canitestini</i>	2
					<i>E. cecorum</i>	25
					<i>E. gallinarum</i>	2
					<i>E. hirae</i>	5
meso	perutninsko meso	81	59	19	<i>E. gallinarum</i>	1
					<i>E. gilvus</i>	1
					<i>E. hirae</i>	1
	svinjina	85	68	10	<i>E. casseliflavus</i>	2
					<i>E. durans</i>	2
					<i>E. gilvus</i>	1
					<i>E. hirae</i>	1
					<i>E. mundtii</i>	1
	govedina	86	64	11	<i>E. casseliflavus</i>	2
<i>E. devriesei</i>					1	
<i>E. durans</i>					1	
<i>E. hirae</i>					6	
<i>E. mundtii</i>					1	
mleko in mlečni izdelki		86	48	17	<i>E. casseliflavus</i>	6
					<i>E. durans</i>	7
					<i>E. gilvus</i>	2
					<i>E. italicus</i>	3
					<i>E. malodoratus</i>	3
feces	piščanci	84	42	34	<i>E. casseliflavus</i>	1
					<i>E. durans</i>	2
					<i>E. gallinarum</i>	1
					<i>E. hirae</i>	4
	prašiči	94	38	19	<i>E. avium</i>	1
					<i>E. durans</i>	4
					<i>E. gallinarum</i>	3
					<i>E. hirae</i>	28
					<i>E. mundtii</i>	1
školjke		82	28	36	<i>E. casseliflavus</i>	3
					<i>E. hirae</i>	14
					<i>E. thailandicus</i>	1
ostali vzorci iz prehranske verige		49	23	13	<i>E. avium</i>	1
					<i>E. hirae</i>	12
skupaj		854	487	214	153	

### 3.1.1 Humani klinični izolati

V doktorsko delo smo vključili 101 izolat enterokokov iz zbirke Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) v Kranju; osredotočili smo se na dve klinično najpomembnejši vrsti *E. faecalis* ( $n = 71$ ) in *E. faecium* ( $n = 30$ ). Enterokoki so bili izolirani iz kliničnih vzorcev bolnikov v obdobju 2016–2018 po standardnem postopku na neselektivnih in selektivnih gojiščih (Church, 2016).

Izolati so izvirali iz različnih kliničnih vzorcev: urin ( $n = 49$ ), hemokultura ( $n = 30$ ), vaginalni bris ( $n = 8$ ), rana ( $n = 5$ ), aspirat sapnika ( $n = 2$ ), abdomen ( $n = 2$ ), po en izolat pa je bil izoliran iz aspirata abdominalnega drena, brisa žolčnika, centralnega venskega katetra, ejakulata ter sluhovoda. Proti vankomicinu odpornih izolatov enterokokov (VRE) iz kliničnih vzorcev bolnikov nismo vključili v raziskavo. V **Tabeli 5** je prikazano število enterokokov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz posameznih kužnin.

**Tabela 5:** Izvor in število [ $n$ ] enterokokov iz humanih kliničnih vzorcev.

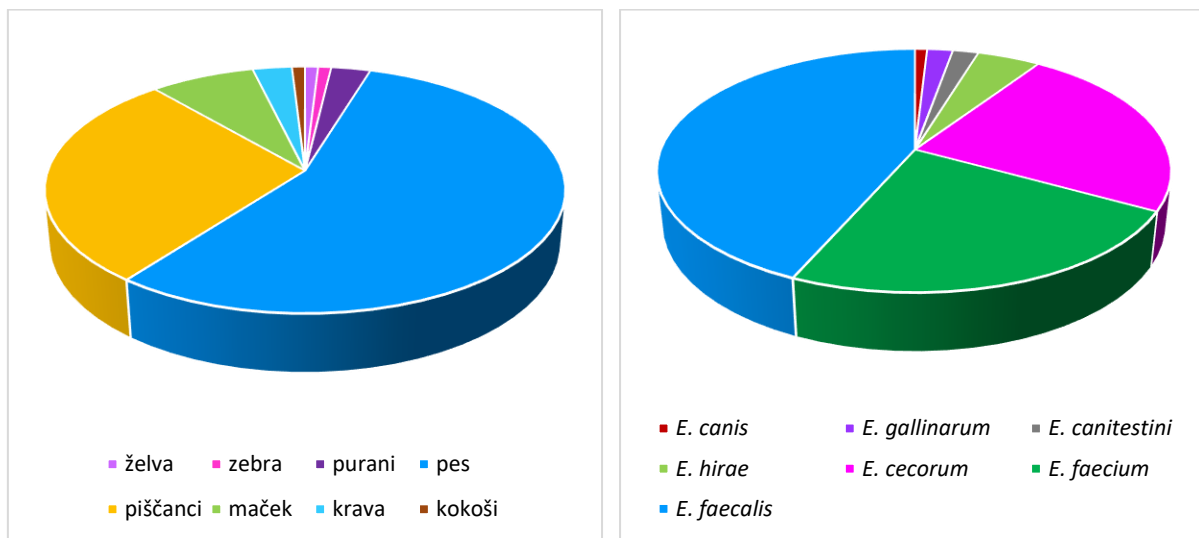
**Table 5:** Origin and number [ $n$ ] of enterococci from human clinical samples.

Klinični vzorci	<i>E. faecalis</i> [ $n$ ]	<i>E. faecium</i> [ $n$ ]	Skupaj
abdomen	2	0	2
aspirat abdominalnega drena	0	1	1
aspirat sapnika	0	2	2
bris žolčnika	1	0	1
centralni venski kateter	0	1	1
ejakulat	1	0	1
hemokultura	16	14	30
rana	4	1	5
sluhovod	1	0	1
urin	38	11	49
vaginalni bris	8	0	8
skupaj	71	30	101

### 3.1.2 Izolati iz kliničnih vzorcev živali

Izolate enterokokov iz te skupine smo pridobili v okviru splošne bakteriološke preiskave kliničnih vzorcev različnih vrst živali na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani (IMP VF) v letih 2008 in 2009 ter v obdobju 2012–2020.

V raziskavo smo vključili 106 izolatov enterokokov, in sicer: *E. faecalis* ( $n = 46$ ), *E. faecium* ( $n = 25$ ), *E. cecorum* ( $n = 25$ ), *E. hirae* ( $n = 5$ ), *E. canitestini* ( $n = 2$ ), *E. gallinarum* ( $n = 2$ ) ter *E. canis* ( $n = 1$ ) (**Slika 6**). Vzorci, iz katerih so bili enterokoki izolirani, so bili odvzeti različnim vrstam živali: pes ( $n = 59$ ), brojlerji ( $n = 30$ ), maček ( $n = 8$ ), krava ( $n = 3$ ), purani ( $n = 3$ ), kokoši ( $n = 1$ ; matična jata), zebra ( $n = 1$ ) in želva ( $n = 1$ ) (**Slika 6**).



**Slika 6:** Izvor (levo) in vrste (desno) testiranih enterokokov iz vzorcev živali.

**Figure 6:** Origin (left) and species (right) of enterococci tested from animal samples.

Enterokoke smo osamili iz različnih kliničnih vzorcev: urin ( $n = 34$ ), živalski organi po raztelesbi (jetra, srce, ledvica, pljuča, vranica;  $n = 33$ ), sluhovod ( $n = 13$ ), bris sklepa ( $n = 8$ ), rana ( $n = 7$ ), punktati trebušne votline ( $n = 3$ ), mleko krav z mastitisom ( $n = 3$ ), bris podkožnega tkiva ( $n = 2$ ), po en izolat pa smo pridobili tudi iz hemokulture, brisa sapnika in nosnega izpirka. Pregled števila enterokokov iz posameznih kužnin je predstavljen v **Tabeli 6**.

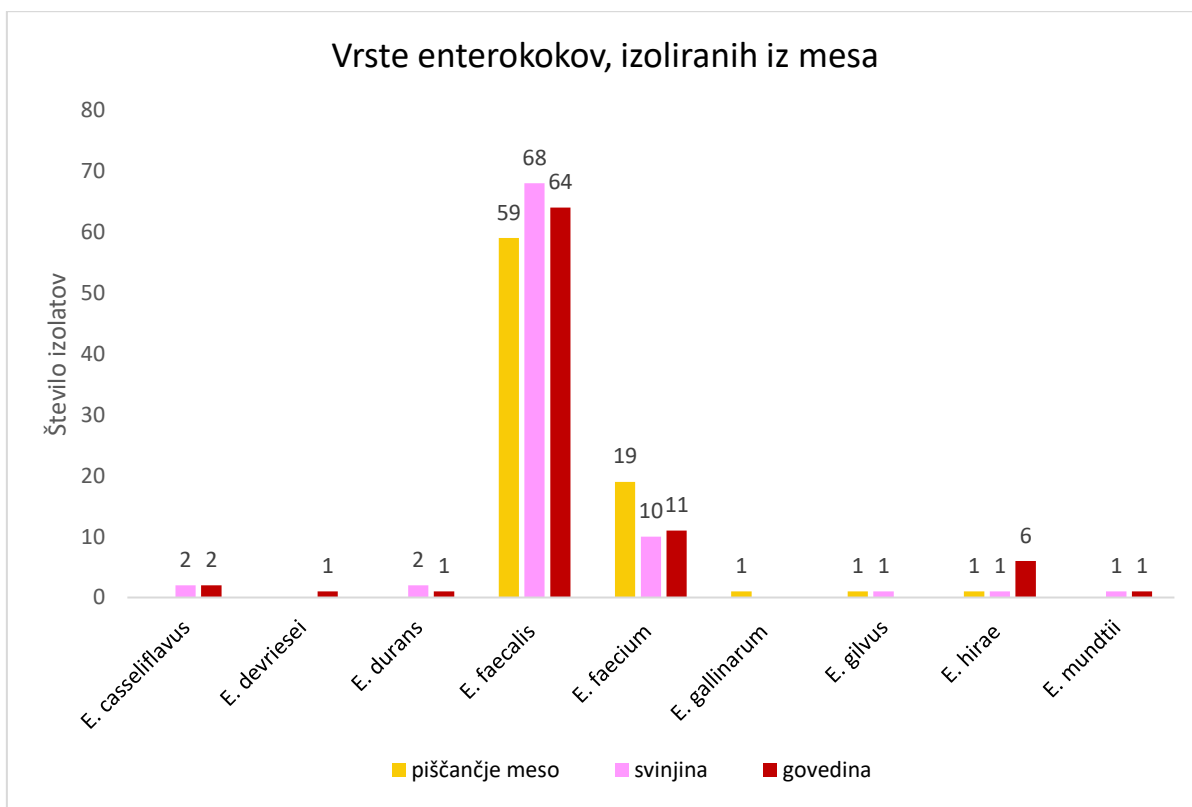
**Tabela 6:** Izvor in število [ $n$ ] enterokokov iz živalskih kliničnih vzorcev.

**Table 6:** Origin and number [ $n$ ] of enterococci from animal clinical samples.

Klinični vzorci	<i>E. faecalis</i> [ $n$ ]	<i>E. faecium</i> [ $n$ ]	<i>E. canis</i> [ $n$ ]	<i>E. canitestini</i> [ $n$ ]	<i>E. cecorum</i> [ $n$ ]	<i>E. gallinarum</i> [ $n$ ]	<i>E. hirae</i> [ $n$ ]	Skupaj
bris podkožnega tkiva	1	1	0	0	0	0	0	2
bris sklepa	0	0	0	0	6	0	2	8
bris sapnika	1	0	0	0	0	0	0	1
hemokultura	0	1	0	0	0	0	0	1
mleko (mastitis)	2	1	0	0	0	0	0	3
nosni izpirek	0	0	0	1	0	0	0	1
organi	5	5	0	0	19	2	2	33
punktati trebušne votline	0	3	0	0	0	0	0	3
rana	4	3	0	0	0	0	0	7
sluhovod	9	2	1	1	0	0	0	13
urin	24	9	0	0	0	0	1	34
skupaj	46	25	1	2	25	2	5	106

### 3.1.3 Izolati iz mesa

V raziskavo smo vključili 252 enterokokov, pridobljenih iz vzorcev mesa živali, namenjenih za prehrano ljudi (perutnina, prašiči, govedo). Vzorci so bili odvzeti v okviru temeljne študije, predpisane s strani EU z dokumentom Izvedbenega sklepa Komisije o spremljanju in poročanju odpornosti zoonotskih in komezalnih bakterij proti protimikrobnim zdravilom (2013/652 EU) in v okviru Programa monitoringa zoonoz Uprave za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR). Vzorčenje se je izvajalo v maloprodajnih obratih, ki neposredno oskrbujejo končnega potrošnika s svežim mesom (trgovine) pri različnih nosilcih dejavnosti (trgovskih verigah) na celotnem ozemlju Slovenije. Vzorce mesa slovenskega in tujega izvora, iz katerih smo pridobili izolate enterokokov, je predstavljalo nepakirano in pakirano ohlajeno sveže meso piščancev, svinjine in govedine. Iz prodajnih izložb so bili naključno izbrani originalni paketi predpakiranega mesa, v mesnicah pa je vzorčevalec naključno izbral kos mesa v skupni teži najmanj 100 g. Vsi vzorci svežega mesa so bili pod kontroliranimi pogoji hladne verige preneseni v laboratorij IMP VF. Število posameznih vrst enterokokov izoliranih iz različnih vrst mesa je prikazano na **Sliki 7**.



**Slika 7:** Število posameznih vrst enterokokov, izoliranih iz mesa piščancev, svinjine in govedine.

**Figure 7:** Number of enterococcal species from chicken, pork and beef.

Iz piščančjega mesa smo osamili in analizirali 81 izolatov, ki so pripadali petim različnim vrstam enterokokov: *E. faecalis* ( $n = 59$ ), *E. faecium* ( $n = 19$ ), *E. gallinarum* ( $n = 1$ ), *E. gilvus* ( $n = 1$ ) in *E. hirae* ( $n = 1$ ).

Iz svinjine smo osamili in analizirali 85 izolatov, ki so pripadali sedmim različnim vrstam enterokokov: *E. faecalis* ( $n = 68$ ), *E. faecium* ( $n = 10$ ), *E. casseliflavus* ( $n = 2$ ), *E. durans* ( $n = 2$ ), *E. gilvus* ( $n = 1$ ), *E. hirae* ( $n = 1$ ) in *E. mundtii* ( $n = 1$ ).

Iz govejega mesa smo osamili in analizirali 86 izolatov, ki so pripadali sedmim različnim vrstam enterokokov: *E. faecalis* ( $n = 64$ ), *E. faecium* ( $n = 11$ ), *E. hirae* ( $n = 6$ ), *E. casseliflavus* ( $n = 2$ ), *E. devriesei* ( $n = 1$ ), *E. durans* ( $n = 1$ ) in *E. mundtii* ( $n = 1$ ).

### 3.1.4 Izolati iz mleka in mlečnih izdelkov

Testirali smo 86 enterokokov iz mleka in mlečnih izdelkov, ki so pripadali sedmim različnim vrstam: *E. faecalis* ( $n = 48$ ), *E. faecium* ( $n = 17$ ), *E. durans* ( $n = 7$ ), *E. casseliflavus* ( $n = 6$ ), *E. italicus* ( $n = 3$ ), *E. malodoratus* ( $n = 3$ ) in *E. gilvus* ( $n = 2$ ).

Enterokoki so bili izolirani iz naslednjih vzorcev: mleko ( $n = 40$ ), sir ( $n = 30$ ), sirnina ( $n = 13$ ), maslo ( $n = 2$ ) in pinjenec ( $n = 1$ ). V laboratoriju IMP VF smo iz surovega mleka, odvzetega iz mlekomatov z območja celotne Slovenije v letu 2015, osamili 31 enterokokov, 55 analiziranih izolatov pa je bilo iz zbirke Inštituta za mlekarstvo in probiotike Biotehniške fakultete (IML-PRO) iz Rodice. Pregled enterokokov izoliranih iz vzorcev mleka in mlečnih izdelkov je predstavljen v **Tabelah 7 in 8**.

**Tabela 7:** Izvor in število [ $n$ ] enterokokov iz kravjega mleka in mlečnih izdelkov.

**Table 7:** Origin and number [ $n$ ] of enterococci from cow's milk and milk products.

Vzorci	<i>E. faecalis</i> [ $n$ ]	<i>E. faecium</i> [ $n$ ]	<i>E. casseliflavus</i> [ $n$ ]	<i>E. durans</i> [ $n$ ]	<i>E. gilvus</i> [ $n$ ]	<i>E. italicus</i> [ $n$ ]	<i>E. malodoratus</i> [ $n$ ]	Skupaj
mleko	2	2	0	0	0	1	0	5
mlekomat*	20	4	1	4	1	0	1	31
sir	11	2	0	1	1	2	2	19
sirnina	4	2	1	0	0	0	0	7
skupaj	37	10	2	5	2	3	3	62

\*Surovo mleko, odvzeto iz mlekomatov na celotnem ozemlju Slovenije v letu 2015.



**Tabela 8:** Izvor in število [*n*] enterokokov iz ovčjega in kozjega mleka ter mlečnih izdelkov.

**Table 8:** Origin and number [*n*] of enterococci from sheep or goat milk and milk products.

Vzorci	<i>E. faecalis</i> [ <i>n</i> ]	<i>E. faecium</i> [ <i>n</i> ]	<i>E. casseliflavus</i> [ <i>n</i> ]	<i>E. durans</i> [ <i>n</i> ]	Skupaj
maslo	2	0	0	0	2
mleko	0	1	3	0	4
pinjenec	1	0	0	0	1
sir	5	4	0	2	11
sirmina	3	2	1	0	6
skupaj	11	7	4	2	24

### 3.1.5 Izolati iz školjk

V raziskavo smo vključili tudi izolate enterokokov iz mediteranskih klapavic (*Mytilus galloprovincialis*), nabranih v slovenskem morju za prehrano ljudi. Vzorci so bili odvzeti v okviru uradnega nadzora glede prisotnosti morskih biotoksinov v treh slovenskih školjčičiščih, Strunjanu, Sečovljah in na Debelem rtiču, in sicer v vsakem školjčičišču na treh različnih kontrolnih točkah. Školjke so bile pod kontroliranimi pogoji hladne verige prenesene v laboratorij. Odprte in poškodovane klapavice smo zavrgli. Za izolacijo enterokokov smo naključno izbrali po nekaj školjk iz vsake kontrolne točke posameznega školjčičišča. Pred začetkom analize smo jih sprali pod tekočo vodo ter z njih odstranili pesek in alge, nato pa uporabili celotno vsebino školjk brez lupine. Klapavice so predstavljale tako vzorec živila živalskega izvora za prehrano ljudi in hkrati tudi okoljski vzorec. Školjke so zaradi njihove narave prehranjevanja s filtriranjem vode dober pokazatelj fekalne kontaminacije okolja in morja.

Iz mesa školjk smo osamili in analizirali 82 izolatov, ki so pripadali petim različnim vrstam enterokokov: *E. faecium* (*n* = 36), *E. faecalis* (*n* = 28), *E. hirae* (*n* = 14), *E. casseliflavus* (*n* = 3) in *E. thailandicus* (*n* = 1).

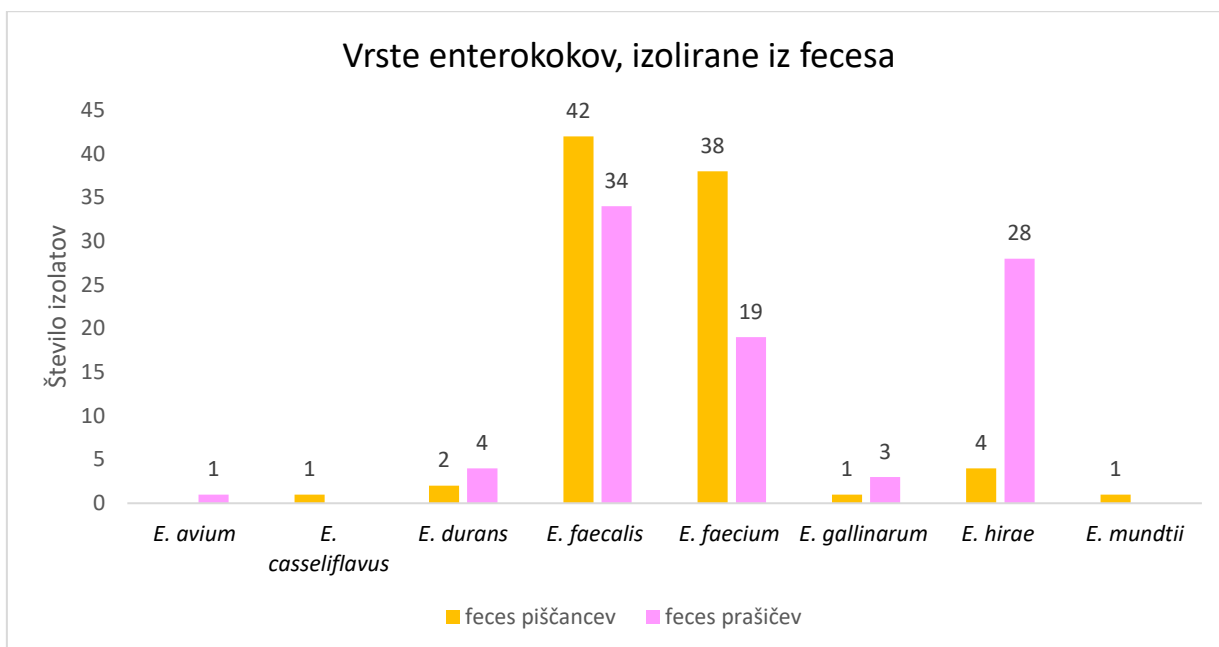
### 3.1.6 Izolati iz fecesa

V raziskavo smo vključili tudi 178 enterokokov, pridobljenih iz fecesa zdravih piščancev in prašičev, namenjenih za zakol. Podobno kot vzorci mesa so bili tudi vzorci fecesa odvzeti v okviru temeljne študije skladno s sklepom 2013/652 EU. Vzorci fecesa so bili odvzeti v odobrenih obratih za klanje perutnine in prašičev. V vzorčenje so bile vključene samo pitovne živali (piščanci brojlerji in prašiči pitanci), ki so bile v celoti ali deloma rejene v Sloveniji ter pri katerih pri veterinarsko sanitarnem pregledu na klavni liniji ni bilo ugotovljeno stanje, ki bi

lahko vplivalo na zdravje ljudi ali živali. Pri piščancih je vzorec fecesa predstavljal vsebina naključno izbranih desetih slepih čreves živali iz ene klavne serije. Pri pitancih pa je bilo vzorčeno približno 200 g slepega črevesa z vsebino ali 200 g fecesa iz slepega črevesa pri naključno izbranem prašiču po evisceraciji iz ene klavne serije. Vsi vzorci so bili pod kontroliranimi pogoji hladne verige preneseni v laboratorij IMP VF.

Iz fecesa piščancev smo osamili in analizirali 84 izolatov, ki so pripadali šestim različnim vrstam enterokokov: *E. faecalis* ( $n = 42$ ), *E. faecium* ( $n = 34$ ), *E. hirae* ( $n = 4$ ), *E. durans* ( $n = 2$ ), *E. casseliflavus* ( $n = 1$ ) in *E. gallinarum* ( $n = 1$ ) (Slika 8).

Iz fecesa prašičev smo osamili in analizirali 94 izolatov, ki so pripadali sedmim različnim vrstam enterokokov: *E. faecalis* ( $n = 38$ ), *E. hirae* ( $n = 28$ ), *E. faecium* ( $n = 19$ ), *E. durans* ( $n = 4$ ), *E. gallinarum* ( $n = 3$ ), *E. avium* ( $n = 1$ ) in *E. mundtii* ( $n = 1$ ) (Slika 8).



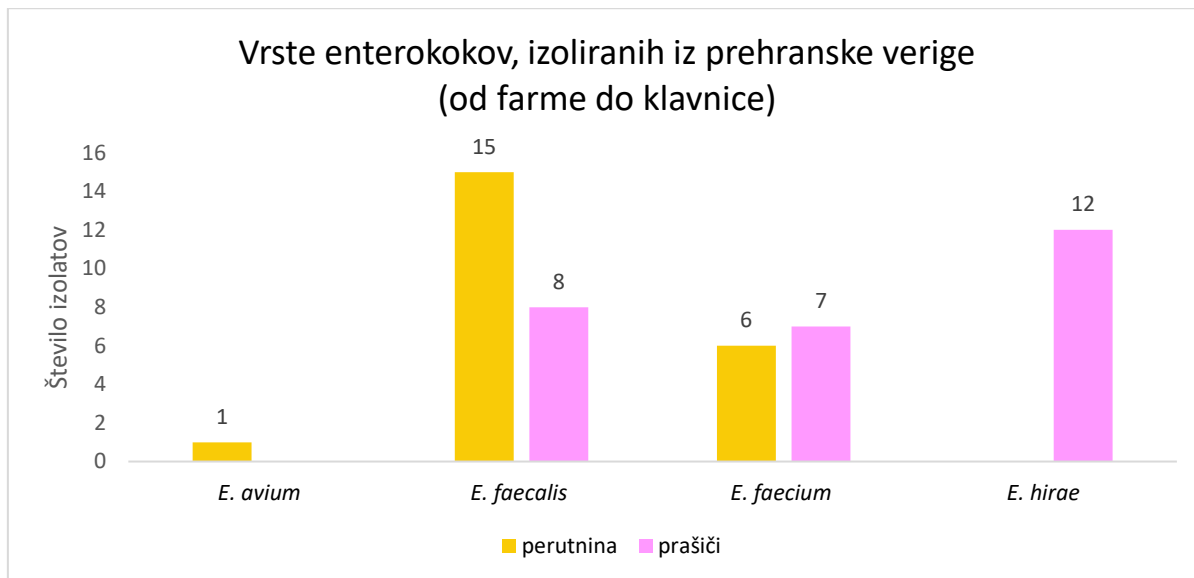
Slika 8: Število posameznih vrst enterokokov, izoliranih iz fecesa piščancev in prašičev.

Figure 8: Number of enterococcal species from broiler and pig feces.

### 3.1.7 Ostali izolati iz prehranske verige (od farme do klavnice)

V raziskavo smo vključili tudi 49 izolatov enterokokov, ki smo jih uvrstili v skupino ostalih izolatov iz prehranske verige. Enterokoke v tej skupini smo pridobili v okviru ciljnega raziskovalnega projekta Izvor in širjenje odpornih bakterij preko živil živalskega izvora (V4-1606) v letu 2017, s katerim smo želeli raziskati kritična mesta, kjer lahko odporne bakterije, vključno z VRE, vstopajo v prehransko verigo.

Iz okoljskih vzorcev perutninske klavnice smo pridobili 22 izolatov, 27 izolatov pa iz prašičje farme in klavnice. Skupaj smo tako testirali 48 izolatov, ki so pripadali vrstam *E. faecalis* ( $n = 23$ ), *E. faecium* ( $n = 13$ ), *E. hirae* ( $n = 12$ ) in *E. avium* ( $n = 1$ ). Število izolatov glede na posamezno vrsto enterokokov in njihov izvor je grafično prikazano na **Sliki 9**.



**Slika 9:** Število posameznih vrst enterokokov, izoliranih iz prehranske verige.

**Figure 9:** Number of enterococcal species from food chain.

### 3.1.7.1 Perutninska klavnica

Vzorčili smo različna mesta v perutninski klavnici, kjer so v enem dnevu zaklali živali iz treh različnih rej (farma A, B in C). Na vsakem odvzemnem mestu je bilo odvzetih po 10 brisov, ki smo jih nato združili v skupen vzorec. Pri vseh treh farmah smo vzorčili: živali po zakolu in skubljenju, živali po evisceraciji, trupe živali pred hlajenjem ter trupe živali po hlajenju, pripravljene za prodajo. Poleg tega smo vzorčili še vodo iz parilnika pred začetkom klanja in po klanju, vodo iz skubilnika, bris tekočega traku ter bris naključne delovne površine na klavni liniji. Iz vzorcev smo osamili 22 izolatov, ki so pripadali trem vrstam enterokokov: *E. faecalis* ( $n = 15$ ), *E. faecium* ( $n = 6$ ) in *E. avium* ( $n = 1$ ). Pregled vzorcev, glede na vrsto in izvor izoliranih enterokokov iz perutninske klavnice, je v **Tabeli 9**.

### 3.1.7.2 Prašičja farma in klavnica

Izbrano rejo prašičev smo najprej vzorčili na posestvu, nato pa isto skupino živali še na klavnici. Farma, ki smo jo izbrali, sodi med eno večjih slovenskih rej pitancev, kjer odojke večinoma kupujejo v Avstriji, nato pa jih redijo do klavne teže. V preteklosti so na farmi že imeli težave z zdravstvenim stanjem živali, zaradi česar so jih zdravili z antibiotiki. Na posestvu smo živalim odvzeli nosne brise, poleg tega pa še različne vzorce okolja: tla in stene prašičjih boksov na več mestih, vodo iz napajalnikov, zrak v hlevu, brise prezračevalnih sistemov, okenskih polic, kljuk

za vstop na farmo ter škornjev skrbnika živali. Istim živalim smo nato odvzeli nosne brise tudi na klavnici.. Poleg tega smo na klavnici vzorčili tudi: brise tovornjaka za transport pitancev v klavnico, brise prašičjih trupov po omamljanju, vzorec vode po garanju živali (bazenska voda), brise nožev mesarja po evisceraciji in nožev veterinarja na klavni liniji, črevesno vsebino ter brise trupov na koncu klavne linije pred hlajenjem. Iz vzorcev smo osamili 27 izolatov, ki so pripadali trem vrstam enterokokov: *E. hirae* ( $n = 12$ ), *E. faecalis* ( $n = 8$ ) in *E. faecium* ( $n = 7$ ). Prikaz vzorcev, glede na vrsto in izvor izoliranih enterokokov iz prašičje farme in klavnice, je v **Tabeli 10**.

**Tabela 9:** Izvor in število [ $n$ ] enterokokov iz perutninske klavnice.

**Table 9:** Origin and number [ $n$ ] of enterococci from a poultry slaughterhouse.

Vzorci (farme A, B in C)	<i>E. faecalis</i> [ $n$ ]	<i>E. faecium</i> [ $n$ ]	<i>E. avium</i> [ $n$ ]	Skupaj
delovne površine na klavni liniji	1	1	0	2
trupi po zakolu in skubljenju	3	2	0	5
trupi pred hlajenjem (oprani)	1	1	1	3
trupi po hlajenju (za prodajo)	3	0	0	3
trupi po evisceraciji	3	0	0	3
voda iz skubilnika	2	0	0	2
voda iz parilnika	2	2	0	4
skupaj	15	6	1	22

**Tabela 10:** Izvor in število [ $n$ ] enterokokov iz prašičje farme in klavnice.

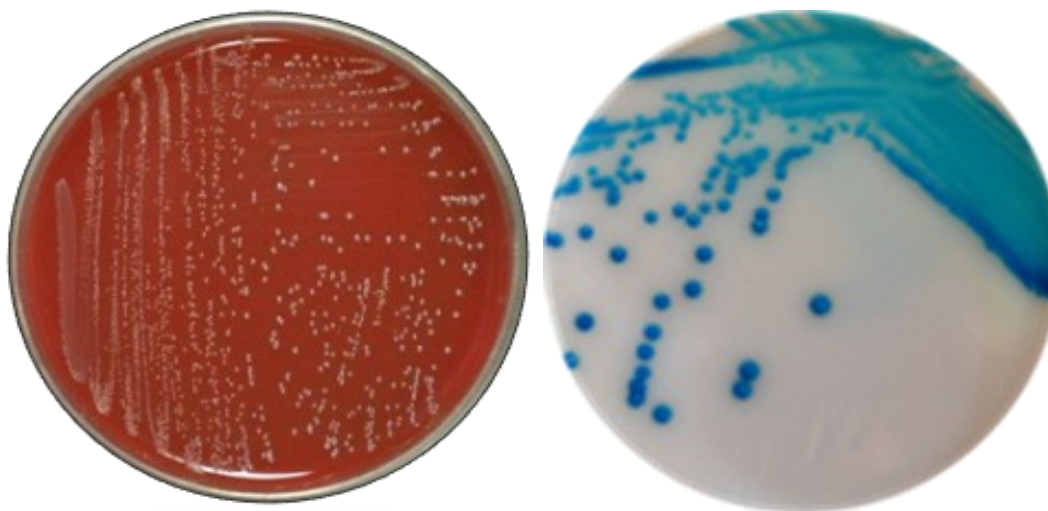
**Table 10:** Origin and number [ $n$ ] of enterococci from a pig farm and slaughterhouse.

Vzorci	<i>E. faecalis</i> [ $n$ ]	<i>E. faecium</i> [ $n$ ]	<i>E. hirae</i> [ $n$ ]	Skupaj
nosni brisi prašičev	1	1	1	3
površine hleva	1	1	4	6
voda iz hlevskih napajalnikov	0	1	0	1
zrak v hlevu	0	1	1	2
brisi prezračevalnih sistemov	0	1	1	2
brisi transportnega tovornjaka	0	0	2	2
trupi po omamljanju	0	1	1	2
voda po garanju (bazenska voda)	1	0	1	2
brisi nožev	2	0	0	2
črevesna vsebina	0	1	1	2
trupi pred hlajenjem	3	0	0	3
skupaj	8	7	12	27

## 3.2 OPIS METOD

### 3.2.1 Izolacija in identifikacija enterokokov iz kliničnih vzorcev živali ter vzorcev živil živalskega izvora, fecesa in vzorcev okolja

Enterokoki iz kliničnih živalskih vzorcev so bili izolirani skladno s standardnim operativnim postopkom splošne bakteriološke preiskave (interni dokument VF, SOP 14). Vse klinične vzorce smo nasadili na dve trdni gojišči, krvni agar (Blood Agar Base, Oxoid, Velika Britanija; KA) in URI agar (Uri Select 4, BioRad, Francija) (**Slika 10**), pripravljene po navodilih proizvajalca, nato pa plošče inkubirali 24–48 h pri 37 °C v aerobni atmosferi. Vsak klinični vzorec kužnine smo tudi neposredno pregledali pod mikroskopom po barvanju po Gramu. Na osnovi mikroskopske preiskave ter tipične rasti na posameznih gojiščih smo sumljive kolonije identificirali do vrste z metodo masne spektrometrije MALDI-TOF (ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*; Bruker, MALDI Biotyper, Bruker Daltonics, Nemčija), ki je opisana v točki 3.2.2.

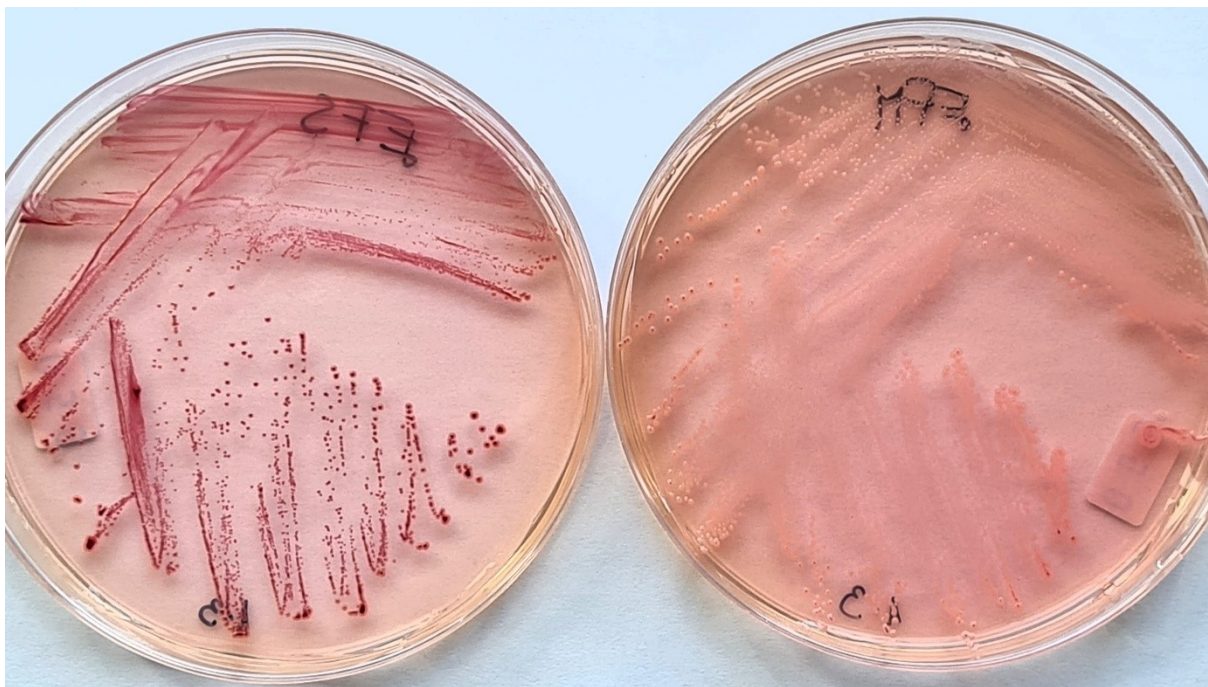


**Slika 10:** Kultura vrste *E. faecalis* na krvnem agarju (levo, foto: M. Golob) in kromogenem URI agarju (desno, foto: M. Lepen) po 24-h inkubaciji pri 37 °C.

**Figure 10:** Culture of *E. faecalis* on blood agar (left, photo: M. Golob) and chromogenic URI agar (right, photo M. Lepen) after 24-h incubation at 37 °C.

Vzorcem živil živalskega izvora (25 g/ml) smo dodali 9-kratno količino puferirane peptonske vode (Buffered Pepton Water, Biokar, Francija; PPV) ali 9-kratno količino slanega bujona (Mueller-Hinton broth MHB, 6,5% NaCl, Oxoid, Velika Britanija), jih homogenizirali ter inkubirali 16–20 h pri 37 °C v aerobni atmosferi. Po inkubaciji smo vzorce precepili na dve trdni selektivni gojišči, in sicer na gojišče SBA (Slanetz and Bartley agar, Biolife, Italija) ter kromogeno gojišče VRE agar (BioMerieux, Francija). Plošče smo inkubirali 24–48 h pri 37 °C, po inkubaciji pa opazovali prisotnost morfološko značilnih kolonij. Na gojišču SBA so enterokoki zrasli v obliki rdečih, bleščečih, izbočenih kolonij (*E. faecalis*), rožnatih kolonij s temnejšim centrom (*E. faecium*) oz. rožnatih kolonij brez izrazitega centra (druge vrste

enterokokov) (Slika 11). Na gojišču VRE so proti vankomicinu odporni izolati *E. faecalis* zrasli v obliki temno modrih kolonij, proti vankomicinu odporni izolati *E. faecium* pa so bili vijolični.



**Slika 11:** Kolonije bakterije vrste *E. faecalis* (levo) in vrste *E. faecium* (desno) na gojišču SBA. (foto: M. Golob)  
**Figure 11:** Colonies of *E. faecalis* (left) and *E. faecium* (right) isolates on SBA agar. (photo: M. Golob)

Po istem postopku smo izolirali tudi enterokoke iz vzorcev fecesa ter drugih vzorcev v prehranski verigi (od farme do klavnice). Pri fecesu smo odvzeli 10 g vzorca ter dodali 9-kratno količino PPV. Pri izolaciji enterokokov iz različnih brisov v prehranski verigi smo odvzeli po 10 brisov iz vsakega odvzemnega mesta, jih združili v en vzorec ter dodali 10 ml PPV. Zrak na prašičji farmi je bil odzvet z vzorčevalnikom Coriolis Delta Air Sampler (Bertin Instruments, ZDA), vodo pa smo vzorčili v količini 3 l, nato pa jo prefiltrirali ter filter uporabili kot vzorec.

### 3.2.2 Identifikacija enterokokov do vrste

Po inkubaciji vzorcev na trdnih gojiščih smo na osnovi makroskopskega pregleda odbrali morfološko različne kolonije in jih za pripravo čiste kulture presadili na KA. Plošče smo inkubirali čez noč pri 37 °C v aerobni atmosferi, bakterijske izolate pa nato do vrste identificirali z metodo masne spektrometrije MALDI-TOF po navodilih proizvajalca (Bruker Daltonics, Nemčija). Identifikacijo bakterij smo izvedli tako, da smo delček bakterijske kolonije z zobotrebcem nanесли na kovinsko ploščico s 96 polji, dodali 1 µl matriksa (HCCA, Bruker Daltonics, Nemčija), pustili na sobni temperaturi, da se je kapljica posušila, nato pa kovinsko ploščico vstavili v vakuumsko komoro naprave MALDI-TOF. Vzorec je bil nato obsevan z laserjem, čigar valovna dolžina je bila v absorpcijskem območju matriksa. Identifikacija bakterij z masnim spektrometrom v kombinaciji z analizatorjem časa potovanja je temeljila na

analizi beljakovinskih spektrov citoplazme izolatov ter njihovi računalniški primerjavi z referenčnimi spektri iz podatkovne knjižnice po navodilih proizvajalca.

Z metodo MALDI-TOF smo potrdili tudi vse humane klinične enterokoke iz zbirke NLZOH Kranj in vse enterokoke iz mleka ter mlečnih izdelkov iz zbirke IML-PRO BF Rodica.

Izolate enterokokov smo za nadaljnje preiskave shranili na kroglicah (Microbank, Pro-Lab Diagnostics, Kanada) v zamrzovalni omari pri  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.3 Ugotavljanje odpornosti enterokokov proti različnim skupinam protimikrobnih zdravil

Z mikrodilucijsko metodo določanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) smo pri izoliranih enterokokih ugotavljali odpornost proti dvanajstim antibiotikom iz desetih različnih skupin protimikrobnih zdravil. Uporabili smo komercialno pripravljene mikrotitrne plošče z različnimi koncentracijami antibiotikov (EUVENC, Trek Diagnostic Systems, Thermo Scientific, ZDA). Odpornost enterokokov smo ugotavljali proti ampicilinu (AMP), ciprofloksacinu (CIP), daptomicinu (DAP), eritromicinu (ERY), gentamicinu (GEN), kloramfenikolu (CHL), kvinupristin/dalfopristinu (SYN), linezolidu (LZD), teikoplaninu (TEI), tetraciklinu (TET), tigeciklinu (TGC) in vankomicinu (VAN). Razporeditev antibiotikov in njihova koncentracija na mikrotitrskih ploščah EUVENC je shematsko prikazana v **Tabeli 11**.

**Tabela 11:** Razporeditev in koncentracija protimikrobnih zdravil na mikrotitrski plošči EUVENC (Trek, Diagnostic Systems).

**Table 11:** Antimicrobial distribution and concentration on microtitre plate formate EUVENC (Trek, Diagnostic Systems).

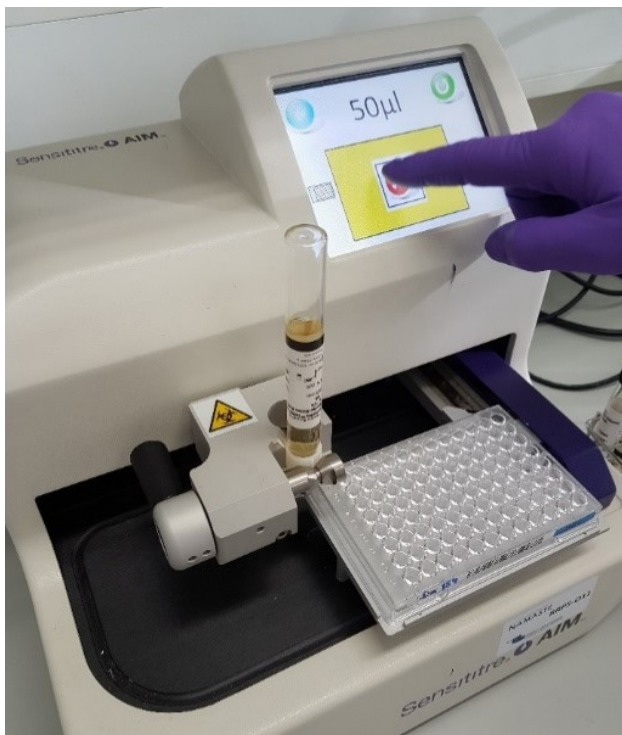
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	VAN 128	TEI 64	SYN 64	TET 128	DAP 32	CIP 16	ERY 128	TGC 4	LZD 64	GEN 1024	AMP 64	CHL 128
<b>B</b>	VAN 64	TEI 32	SYN 32	TET 64	DAP 16	CIP 8	ERY 64	TGC 2	LZD 32	GEN 512	AMP 32	CHL 64
<b>C</b>	VAN 32	TEI 16	SYN 16	TET 32	DAP 8	CIP 4	ERY 32	TGC 1	LZD 16	GEN 256	AMP 16	CHL 32
<b>D</b>	VAN 16	TEI 8	SYN 8	TET 16	DAP 4	CIP 2	ERY 16	TGC 0,5	LZD 8	GEN 128	AMP 8	CHL 16
<b>E</b>	VAN 8	TEI 4	SYN 4	TET 8	DAP 2	CIP 1	ERY 8	TGC 0,25	LZD 4	GEN 64	AMP 4	CHL 8
<b>F</b>	VAN 4	TEI 2	SYN 2	TET 4	DAP 1	CIP 0,5	ERY 4	TGC 0,12	LZD 2	GEN 32	AMP 2	CHL 4
<b>G</b>	VAN 2	TEI 1	SYN 1	TET 2	DAP 0,5	CIP 0,25	ERY 2	TGC 0,06	LZD 1	GEN 16	AMP 1	POS CON
<b>H</b>	VAN 1	TEI 0,5	SYN 0,5	TET 1	DAP 0,25	CIP 0,12	ERY 1	TGC 0,03	LZD 0,5	GEN 8	AMP 0,5	POS CON

Legenda: VAN vankomicin, TEI teikoplanin, SYN kvinupristin/dalfopristin, TET tetraciklin, DAP daptomicin, CIP ciprofloksacin, ERY eritromicin, TGC tigeciklin, LZD linezolid, GEN gentamicin, AMP ampicilin, CHL kloramfenikol, POS pozitivna kontrola.

Številke pod kraticami za protimikrobna zdravila predstavljajo koncentracijo protimikrobne snovi v  $\mu\text{g/ml}$ .



Iz čiste kulture na krvnem agarju smo izbrali 3–5 kolonij in jih suspendirali v 4 ml demineralizirane vode do gostote, ki je ustrezala standardu 0,5 McFarland. 10  $\mu$ l pripravljene suspenzije smo prenesli v 11 ml bujona Sensititre Mueller-Hinton (Trek Diagnostic Systems, Thermo Scientific, ZDA) in dobro premešali. Po homogenizaciji smo z avtomatskim razlivalcem v vsako jamico na mikrotitrski plošči inokulirali po 50  $\mu$ l bujona (**Slika 12**). Gostota inokuluma v končni suspenziji je bila približno  $5 \times 10^5$  CFU/ml (CFU, angl. *colony forming units*; kolonijske enote)

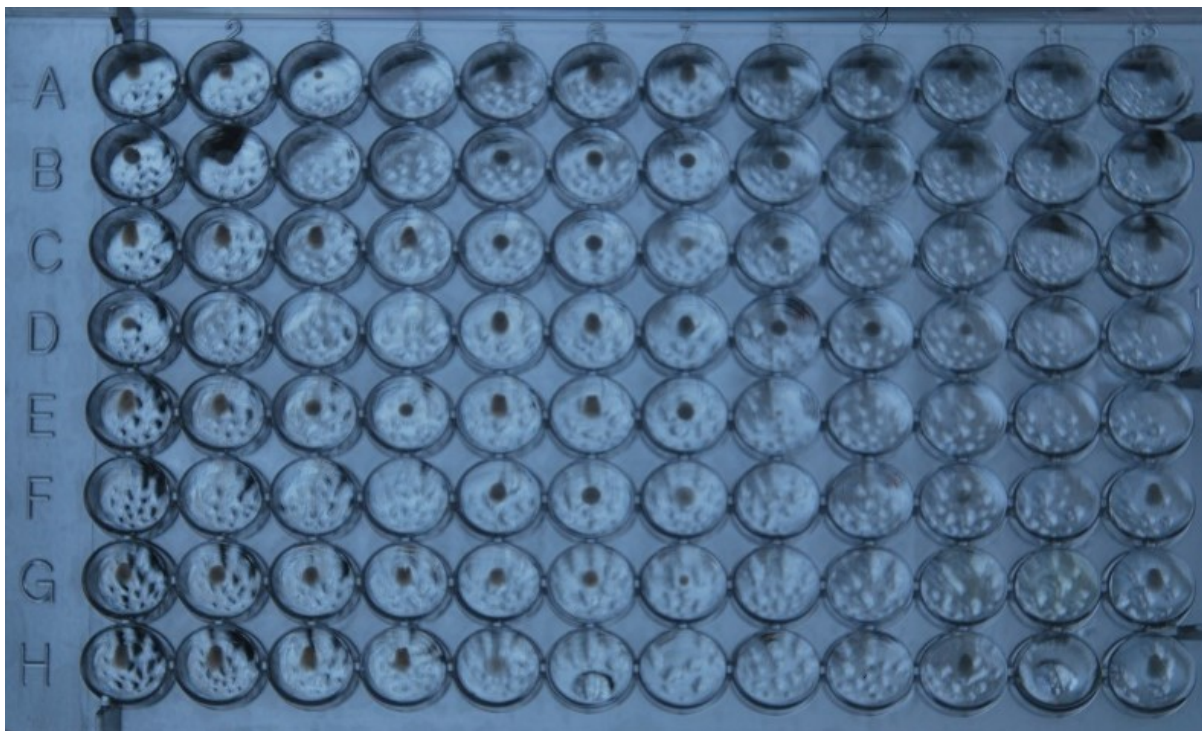


**Slika 12:** Testiranje enterokokov glede odpornosti proti protimikrobnim zdravilom z mikrodilucijsko metodo: inokulacija suspenzije enterokokov z avtomatskim razlivalcem. (foto: M. Golob)

**Figure 12:** Antimicrobial susceptibility testing of enterococci by microdilution method: inoculation of enterococcal suspension with automatic dispenser. (foto: M. Golob)

Po nanosu bakterijske suspenzije smo mikrotitrne plošče pokrili s samolepilno folijo, jih inkubirali aerobno 20–24 h pri 35 °C in nato odčitali rezultate. Pred odčitavanjem smo najprej preverili bakterijsko rast v kontrolnih jamicah, s čimer smo potrdili veljavnost izvedenega testa. Glede na rast bakterije v obliki skupka celic (gumbka) na dnu mikrotitrne jamice ali njegovo odsotnost, smo določili koncentracije MIK za posamezne antibiotike; MIK je predstavljala najmanjša koncentracija antibiotika, ki je še popolnoma zavrla bakterijsko rast (**Slika 13**). V primeru, da pri posameznem antibiotiku na plošči ni bilo vidne rasti, smo kot MIK za ta antibiotik določili vrednost, ki je bila manjša ali enaka najmanjši testirani koncentraciji antibiotika na plošči. Kadar pa smo pri posameznem antibiotiku rast bakterije opazili v vseh jamicah, smo za ta antibiotik kot MIK določili vrednost, večjo od največje testirane koncentracije antibiotika na plošči. Za kontrolo postopka smo uporabili referenčni sev *E. faecalis* ATCC 29212.





**Slika 13:** Mikrodilucijska metoda za določanje minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK): rast bakterij v obliki gumbka na dnu jamice, kjer antibiotik ni preprečil bakterijske rasti. (foto: M. Golob)

**Figure 13:** Microdilution method for determination of the minimum inhibitory concentration (MIC): bacterial growth at the bottom of wells, where antimicrobial did not inhibit bacterial growth. (foto: M. Golob)

Rezultate občutljivosti za protimikrobna zdravila smo interpretirali skladno s standardom EUCAST (EUCAST, 2020a) in priporočili Evropskega referenčnega laboratorija za ugotavljanje odpornosti proti protimikrobnim zdravilom (EU-RL AMR), s katerimi je usklajena tudi direktiva Evropske komisije 2013/652 EU. Pri vsakem izolatu enterokokov smo določili MIK ter opredelili njegovo občutljivost (S; angl. *sensitive*) ali odpornost (R; angl. *resistant*) za testirane antibiotike. Za ta namen smo uporabili standardne epidemiološke mejne vrednosti (angl. *epidemiological cutoff values*, ECOFFs), navedene v **Tabeli 12**. Epidemiološke mejne vrednosti, ki smo jih pri posameznem antibiotiku uporabili za interpretacijo »občutljiv za (S)« in »odporen proti (R)«, so skoraj za vsa testirana protimikrobna zdravila skladne tudi s kliničnimi mejnimi vrednostmi, določenimi v standardu EUCAST (**Tabela 12**). Glede na nabor testiranih antibiotikov v standardu ni podanih kliničnih mejnih vrednosti za eritromicin, gentamicin (razen za dokazovanje odpornosti proti visokim koncentracijam aminoglikozidov), kloramfenikol in tetraciklin.

**Tabela 12:** Epidemiološke mejne vrednosti (ECOFFs), na osnovi katerih smo interpretirali občutljivost posameznih enterokokov za testirane antibiotike, ter klinične mejne vrednosti za enterokoke po podatkih standarda EUCAST.

**Table 12:** Epidemiological cutoff values (ECOFFs), which were used for the interpretation of antimicrobial susceptibility for the tested antimicrobials, and clinical cutoff values for enterococci according to the EUCAST standard.

Antibiotik	ECOFFs			EUCAST	
	MIK (µg/ml) <b>R &gt;</b> <i>E. faecalis</i>	MIK (µg/ml) <b>R &gt;</b> <i>E. faecium</i>	MIK (µg/ml) <b>R &gt;</b> ostali enterokoki	MIK (µg/ml) <b>R &gt;</b>	
ampicilin	4	4	4	8	
ciprofloksacin	4	4	4	4	
daptomicin	4	8	4	NA	upoštevaj ECOFFs
eritromicin	4	4	4	NA	
gentamicin*	32	32	32	128	za testiranje HLAR
kloramfenikol	32	32	32	NA	
kvinuipristin/dalfopristin	IR	4	NA	4	samo za <i>E. faecium</i>
linezolid	4	4	4	4	
teikoplanin	2	2	2	2	
tetraciklin	4	4	4	NA	
tigeciklin	0,5	0,25	0,25	0,25	
vankomicin	4	4	4	4	

R >, odporen sev; enterokoki z MIK, večjim od navedene vrednosti, so odporni proti testiranemu antibiotiku  
IR, primarno odporen (angl. *intrinsically resistant*); izolati *E. faecalis* so primarno odporni proti kvinuipristinu/dalfopristinu

NA, ni na voljo (angl. *not available*)

Za eritromicin, kloramfenikol in tetraciklin v standardu EUCAST ni podanih kliničnih mejnih vrednosti za enterokoke.

\*Gentamicin se uporablja za testiranje enterokokov glede odpornosti proti visoki koncentraciji aminoglikozidnih antibiotikov (HLAR), kjer velja MIK > 128 µg/ml.

### 3.2.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

#### 3.2.4.1 Izolacija DNA iz bakterijskih kultur

Za izolacijo DNA smo uporabili postopek hitre izolacije s segrevanjem. Z bakteriološko zanko smo nekaj kolonij enterokokov iz čistih kultur na KA prenesli v 2 ml-epruvetke (Eppendorf, Nemčija) s 100 µl pufra 1×Tris-EDTA (pufer TE, Sigma-Aldrich, ZDA) ter pripravili bakterijske suspenzije, ki smo jih segrevali 15 min pri 95 °C, nato pa centrifugirali 2 min pri 14.000 g. Supernatant smo uporabili kot matrično DNA za verižno reakcijo s polimerazo (PCR; angl. *polymerase chain reaction*). DNA smo do uporabe shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

### 3.2.4.2 Ugotavljanje genov za virulenčne dejavnike

Pri izolatih eneterokokov smo ugotavljali prisotnost naslednjih genov za virulenčne dejavnike: *ace*, *asa1*, *cylA*, *efaA*, *esp*, *gelE* in *hyl*. Uporabili smo dva testa PCR, s katerima smo hkrati ugotavljali pet (*asa1*, *cylA*, *esp*, *gelE*, *hyl*; PCR 1, opis v poglavju 3.2.4.2.1) oziroma dva (*ace*, *efaA*; PCR 2, opis v poglavju 3.2.4.2.2) gena za virulenčne dejavnike.

Reakcijske mešanice PCR smo pripravili tako, da so za en vzorec vsebovale 12,5 µl reagenta 2× Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Nemčija), 7,5 µl vode (Ultra Pure Distilled Water, Invitrogen, Velika Britanija), 2,5 µl 10-kratne mešanice začetnih oligonukleotidov (Sigma-Aldrich, ZDA) in 2,5 µl izolirane DNA do skupnega volumna 25 µl.

#### 3.2.4.2.1 PCR 1: geni *asa1*, *cylA*, *esp*, *gelE* in *hyl*

Zaporedja začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili za potrditev genov *asa1*, *cylA*, *esp*, *gelE* in *hyl* smo povzeli po članku Vankerhoven in sod. (2004) (Tabela 13), sestavo reakcijske mešanice in program pomnoževanja pa smo optimizirali v laboratoriju. Pripravili smo 10-kratno mešanico začetnih oligonukleotidov, ki je vsebovala 1 µM vsakega začetnega oligonukleotida za gene *asa1* (ASA11, ASA12), *gelE* (GEL11, GEL12) in *hyl* (HYL n1, HLY n2) ter 2 µM za gena *cylA* (CYT I, CYT IIb) in *esp* (ESP14F, ESP12R).

Kot pozitivno kontrolo postopka smo uporabili dva izolata bakterije *E. faecalis*: izolat F4/IM270 (iz zbirke IMPL BF) je predstavljal pozitivno kontrolo za gene *asa1*, *cylA*, *esp* in *gelE*, izolat EK QA 11.6./17 (iz medlaboratorijske kontrole EURL AMR; EQAS 2017) pa pozitivno kontrolo za gen *hyl*. Za negativno kontrolo smo uporabili sterilno destilirano vodo.

**Tabela 13:** Zaporedja začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili za določanje genov *asa1*, *cylA*, *esp*, *gelE* in *hyl* v reakciji PCR 1 in pričakovana velikost pomnoženih odsekov DNA.

**Table 13:** Primers used for determination of *asa1*, *cylA*, *esp*, *gelE* and *hyl* genes in PCR 1 reaction and the expected PCR product sizes.

Gen	Začetni oligonukleotid		Velikost pomnoženega odseka DNA [bp]
	Oznaka	Nukleotidno zaporedje 5' → 3'	
<i>asa1</i>	ASA 11	GCACGCTATTACGAACTATGA	375
	ASA 12	TAAGAAAGAACATCACCACGA	
<i>cylA</i>	CYT I	ACTCGGGGATTGATAGGC	688
	CYT IIb	GCTGCTAAAGCTGCGCTT	
<i>esp</i>	ESP 14F	AGATTCATCTTTGATTCTTGG	510
	ESP 12R	AATTGATTCTTTAGCATCTGG	
<i>gelE</i>	GEL 11	TATGACAATGCTTTTTGGGAT	213
	GEL 12	AGATGCACCCGAAATAATATA	
<i>hyl</i>	HYL n1	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG	276
	HYL n2	GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	

Pomnoževanje DNA je potekalo v PCR-pomnoževalnikih GeneAmp PCR System AB2700 (Applied Biosystems, ZDA), Veriti (Applied Biosystems, ZDA) in ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific, ZDA) po programu, ki je naveden v **Tabeli 14**.

**Tabela 14:** Program pomnoževanja DNA za ugotavljanje genov *asaI*, *cylA*, *esp*, *gelE* in *hyl* v reakciji PCR 1.  
**Table 14:** DNA amplification program for detection of *asaI*, *cylA*, *esp*, *gelE* and *hyl* genes in PCR 1 reaction.

Korak	T [°C]	Čas
aktivacija DNA-polimeraze	95	15 min
30-krat	denaturacija	94
	prileganje začetnih oligonukleotidov	56
	podaljševanje verige	72
končno podaljševanje verige	72	10 min
zaustavitev reakcije	10	∞

#### 3.2.4.2.2 PCR 2: gena *ace* in *efaA*

Zaporedja začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili za potrditev genov *ace* in *efaA* smo povzeli po članku Martin-Platero in sod. (2009) (**Tabela 15**), sestavo reakcijske mešanice in program pomnoževanja pa smo optimizirali v laboratoriju. Pripravili smo 10-kratno mešanico začetnih oligonukleotidov, ki je vsebovala 2  $\mu$ M vsakega začetnega oligonukleotida za gena *ace* (ACE-F, ACE-R) in *efaA* (EFA-AF, EFA-AR).

Kot pozitivno kontrolo postopka smo uporabili enega izmed dveh izolatov (EK QA 11.2/17, EK QA 11.3/17) bakterije *E. faecalis* iz medlaboratorijske kontrole (EQAS 2017), ki sta nosilca genov *ace* in *efaA*. Za negativno kontrolo smo uporabili sterilno destilirano vodo.

**Tabela 15:** Zaporedja začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili za določanje genov *ace* in *efaA* v reakciji PCR 2 in pričakovana velikost pomnoženih odsekov DNA.

**Table 15:** Primers used for determination of *ace* and *efaA* genes in PCR 2 reaction and the expected PCR product sizes.

Gen	Oznaka	Začetni oligonukleotid	Velikost pomnoženega odseka DNA [bp]
		Nukleotidno zaporedje 5' → 3'	
<i>ace</i>	ACE-F	GAATTGAGCAAAAAGTTCAATCG	1008
	ACE-R	GTCTGTCTTTTCACTTGTTTC	
<i>efaA</i>	EFA-AF	GCCAATTGGGACAGACCCTC	688
	EFA-AR	CGCCTTCTGTTCCTTCTTTGGC	

Pomnoževanje DNA je potekalo v enem izmed treh PCR-pomnoževalnikih GeneAmp PCR System AB2700 (Applied Biosystems, ZDA), Veriti (Applied Biosystems, ZDA) ali ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific, ZDA) po programu, ki je naveden v **Tabeli 16**.

**Tabela 16:** Program pomnoževanja DNA za ugotavljanje genov *ace* in *efaA* v reakciji PCR 2.

**Table 16:** DNA amplification program for detection of *ace* and *efaA* genes in PCR 2 reaction.

Korak	T [°C]	Čas	
aktivacija DNA-polimeraze	95	15 min	
30-krat	denaturacija	94	30 sec
	prileganje začetnih oligonukleotidov	55	90 sec
	podaljševanje verige	72	90 sec
končno podaljševanje verige	72	10 min	
zaustavitev reakcije	10	∞	

### 3.2.4.3 Ugotavljanje genov za odpornost proti vankomicinu

Pri izolatih, ki so fenotipsko izkazovali odpornost proti vankomicinu, smo z metodo PCR ugotavljali prisotnost genov *vanA* in *vanB*. Reakcijsko mešanico PCR smo pripravili tako, da je za en vzorec vsebovala 12,5 µl reagenta 2× Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Nemčija), 7,5 µl vode (Ultra Pure Distilled Water, Invitrogen, Velika Britanija), 2,5 µl 10-kratne mešanice začetnih oligonukleotidov (Sigma-Aldrich, ZDA) in 2,5 µl izolirane DNA do skupnega volumna 25 µl.

Zaporedja začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili za potrditev genov *vanA* in *vanB* smo povzeli po članku Martin-Platero in sod. (2009) (Tabela 17), sestavo reakcijske mešanice in program pomnoževanja pa smo optimizirali v laboratoriju. Pripravili smo 10-kratno mešanico začetnih oligonukleotidov, ki je vsebovala 2 µM vsakega začetnega oligonukleotida za gena *vanA* (VAN-AF, VAN-AR) in *vanB* (VAN-BF, VAN-BR).

Kot pozitivni kontroli postopka smo uporabili dva izolata bakterije *E. faecium*: izolat IMI 1001/13 iz zbirke Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete UL, ki ima gen *vanA*, ter izolat ATCC 51299, ki ima gen *vanB*. Kot negativno kontrolo smo uporabili sterilno destilirano vodo.

**Tabela 17:** Zaporedja začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili za določanje genov *vanA* in *vanB* v reakciji PCR in pričakovana velikost pomnoženih odsekov DNA.

**Table 17:** Primers used for determination of *vanA* and *vanB* genes in PCR reaction and the expected PCR product sizes.

Gen	Začetni oligonukleotid		Velikost pomnoženega odseka DNA [bp]
	Oznaka	Nukleotidno zaporedje 5' → 3'	
<i>vanA</i>	VAN-AF	TCTGCAATAGAGATAGCCGC	377
	VAN-AR	GGAGTAGCTATCCCAGCATT	
<i>vanB</i>	VAN-BF	GCTCCGCAGCCTGCATGGACA	529
	VAN-BR	ACGATGCCGCCATCCTCCTGC	

Pomnoževanje DNA je potekalo v PCR pomnoževalniku Veriti (Applied Biosystems, ZDA) po programu, ki je naveden v Tabeli 18.

**Tabela 18:** Program pomnoževanja DNA za ugotavljanje genov *vanA* in *vanB* v reakciji PCR.

**Table 18:** DNA amplification program for detection of *vanA* and *vanB* genes in PCR reaction.

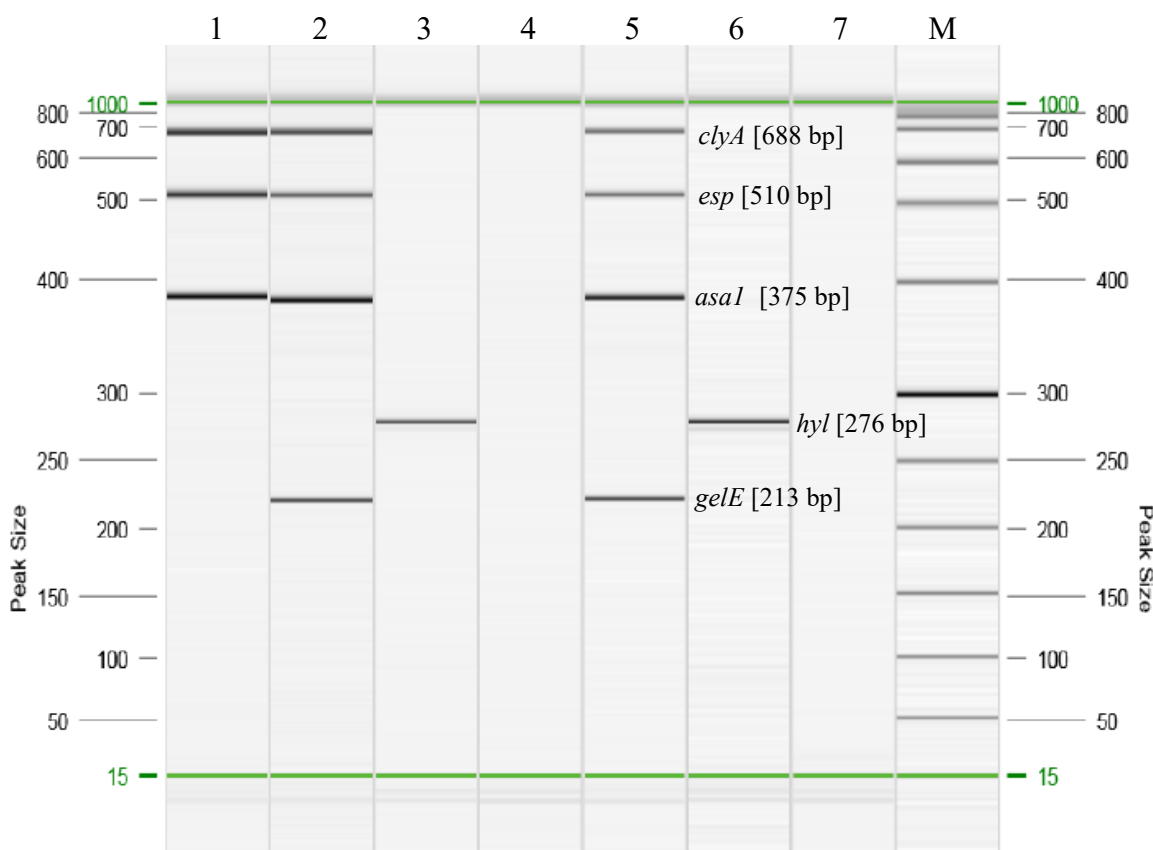
Korak		T [°C]	Čas
aktivacija DNA-polimeraze		95	15 min
30-krat	denaturacija	94	30 sec
	prileganje začetnih oligonukleotidov	55	90 sec
	podaljševanje verige	72	90 sec
končno podaljševanje verige		72	10 min
zaustavitev reakcije		10	∞

#### 3.2.4.4 Analiza pomnoženih odsekov DNA

Pomnožene odseke DNA smo analizirali s kapilarno elektroforezo QIAxcel (Qiagen, Nemčija) in kompletom QIAxcel DNA High Resolution kit (Qiagen, Nemčija). Za analizo pomnoženih odsekov DNA genov *asaI*, *cylA*, *esp*, *gelE* in *hyl* (PCR 1) ter pomnoženih odsekov DNA genov *vanA* in *vanB* smo uporabili velikostni standard QX Size Marker 50–800 bp in poravnalni standard QX Alignment Marker 15–1000 bp. Za analizo pomnoženih odsekov DNA genov *ace* in *efaA* (PCR 2) pa smo uporabili velikostni standard QX Size Marker 50–1500 bp in poravnalni standard QX Alignment Marker 15–3000 bp; vsi standardi so bili od proizvajalca Qiagen (Nemčija).

Pridobljene rezultate smo analizirali s pripadajočo programsko opremo. Velikost pomnoženih odsekov DNA smo določili tako, da smo primerjali njihovo lego glede na pozitivne kontrole ter njihovo velikost. Pričakovane velikosti (bp) ugotavljanih genov za virulenčne dejavnike in genov za odpornost proti vankomicinu so zbrane v **Tabelah 13, 15 in 17**. Odsotnost pomnoženih odsekov DNA ustrezne velikosti smo ovrednotili kot negativen rezultat za analiziran gen.

Na **Sliki 14** so prikazani rezultati reakcije PCR 1 za ugotavljanje genov *asaI*, *cylA*, *esp*, *gelE* in *hyl* pri posameznih izolatih enterokokov (stolpci 1–4), pozitivni kontroli *E. faecalis* (stolpca 5 in 6), negativna kontrola (stolpec 7) ter velikostni standard 50–800 bp (stolpec M).



**Slika 14:** Prikaz rezultatov pomnoževanja genov *asal*, *clyA*, *esp*, *gelE* in *hyl* s kapilarno elektroforezo QIAxcel.  
**Figure 14:** Example of QIAxcel capillary electrophoresis results for *asal*, *clyA*, *esp*, *gelE* and *hyl* genes.

### 3.2.5 Test tvorbe biofilma na mikrotitrskih ploščah

#### 3.2.5.1 Izbor enterokokov za testiranje filmotvornosti

Sposobnost tvorbe biofilma na mikrotitrskih ploščicah smo določili za 92 izolatov, izbranih na osnovi prisotnosti genov za površinske adhezine (*ace*, *asal* in *esp*), ki imajo pomembno vlogo v prvi fazi nastanka biofilma. Za testiranje smo izbrali 76 izolatov *E. faecalis*, 12 izolatov *E. faecium* ter po dva izolata *E. hirae* in *E. mundtii* različnih virulenčnih tipov. Izolati so izvirali iz različnih kliničnih vzorcev ljudi ( $n = 21$ ; 13 iz urina, 6 iz hemokulture in 2 vaginalna brisa) in živali ( $n = 22$ ; 11 iz urina, 3 iz brisov rane, 3 iz mastitičnega mleka, 2 iz punktata trebušne votline, 2 iz brisa sluhovoda in en iz pljuč). Poleg tega smo testirali tudi izolate iz živil živalskega izvora ( $n = 32$ ; 5 izolatov iz piščančjega mesa, 10 iz svinjine, 6 iz govedine, 8 iz mleka in mlečnih izdelkov ter 3 izolate iz školjk), izolate iz fecesa zdravih živali ( $n = 5$ ; en izolat iz fecesa piščancev in 4 iz fecesa prašičev) ter izolate iz živilsko predelovalne industrije ( $n = 12$ ; 6 izolatov iz perutninske in 6 izolatov iz prašičje klavnice). Podatki o izbranih izolatih so navedeni v **Prilogi 1**.

### 3.2.5.2 Postopek testiranja

Izbrane izolate enterokokov smo iz kroglic, shranjenih pri  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , oživelili na KA ter nato precepili v 10 ml bujona TSB (Tryptic Soy Broth, Biolife, Italija) z dodano 1 % glukozo (Kemika, Hrvaška) ter inkubirali 24 h pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po inkubaciji smo 100  $\mu\text{l}$  bakterijske suspenzije prenesli v 10 ml svežega triptoznega sojinega bujona (TSB) z glukozo, s čimer smo dosegli primerno gostoto bakterij za inokulacijo na mikrotitrne plošče. Sposobnost tvorbe biofilma smo določali po predhodno opisanem protokolu z nekaj prilagoditvami (Stepanović in sod., 2007).

Za test filmotvornosti smo uporabili sterilne mikrotitrne ploščice s 96 jamicami, ravnim dnom in pokrovom, ki se uporabljajo za celične kulture (Tissue Culture Testplate 96F, TPP, Švica). Suspenzijo enterokokov smo najprej dobro homogenizirali na električnem mešalcu, nato pa s pipeto prenesli po 200  $\mu\text{l}$  suspenzije posameznega izolata v štiri jamice mikrotitrne ploščice. Kot negativno kontrolo smo v zadnje štiri jamice nanесли enako količino (200  $\mu\text{l}$ ) sterilnega medija TSB z glukozo. Izbrani sistem nanašanja nam je tako omogočil testiranje 23 vzorcev na eni ploščici. Po končanem nanosu smo mikrotitrne ploščice pokrili, za zmanjšanje izhlapevanja dodatno zavili v folijo ter inkubirali 24 h pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  v aerobnih pogojih.

Poskus smo izvedli v dveh bioloških ponovitvah. Po inkubaciji smo vsebino mikrotitrne ploščice odlili ter jamice trikrat sprali z 250  $\mu\text{l}$  sterilnega fosfatnega pufra (Phosphate Buffered Saline, PBS) s pH 7,2. Sestava in priprava PBS sta opisani v **Tabeli 19**.

**Tabela 19:** Sestava in priprava fosfatnega pufra (PBS) za spiranje mikrotitrskih ploščic.

**Table 19:** Composition and preparation of Phosphate Buffered Saline (PBS) for microtiter plate washing.

Sestava fosfatnega pufra (PBS)	Količina [g/l]
NaCl (Merck, Nemčija)	8
KCl (Kemika, Hrvaška)	0,2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck, Nemčija)	1,42
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kemika, Hrvaška)	0,24

Sestavine smo raztopili v litru destilirane vode, avtoklavirali 15 minut pri  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  ter umerili pH na 7,2.

Po končanem spiranju smo mikrotitrne ploščice sušili pol ure pri  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ko so bile ploščice popolnoma suhe, smo v vsako jamico nanесли po 150  $\mu\text{l}$  kristal vijoličnega barvila (Sigma-Aldrich, ZDA) ter barvali 15 min. Barvilo smo nato previdno odpipetirali iz jamic, mikrotitrne ploščice pa štirikrat sprali z navadno vodo, da smo odstranili nevezano barvilo. Po spiranju smo ploščice ponovno posušili, nato pa v vsako jamico dodali po 150  $\mu\text{l}$  96 % etanola (Merck, Nemčija), s čimer smo sprostili vezano barvilo. Po 30-min inkubaciji (brez tresenja) pri sobni temperaturi smo z avtomatskim čitalcem (EL808, Bio-Tek Instruments, ZDA) pri 540 nm valovne dolžine ( $\text{OD}_{540}$ ) izmerili vrednosti absorbance kristal vijoličnega v raztopini.



### 3.2.5.3 Interpretacija rezultatov

Pri interpretaciji rezultatov smo upoštevali priporočila Stepanovića in sod. (2007), tako da smo rezultat izrazili kot številčno vrednost ter izračunali povprečje vseh izmerjenih absorbanc za posamezen izolat. Enako smo storili tudi pri negativni kontroli, ki jo je predstavljal neinokuliran pufer TSB z glukozo. Določili smo mejno vrednost (OD<sub>c</sub>, angl. *optical density cutt-off value*), na osnovi katere smo lahko ločili filmotvorne izolate od nefilmotvornih. Vrednost OD<sub>c</sub> smo izračunali za vsako mikrotitrsko ploščico posebej, opredelili pa smo jo kot vsoto povprečne vrednosti OD<sub>540</sub> negativne kontrole in trikratne standardne deviacije (SD) negativne kontrole. Končno vrednost OD za posamezen testirani izolat smo izrazili kot razliko povprečne vrednosti OD izolata in vrednosti OD<sub>c</sub>.

Za lažjo interpretacijo rezultatov smo glede na izmerjene vrednosti absorbance izolate enterokokov razdelili v štiri skupine (Stepanović in sod., 2000), kot je prikazano v **Tabeli 20**. V tem primeru smo upoštevali samo povprečno vrednost OD<sub>540</sub> posameznega izolata (brez odštete OD<sub>c</sub> vrednosti; Stepanović in sod., 2007).

**Tabela 20:** Razporeditev enterokokov glede na možnost tvorbe biofilmov v mikrotitrskih ploščicah; povzeto po Stepanović in sod. (2000).

**Table 20:** Distribution of enterococci according to the ability of biofilm formation in microtiter plates; adopted from Stepanović et al. (2000).

Kategorija izolatov		Kriterij
N ( <i>no biofilm producer</i> )	izolati, ki ne tvorijo biofilma	$OD_{540} \leq OD_c$
W ( <i>weak biofilm producer</i> )	šibki tvorci biofilma	$OD_c < OD_{540} \leq 2 \times OD_c$
M ( <i>moderate biofilm producer</i> )	zmerno močni tvorci biofilma	$2 \times OD_c < OD_{540} \leq 4 \times OD_c$
S ( <i>strong biofilm producer</i> )	močni tvorci biofilma	$4 \times OD_c < OD_{540}$

OD<sub>540</sub>, povprečna vrednost absorbance; OD<sub>c</sub>, mejna vrednost, na osnovi katere smo ločili filmotvorne izolate od nefilmotvornih.

### 3.2.6 Statistične analize

Podatke smo analizirali s pomočjo programa Microsoft Excel (Microsoft Corp., ZDA). Za statistično primerjavo zastopanosti fenotipske odpornosti in determinant virulence med 854 izolati iz kliničnih vzorcev in nekliničnimi izolati (torej vsi izolati iz hrane in okolja) smo uporabili test hi-kvadrat za neodvisnost (angl. *Pearson's Chi-squared test*) in Fisherjev natančni test (angl. *Fisher's exact test*). Slednjega smo uporabili, ko je bila pričakovana frekvenca < 5. Za oba testa smo uporabili program R 3.6.2. Z uporabljenimi statističnimi testi smo ovrednotili medsebojno povezanost preučevanih spremenljivk ter ugotavljali statistično značilne razlike med skupinama vzorcev. Kot statistično značilne smo privzeli vse rezultate z vrednostjo  $p < 0,05$ .

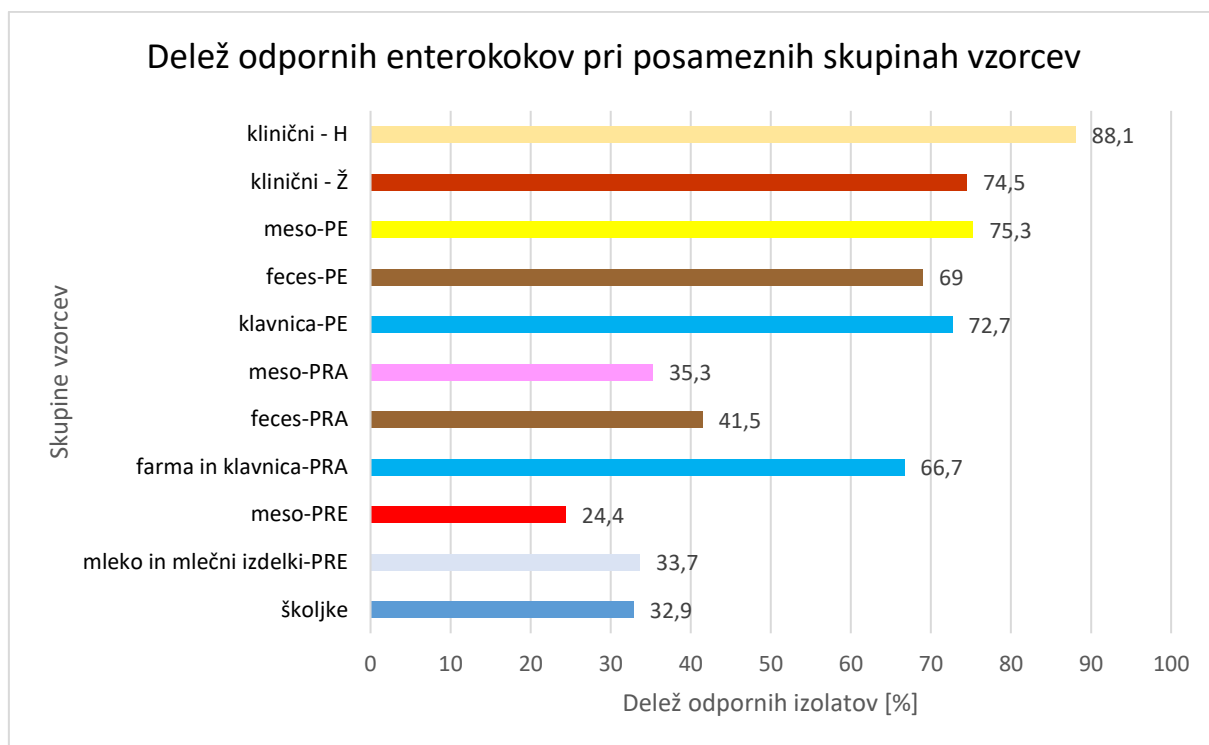
Za podatke, ki smo jih pridobili pri testiranju 92 izolatov enterokokov na njihovo sposobnost tvorbe biofilma, smo statistično analizo izvedli s programom GraphPad Prism v8.0.2

(GraphPad Software, ZDA). Za potrebe statistične primerjave filmotvornosti izolatov smo izolate razvrstili v primerjane skupine glede na prisotnost oz. odsotnost genov, ki so znano udeleženi v tvorbi biofilma (*ace*, *asaI* in *esp*). Normalnost porazdelitve smo analizirali s testom Shapiro-Wilk. Ker podatki niso bili normalno porazdeljeni, smo za primerjavo skupin uporabili neparametrični test Mann-Whitney, pri čemer smo kot statistično značilne privzeli vse rezultate z vrednostjo  $p < 0,05$ . Podatke smo grafično prikazali kot grafikone kvantilov (angl. *box plot*).

## 4 REZULTATI

Med 854 testiranimi enterokoki, ki so pripadali 16 različnim vrstam, smo največji delež odpornosti proti protimikrobnim zdravilom ugotovili proti tetraciklinu (43,3 %), eritromicinu (25,4 %) in ciprofloksacinu (10,0 %). Tudi pri ostalih testiranih antibiotikih smo ugotovili zmanjšano občutljivost enterokokov, vendar je bil delež odpornih izolatov pri njih pod 10 %, proti daptomicinu in linezolidu celo pod 1 % (Tabela 21).

Delež izolatov, ki so bili odporni proti najmanj enemu izmed testiranih antibiotikov, se je med posameznimi skupinami precej razlikoval. Največji delež odpornosti smo ugotovili pri enterokokih iz kliničnih vzorcev ljudi in živali, mesa piščancev in perutninske klavnice. Najmanj odpornih enterokokov smo izolirali iz govejega mesa (Slika 15).

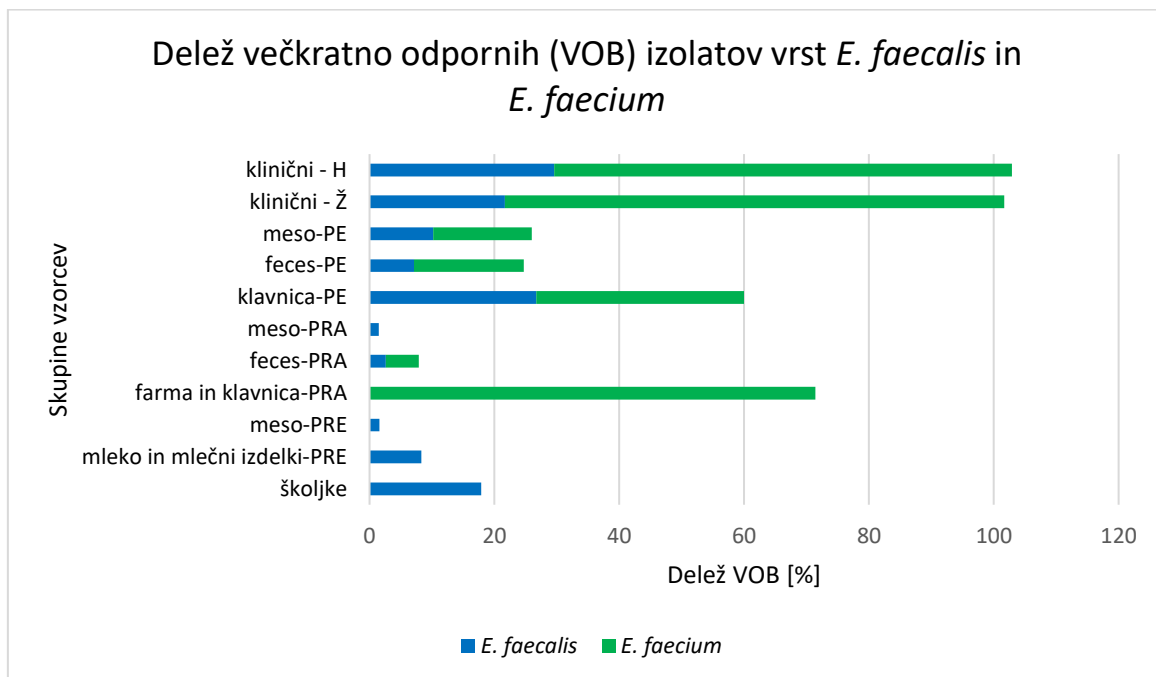


Legenda: H, humani klinični vzorci; Ž, klinični vzorci živali; PE, perutnina (piščanci); PRA, prašiči; PRE, prežvekovalci (prevladuje govedo).

Slika 15: Delež odpornih enterokokov pri posameznih skupinah vzorcev.

Figure 15: Proportion of resistant enterococcal isolates from individual groups of samples.

Največ večkratno odpornih enterokokov (VOB), ki so izkazovali odpornost proti najmanj trem skupinam antibiotikov hkrati, smo zaznali pri vrstah *E. faecium* in *E. faecalis*. Večkratno odporna sta bila tudi izolat vrste *E. avium* iz fecesa prašičev ter izolat vrste *E. hirae* iz fecesa piščancev. Glede na izvor izolatov smo največ večkratno odpornih enterokokov ugotovili pri kliničnih vzorcih ljudi in živali. Visok delež VOB smo ugotovili tudi pri vzorcih vzdolž prehranske verige (na perutninski klavnici ter prašičji farmi in klavnici), medtem ko je bil najnižji delež VOB v vzorcih rdečega mesa (meso prašičev in goved) (Slika 16).



Legenda: H, humani klinični vzorci; Ž, klinični vzorci živali; PE, perutnina (piščanci); PRA, prašiči; PRE, prežvekovalci (prevladuje govedo); VOB, večkratno odporni enterokoki.

**Slika 16:** Delež večkratno odpornih (VOB) enterokokov pri posameznih skupinah vzorcev.

**Figure 16:** Proportion of multidrug resistant (MDR) enterococcal isolates from individual groups of samples.

Glede na posamezne vrste enterokokov smo največ odpornih izolatov ugotovili pri vrstah *E. faecalis* in *E. faecium*, pri vrstah *E. canis*, *E. devriesei* in *E. mundtii* pa odpornih izolatov nismo odkrili. Pregled odpornih enterokokov po posameznih vrstah glede na testirane antibiotike je prikazan v **Tabeli 21**.

Največji delež odpornosti pri izolatih vrste *E. faecalis*, ne glede na njihov izvor, smo ugotovili proti tetraciklinu in eritromicinu. Delež odpornosti proti tetraciklinu je bil od 25,0 % pri izolatih iz govedine do 78,9 % pri humanih kliničnih izolatih. Delež odpornosti proti eritromicinu pa je bil od 2,9 % pri izolatih iz svinjine do 49,2 % pri izolatih iz mesa piščancev. Izjema so bili vzorci s prašičje farme in klavnice, pri katerih nismo ugotovili odpornih izolatov vrste *E. faecalis*. Pri določenih skupinah vzorcev smo ugotovili odpornost proti ampicilinu (približno 2 % pri humanih kliničnih izolatih ter izolatih iz mesa in fecesa piščancev), proti linezolidu (približno 2 % pri izolatih iz govedine in mleka) ter proti tigeciklinu (1,5 % pri izolatih iz svinjine). Proti vankomicinu odpornih izolatov vrste *E. faecalis* nismo ugotovili pri nobeni skupini vzorcev (**Slika 17**).

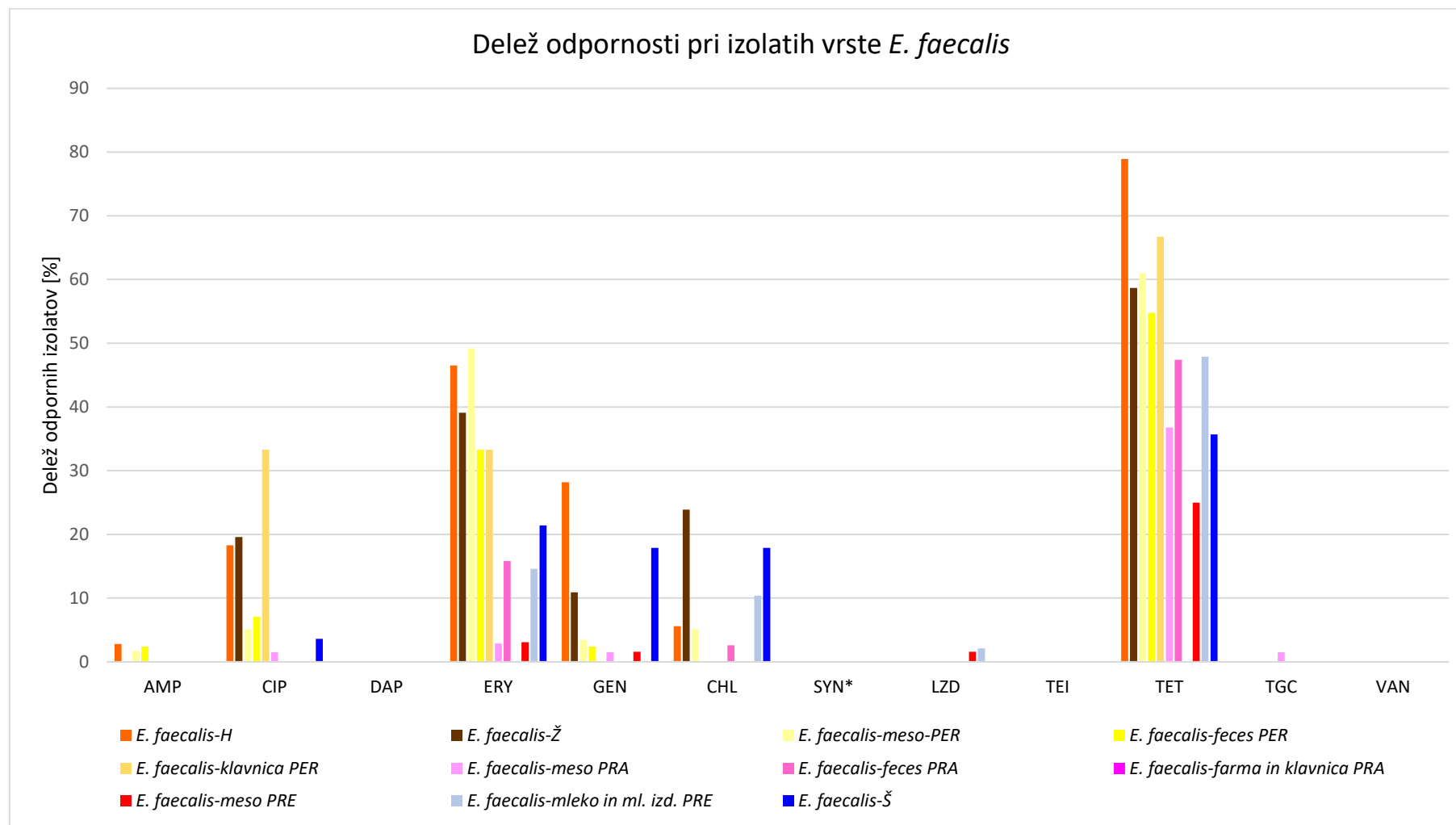
Pri izolatih vrste *E. faecium* smo največji delež odpornosti ugotovili proti tetraciklinu, eritromicinu in ampicilinu, vendar se je delež odpornih izolatov precej razlikoval med posameznimi skupinami vzorcev. Pri izolatih iz svinjine odpornosti proti tem antibiotikom nismo ugotovili. V nasprotju z izolati vrste *E. faecalis*, smo pri vrsti *E. faecium* ugotovili proti vankomicinu odporne izolate, in sicer pri kliničnih vzorcih živali in vzorcih perutnine. Vsi izolati vrste *E. faecium* pa so bili dobro občutljivi za daptomicin in linezolid (**Slika 18**).

**Tabela 21:** Število in delež odpornih enterokokov pri posameznih vrstah za vse testirane izolate ( $n = 854$ ).

**Table 21:** Number and proportion of resistant enterococci according to species for all the tested isolates ( $n = 854$ ).

	AMP	CIP	DAP	ERY	GEN	CHL	SYN*	LZD	TEI	TET	TGC	VAN
<i>E. faecalis</i> ( $n = 487$ )	4	35	0	122	34	29	IR	2	0	244	0	0
<i>E. faecium</i> ( $n = 214$ )	66	44	0	80	25	2	34	0	10	69	13	10
<i>E. hirae</i> ( $n = 71$ )	0	2	3	6	0	0	-	0	0	23	1	0
<i>E. cecorum</i> ( $n = 25$ )	0	2	0	5	0	0	-	0	0	21	0	0
<i>E. durans</i> ( $n = 16$ )	0	0	0	1	0	0	-	0	0	3	1	0
<i>E. casseliflavus</i> ** ( $n = 14$ )	0	0	0	0	0	0	-	0	0	1	0	IR
<i>E. gallinarum</i> ** ( $n = 4$ )	0	2	0	1	0	0	-	0	0	4	0	IR
<i>E. gilvus</i> ( $n = 4$ )	0	0	0	0	0	0	-	0	0	2	0	0
<i>E. italicus</i> ( $n = 3$ )	0	0	0	0	0	0	-	0	0	1	0	0
<i>E. malodoratus</i> ( $n = 3$ )	2	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0
<i>E. mundtii</i> ( $n = 3$ )	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0
<i>E. avium</i> ( $n = 2$ )	1	0	0	1	0	0	-	0	0	1	0	0
<i>E. canitestini</i> ( $n = 2$ )	0	0	0	1	0	0	-	0	0	0	0	0
<i>E. canis</i> ( $n = 1$ )	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0
<i>E. devriesei</i> ( $n = 1$ )	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0
<i>E. thailandicus</i> ( $n = 1$ )	0	0	0	0	0	0	-	0	0	1	0	0
število odpornih izolatov	73	85	3	217	59	31		2	10	370	15	10
(%)	(8,5)	(10)	(0,4)	(25,4)	(6,9)	(3,6)		(0,2)	(1,2)	(43,3)	(1,8)	(1,2)

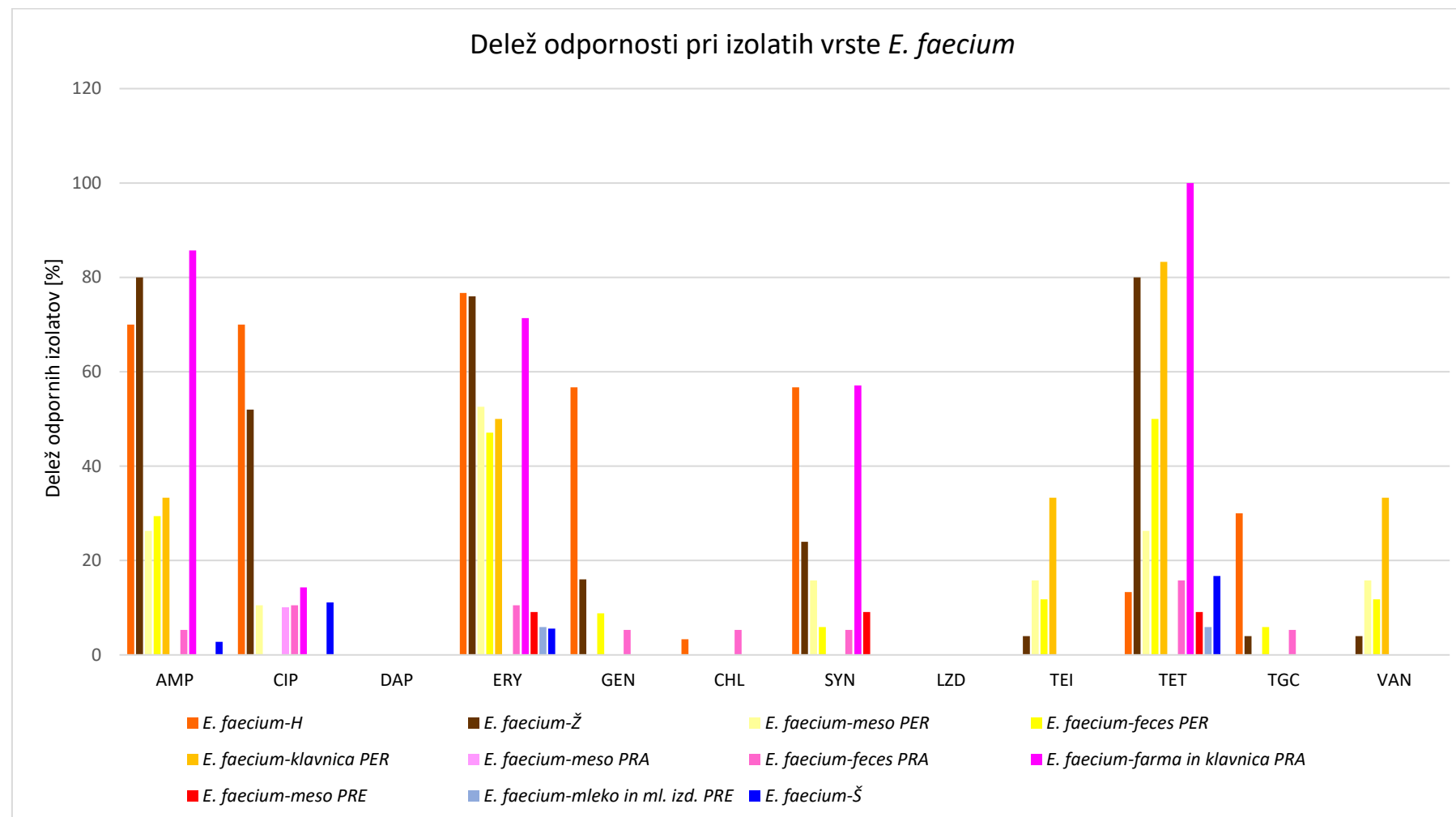
Legenda: AMP, ampicilin; CIP, ciprofloksacin; DAP, daptomicin; ERY, eritromicin; GEN, gentamicin; CHL, kloramfenikol; SYN, kvinupristin/dalfopristin; LZD, linezolid; TEI, teikoplanin; TET, tetraciklin; TGC, tigeciklin; VAN, vankomicin; \* Izolati *E. faecalis* so primarno odporni (IR, angl. *intrinsically resistant*) proti SYN. \*\*Izolati vrst *E. casseliflavus* in *E. gallinarum* so primarno odporni proti vankomicinu. Epidemiološka mejna vrednost za ta antibiotik je določena samo za vrsto *E. faecium*, medtem ko za ostale enterokoce ni na voljo.



Legenda: AMP, ampicillin; CIP, ciprofloksacin; DAP, daptomicin; ERY, eritromicin; GEN, gentamicin; CHL, kloramfenikol; SYN, kvinupristin/dalfopristin; LZD, linezolid; TEI, teikoplanin; TET, tetraciklin; TGC, tigeciklin; VAN, vankomicin; H, humani klinični vzorci; Ž, klinični vzorci živali; PE, perutnina (piščanci); PRA, prašiči; PRE, prežvekovalci (prevladuje govedo); Š, školjke; \* Izolati *E. faecalis* so primarno odporni proti SYN, zato niso prikazani.

**Slika 17:** Delež odpornosti pri izolatih vrste *E. faecalis* pri posameznih skupinah vzorcev.

**Figure 17:** Percentage of resistance in *E. faecalis* isolates from individual groups of samples.

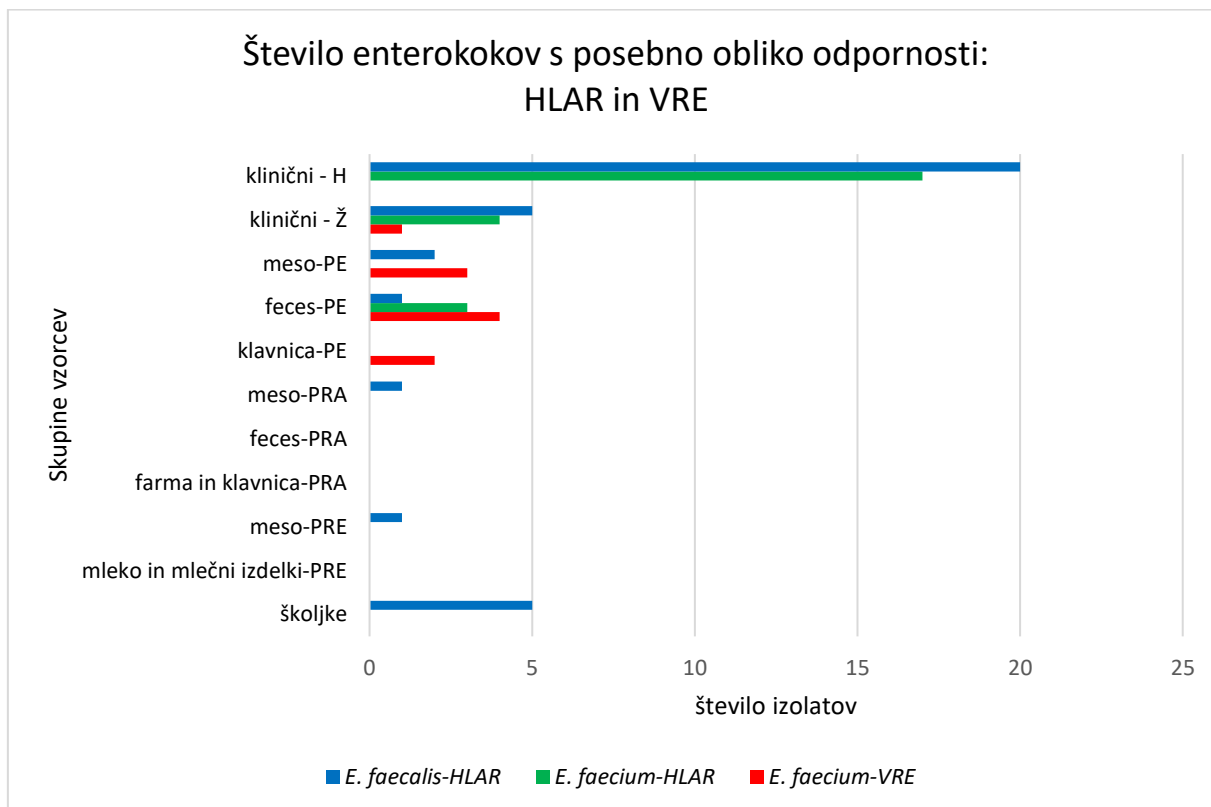


Legenda: AMP, ampicillin; CIP, ciprofloksacin; DAP, daptomicin; ERY, eritromicin; GEN, gentamicin; CHL, kloramfenikol; SYN, kvinupristin/dalfopristin; LZD, linezolid; TEI, teikoplanin; TET, tetraciklin; TGC, tigeciklin; VAN, vankomicin; H, humani klinični vzorci; Ž, klinični vzorci živali; PE, perutnina (piščanci); PRA, prašiči; PRE, prežvekovalci (prevladuje govedo); Š, školjke.

**Slika 18:** Delež odpornosti pri izolatih vrste *E. faecium* pri posameznih skupinah vzorcev.

**Figure 18:** Percentage of resistance in *E. faecium* isolates from individual groups of samples.

V skupini enterokokov s posebnim vzorcem odpornosti smo fenotipsko in genotipsko potrdili odpornost proti vankomicinu (VRE) pri 10 (1,2 %) izolatih vrste *E. faecium*; devet smo jih izolirali iz mesa in fecesa piščancev ter okoljskih vzorcev na perutninski klavnici, enega pa iz vzorca hemokulture psa (Slika 19). Na osnovi visoke vrednosti MIK za gentamicin pa smo v skupino HLAR uvrstili 59 (6,9 %) izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* (Slika 19).



Legenda: H, humani klinični vzorci; Ž, klinični vzorci živali; PE, perutnina (piščanci); PRA, prašiči; PRE, prežvekovalci (prevladuje govedo); HLAR, enterokoki, odporni proti visokim koncentracijam aminoglikozidov; VRE, proti vankomicinu odporni enterokoki.

**Slika 19:** Število enterokokov, odpornih proti visokim koncentracijam aminoglikozidov (HLAR), in proti vankomicinu odporni enterokoki (VRE) pri posameznih skupinah vzorcev.

**Figure 19:** Number of high-level resistant enterococci (HLAR) and vancomycin-resistant enterococci (VRE) from individual groups of samples.

Vseh 854 enterokokov smo testirali tudi glede prisotnosti genov za virulenčne dejavnike. Ugotovili smo jih pri štirih vrstah: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* in *E. mundtii*. Pri izolatih vrst *E. faecalis* in *E. faecium* smo ugotovili prisotnost vseh sedmih iskanih genov, medtem ko smo pri izolatih vrste *E. hirae* ugotovili le gene *ace*, *asa1* in *efaA*, pri izolatih vrste *E. mundtii* pa gene *ace*, *efaA* in *gelE*. Pri nobenem izolatu nismo hkrati ugotovili vseh sedem genov za virulenčne dejavnike.

Največ genov smo ugotovili pri izolatih vrste *E. faecalis*, ki so bili najpogosteje nosilci genov *efaA*, *gelE* in *ace*. Število in delež genov pri posameznih vrstah enterokokov sta prikazana v **Tabeli 22**.



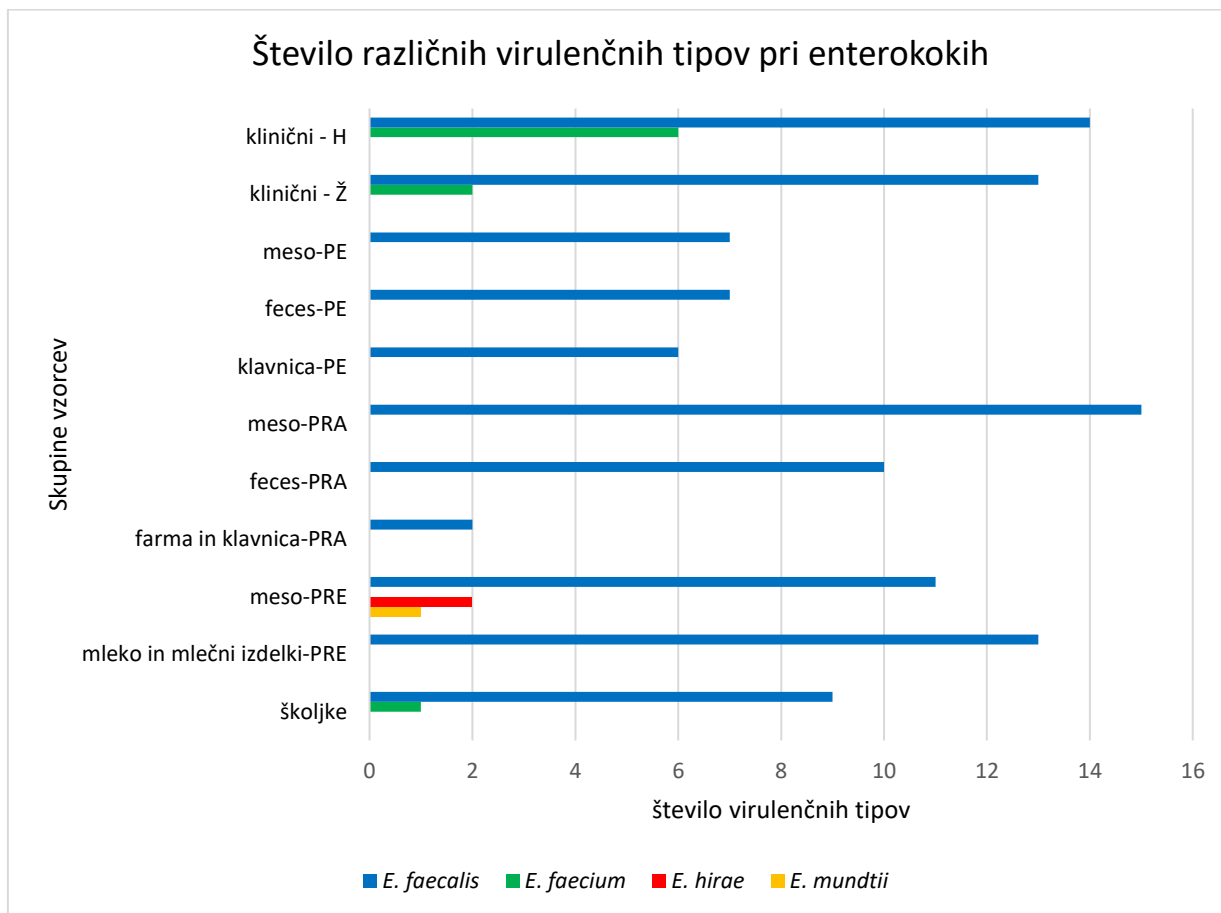
**Tabela 22:** Število in delež enterokokov z geni za virulenčne dejavnike pri posameznih vrstah za vse testirane izolate ( $n = 854$ ).

**Table 22:** Number and proportion of enterococci harboring virulence genes according to species for all the tested isolates ( $n = 854$ ).

Gen za virulenčni dejavnik	Število (delež [%]) izolatov				Skupaj
	<i>E. faecalis</i> [ $n = 487$ ]	<i>E. faecium</i> [ $n = 214$ ]	<i>E. hirae</i> [ $n = 71$ ]	<i>E. mundtii</i> [ $n = 3$ ]	
<i>ace</i>	370 (76,0)	4 (1,9)	2 (2,8)	2 (66,7)	378 (44,3)
<i>asal</i>	234 (48,0)	2 (0,9)	1 (1,4)	0 (0,0)	237 (27,8)
<i>cylA</i>	83 (17,0)	2 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	85 (10,0)
<i>efaA</i>	478 (98,2)	4 (1,9)	2 (2,8)	2 (66,7)	486 (56,9)
<i>esp</i>	122 (25,1)	23 (10,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	145 (17,0)
<i>gelE</i>	400 (82,1)	2 (0,9)	0 (0,0)	2 (66,7)	404 (47,3)
<i>hyl</i>	3 (0,6)	17 (7,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	20 (2,3)

Legenda: *ace*, gen, ki kodira protein za vezavo kolegena; *asal*, gen, ki kodira agregacijsko snov; *cylA*, gen, ki kodira citolizin; *efaA*, gen, ki kodira antigen *Enterococcus faecalis*; *esp*, gen, ki kodira enterokokni površinski protein; *gelE*, gen, ki kodira želatinazo; *hyl*, gen, ki kodira hialuronidazo.

Skupaj smo pri vseh testiranih enterokokih določili 28 različnih virulenčnih tipov. Največjo raznolikost smo ugotovili pri vrsti *E. faecalis*: pri izolatih iz svinjine smo ugotovili 15 različnih virulenčnih tipov, pri humanih kliničnih izolatih 14, pri izolatih iz kliničnih vzorcev živali ter vzorcev mleka in mlečnih izdelkov pa 13 različnih virulenčnih tipov. Najmanj virulenčnih tipov (dva) smo ugotovili pri izolatih vrste *E. faecalis* iz prašičje farme in klavnice. Pri vrsti *E. faecium* smo ugotovili precej manj virulenčnih tipov: šest pri humanih kliničnih izolatih, dva pri izolatih iz kliničnih vzorcev živali ter en virulenčni tip pri školjkah. Pri izolatih *E. faecium* iz drugih skupin vzorcev nismo ugotovili nobenega izmed iskanih genov za virulenčne dejavnike. Pri vrsti *E. hirae* smo ugotovili dva virulenčna tipa, pri vrsti *E. mundtii* pa enega. Število različnih virulenčnih tipov je glede na posamezne skupine vzorcev in vrsto enterokokov prikazano na **Sliki 20**.



Legenda: H, humani klinični vzorci; Ž, klinični vzorci živali; PE, perutnina (piščanci); PRA, prašiči; PRE, prežvekovalci (prevladuje govedo).

**Slika 20:** Število različnih virulenčnih tipov pri posameznih skupinah vzorcev glede na vrsto enterokokov.

**Figure 20:** Number of different virulence types from individual groups of samples according to the species of enterococci.

Pri izolatih vrste *E. faecalis* smo skupaj ugotovili 26 različnih virulenčnih tipov, pri izolatih vrste *E. faecium* pa sedem. Ne glede na izvor sta bila pri izolatih vrste *E. faecalis* najpogosteje ugotovljena virulenčna tipa *ace-efaA-gelE* (25,5 %) in *ace-asal-efaA-gelE* (19,5 %). Pri izolatih vrste *E. faecium* je bil najpogostejši virulenčni tip *esp-hyl* (7,5 %) (**Tabela 23**).

Najpogostejša virulenčna tipa pri izolatih vrste *E. faecalis* (*ace-efaA-gelE* in *efaA-gelE*) smo ugotovili pri vzorcih iz vseh skupin, tako pri izolatih iz kliničnih vzorcev kot pri komenzalnih izolatih (**Slika 21**). Prav tako smo pri vzorcih iz vseh skupin, razen pri izolatih vrste *E. faecalis* iz okoljskih vzorcev prašičje farme in klavnice, ugotovili kombinacijo genov *ace-asal-efaA-gelE*. Virulenčni tip s kombinacijo šestih genov *ace-asal-cylA-efaA-esp-gelE* smo ugotovili samo pri izolatih vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz kliničnih vzorcev ljudi ter pri izolatih vrste *E. faecalis* iz kliničnih vzorcev živali ter školjk (**Slika 21**).

Nekateri virulenčni tipi so se pojavili samo pri eni skupini vzorcev: kombinacija genov *esp-hyl* samo pri izolatih iz kliničnih vzorcev ljudi, *asal-gelE* samo pri izolatih vrste *E. faecalis* iz

svinjine, *ace-cylA-efaA-gelE* samo pri izolatih vrste *E. faecalis* iz fecesa prašičev, *efaA-esp* samo pri izolatih vrste *E. faecalis* iz govejega mesa, *asa1-cylA-efaA-gelE* pa samo pri izolatih vrste *E. faecalis* pri perutnini. Virulenčni tip *asa1-efaA-esp* smo ugotovili le pri kliničnih izolatih ljudi in živali, medtem ko smo virulenčna tipa *efaA-gelE-hyl* in *hyl* ugotovili samo pri kliničnih izolatih iz živali. Nasprotno pa smo kombinacijo genov za virulenčne dejavnike *ace-asa1-efaA* in *ace-efaA* ugotovili pri vseh komenzalnih enterokokih, ne pa tudi pri izolatih iz kliničnih vzorcev (Slika 21).

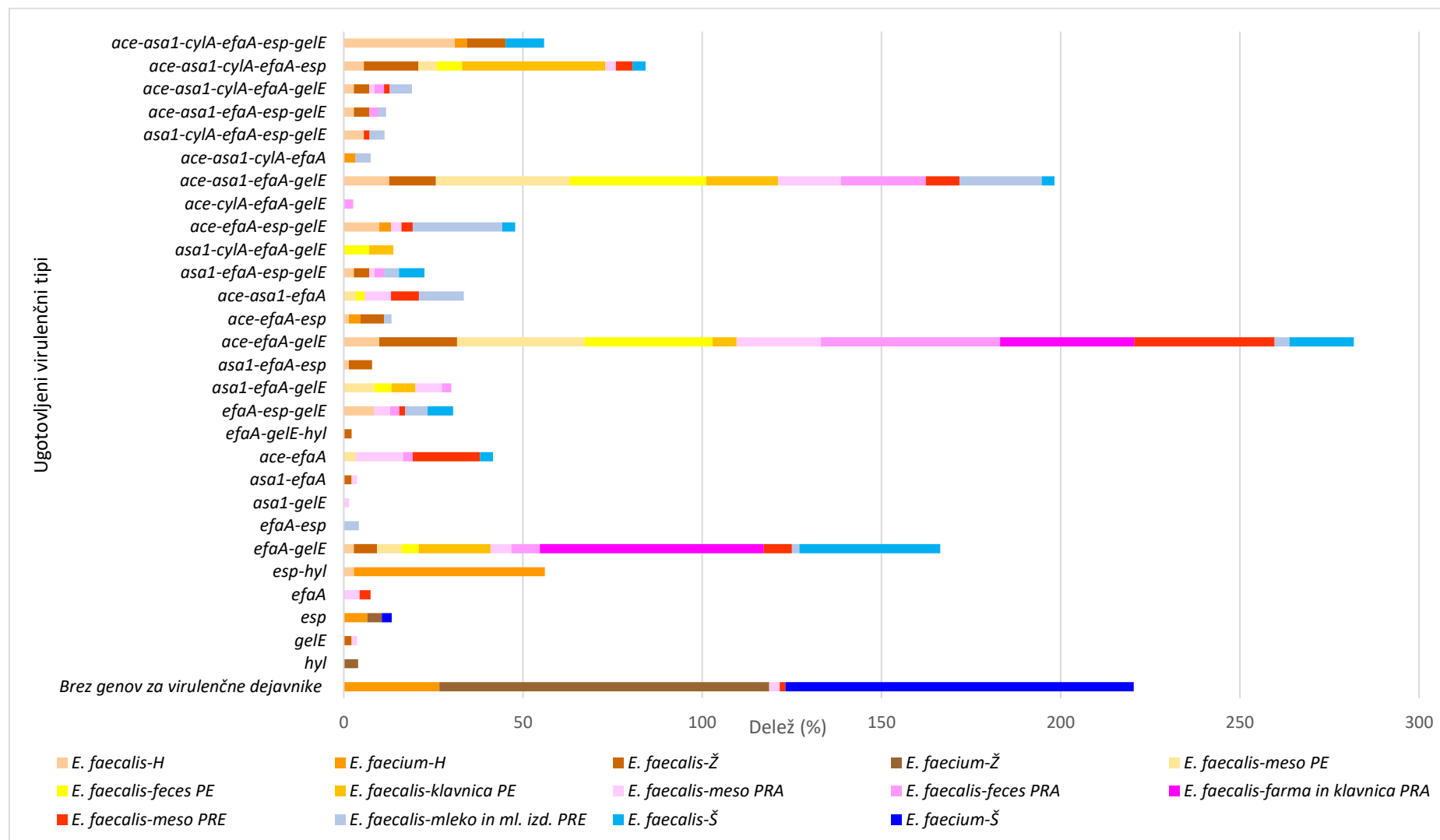
**Tabela 23:** Število in delež izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* glede na virulenčni tip.

**Table 23:** Number and proportion of *E. faecalis* and *E. faecium* isolates according to the virulence pattern.

Virulenčni tip	Število (delež [%]) izolatov	
	<i>E. faecalis</i> [n = 487]	<i>E. faecium</i> [n = 214]
<i>ace-asa1-cylA-efaA-esp-gelE</i>	39 (8,0)	1 (0,5)
<i>ace-asa1-cylA-efaA-esp</i>	29 (6,0)	0 (0,0)
<i>ace-asa1-cylA-efaA-gelE</i>	10 (2,1)	0 (0,0)
<i>ace-asa1-efaA-esp-gelE</i>	6 (1,2)	0 (0,0)
<i>asa1-cylA-efaA-esp-gelE</i>	7 (1,4)	0 (0,0)
<i>ace-asa1-cylA-efaA</i>	2 (0,4)	1 (0,5)
<b><i>ace-asa1-efaA-gelE</i></b>	<b>95 (19,5)</b>	0 (0,0)
<i>ace-cylA-efaA-gelE</i>	1 (0,2)	0 (0,0)
<i>ace-efaA-esp-gelE</i>	24 (4,9)	1 (0,5)
<i>asa1-cylA-efaA-gelE</i>	4 (0,8)	0 (0,0)
<i>asa1-efaA-esp-gelE</i>	10 (2,1)	0 (0,0)
<i>ace-asa1-efaA</i>	19 (3,9)	0 (0,0)
<i>ace-efaA-esp</i>	5 (1,0)	1 (0,5)
<b><i>ace-efaA-gelE</i></b>	<b>124 (25,5)</b>	0 (0,0)
<i>asa1-efaA-esp</i>	4 (0,8)	0 (0,0)
<i>asa1-efaA-gelE</i>	14 (2,9)	0 (0,0)
<i>efaA-esp-gelE</i>	16 (3,3)	0 (0,0)
<i>efaA-gelE-hyl</i>	1 (0,2)	0 (0,0)
<i>ace-efaA</i>	25 (5,1)	0 (0,0)
<i>asa1-efaA</i>	2 (0,4)	0 (0,0)
<i>asa1-gelE</i>	1 (0,2)	0 (0,0)
<i>efaA-esp</i>	2 (0,4)	0 (0,0)
<i>efaA-gelE</i>	43 (8,8)	0 (0,0)
<b><i>esp-hyl</i></b>	2 (0,4)	<b>16 (7,5)</b>
<i>efaA</i>	5 (1,0)	0 (0,0)
<i>esp</i>	0 (0,0)	4 (1,9)
<i>gelE</i>	2 (0,4)	0 (0,0)
<i>hyl</i>	0 (0,0)	1 (0,5)
brez genov za virulenčne dejavnike	4 (0,8)	189 (88,3)

Legenda: *ace*, gen, ki kodira protein za vezavo kolegena; *asa1*, gen, ki kodira agregacijsko snov; *cylA*, gen, ki kodira citolizin; *efaA*, gen, ki kodira antigen *Enterococcus faecalis*; *esp*, gen, ki kodira enterokokni površinski protein; *gelE*, gen, ki kodira želatinazo; *hyl*, gen, ki kodira hialuronidazo.

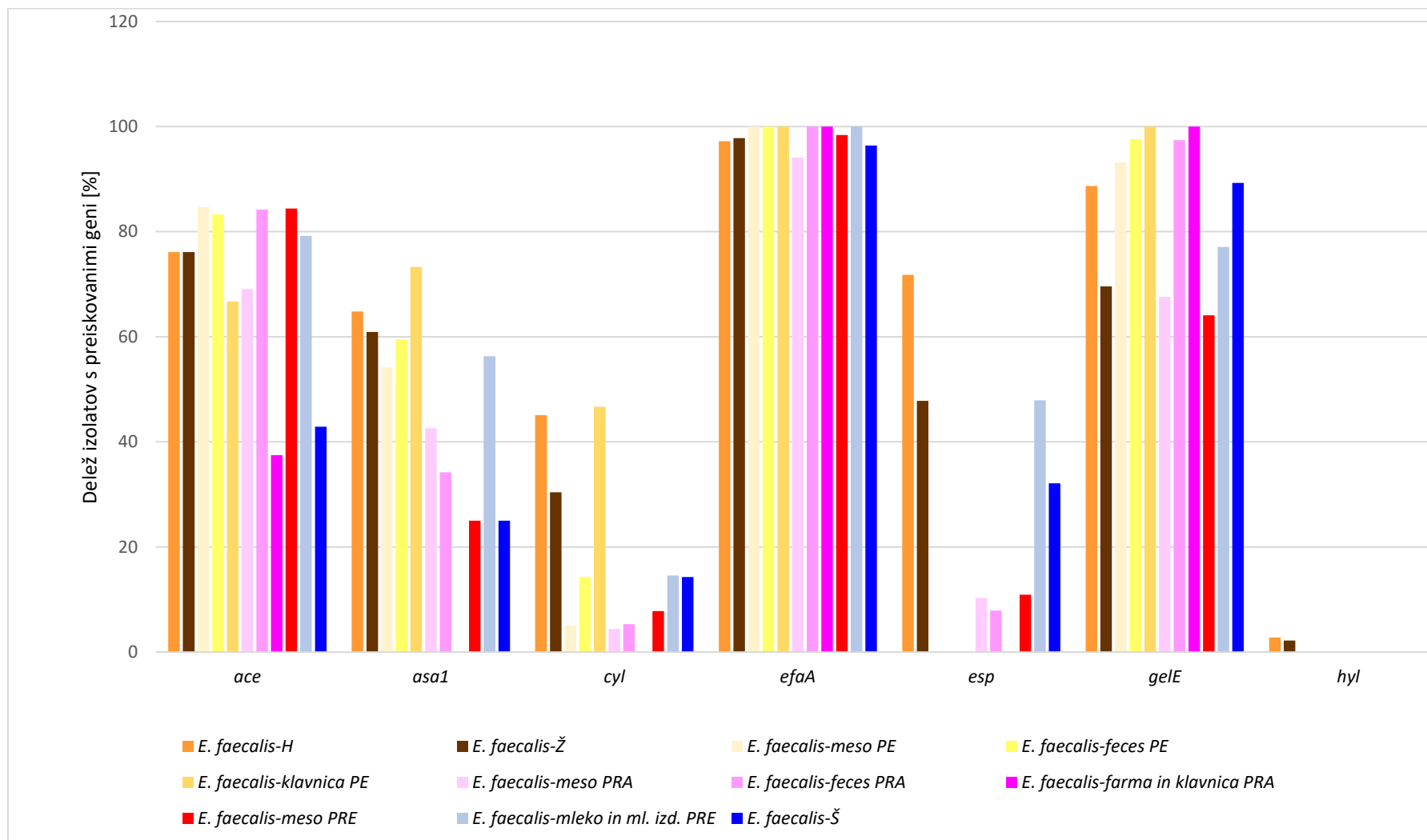
S krepko pisavo so označene kombinacije genov za virulenčne dejavnike, ki so bile najpogostejše pri posameznih vrstah enterokokov v tej skupini.



Legenda: H, humani klinični vzorci; Ž, klinični vzorci živali; PE, perutnina (piščanci); PRA, prašiči; PRE, prežvekovalci (prevladuje govedo); Š, školjke;

**Slika 21:** Virulenčni tipi izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* pri posameznih skupinah vzorcev.

**Figure 21:** Virulence types of *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from individual groups of samples.

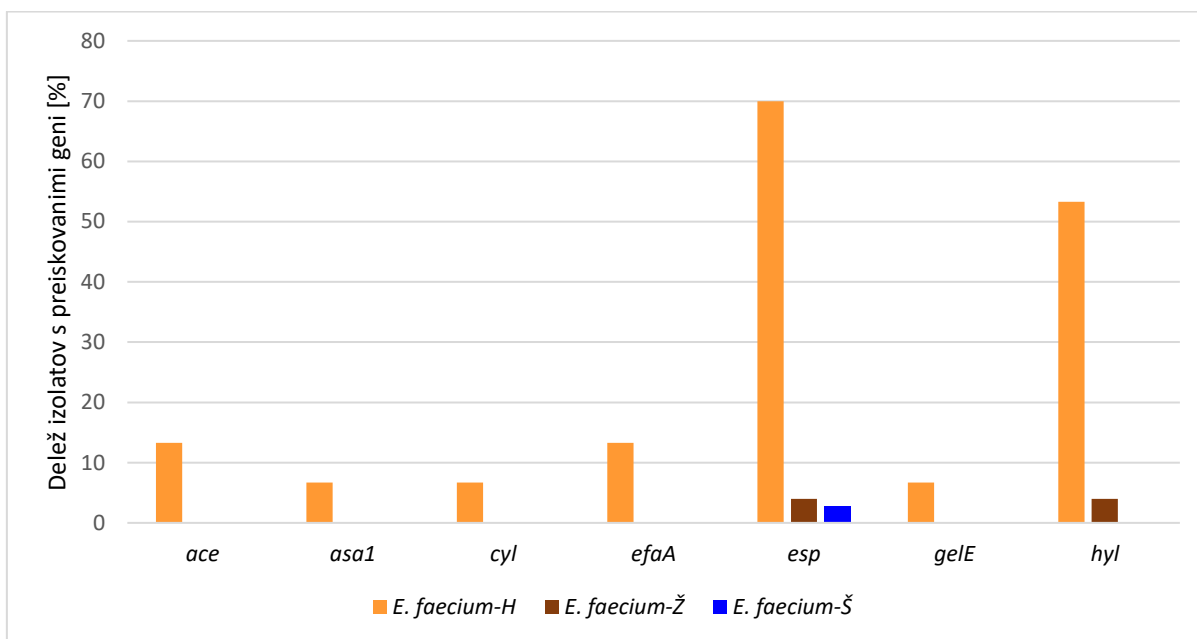


Legenda: H, humani klinični vzorci; Ž, klinični vzorci živali; PE, perutnina (piščanci); PRA, prašiči; PRE, prežvekovalci (prevladuje govedo); Š, školjke;

**Slika 22:** Delež izolotov vrste *E. faecalis* z geni za virulenčne dejavnike v posameznih skupinah vzorcev.

**Figure 22:** Proportion of *E. faecalis* isolates with virulence genes from individual groups of samples.

Delež izolatov, pri katerih nismo ugotovili niti enega izmed preiskovanih genov za virulenčne dejavnike, je bil znatno višji pri izolatih vrste *E. faecium* kot pri vrsti *E. faecalis*. V skupini komezalnih izolatov vrste *E. faecium* pri rejnih živalih (perutnina, prašiči in prežvekovalci) nismo ugotovili nobenega izmed iskanih genov za virulenčne dejavnike. Genov za virulenčne dejavnike nismo ugotovili tudi pri več kot 90 % izolatov vrste *E. faecium* iz kliničnih vzorcev živali in školjk ter pri četrtini izolatov vrste *E. faecium* iz kliničnih vzorcev ljudi. Nasprotno pa so bili vsi izolati vrste *E. faecalis* z izjemo mesa prašičev in govedu nosilci vsaj enega izmed iskanih genov (Sliki 22 in 23).



Legenda: H, humani klinični vzorci; Ž, klinični vzorci živali; Š, školjke;

**Slika 23:** Delež izolatov vrste *E. faecium* z geni za virulenčne dejavnike v posameznih skupinah vzorcev.

**Figure 23:** Proportion of *E. faecium* isolates with virulence genes from individual groups of samples.

Vsi rezultati odpornosti proti protimikrobnim zdravilom in virulenčnih dejavnikov so podrobneje predstavljeni pri posameznih skupinah vzorcev. Rezultate smo oblikovali in jih primerjali posebej za naslednje skupine:

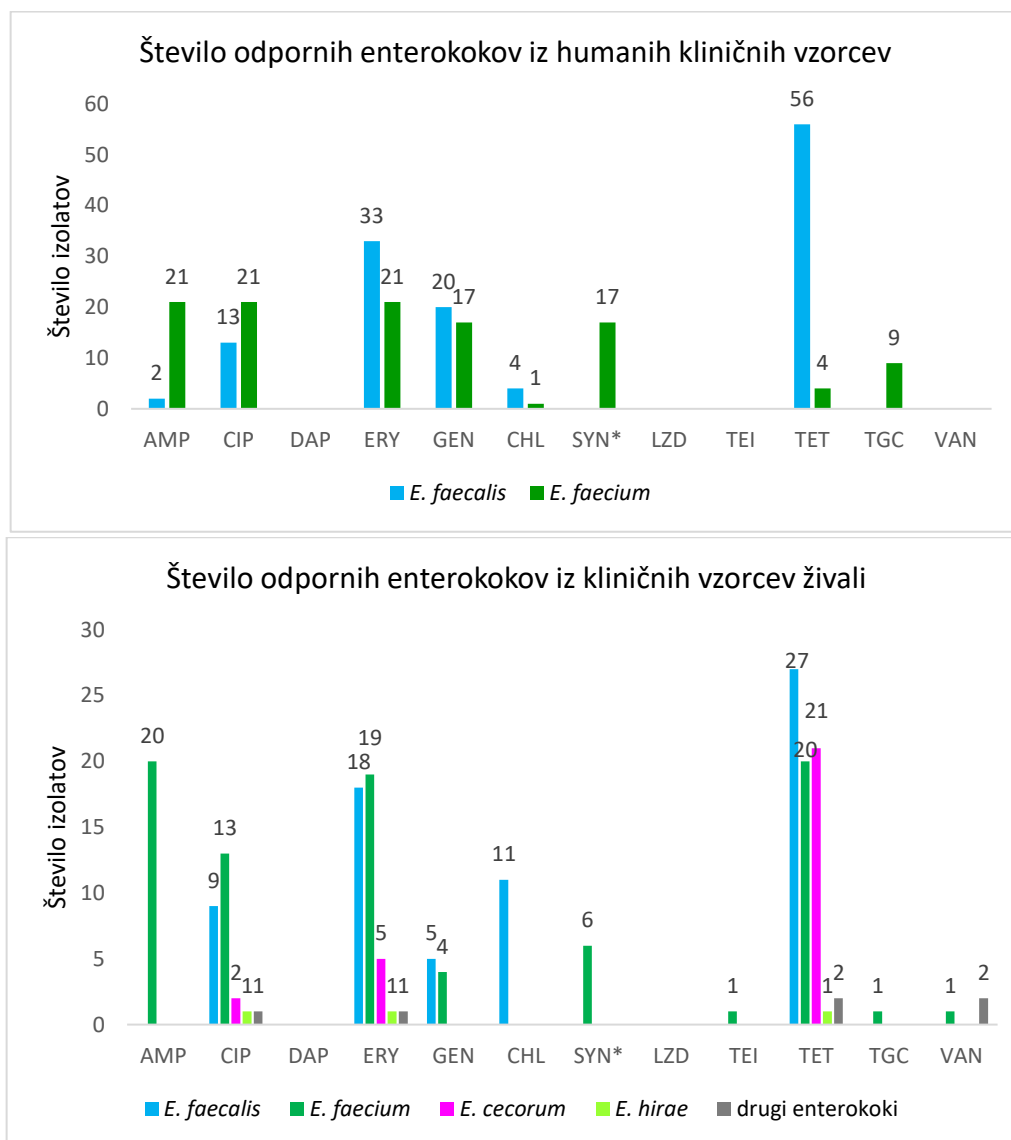
1. enterokoki iz kliničnih vzorcev ljudi in živali
2. enterokoki pri perutnini
3. enterokoki pri prašičih
4. enterokoki pri prežvekovalcih
5. enterokoki iz školjk klapavic.

Rezultati tvorbe biofilma so predstavljeni samostojno na koncu tega poglavja (točka 4.6.).

## 4.1 ENTEROKOKI IZ KLINIČNIH VZORCEV LJUDI IN ŽIVALI

### 4.1.1 Odpornost enterokokov iz kliničnih vzorcev ljudi in živali

Vsi izolati iz kliničnih vzorcev so bili dobro občutljivi za daptomicin in linezolid. Poleg tega so bili vsi humani izolati dobro občutljivi še za teikoplanin in vankomicin, izolati vrste *E. faecalis* pa tudi za tigeciklin. Pri živalih so bili prav tako vsi izolati, razen izolatov vrste *E. faecium*, dobro občutljivi za ampicilin, teikoplanin in tigeciklin (**Slika 24** ter **Priloge 2–5**).



Legenda: AMP, ampicilin; CIP, ciprofloksacin; DAP, daptomicin; ERY, eritromicin; GEN, gentamicin; CHL, kloramfenikol; SYN, kvinupristin/dalfopristin; LZD, linezolid; TEI, teikoplanin; TET, tetraciklin; TGC, tigeciklin; VAN, vankomicin; \* Izolati *E. faecalis* so primarno odporni proti SYN, zato niso prikazani.

**Slika 24:** Število odpornih enterokokov iz kliničnih vzorcev ljudi in živali.

**Figure 24:** Number of resistant enterococci from human and animal clinical samples.

Med vsemi izolati iz kliničnih vzorcev ljudi je bilo le 12 (11,9 %) dobro občutljivih za vsa testirana protimikrobna zdravila, medtem ko je preostalih 89 (88,1 %) izolatov fenotipsko izkazovalo odpornost proti vsaj enemu izmed testiranih antibiotikov. Pri živalih je bilo 27 (25,5 %) izolatov dobro občutljivih za vse testirane antibiotike, preostalih 79 (74,5 %) enterokokov pa je bilo odpornih vsaj proti enemu izmed testiranih antibiotikov (**Tabeli 24 in 25**).

Največji delež odpornosti med vsemi humanimi enterokoki smo ugotovili pri izolatih vrste *E. faecium*, med katerimi jih je bilo 22 (73,3 %) odpornih proti trem ali več različnim skupinam antibiotikov (VOB). Dva (6,7 %) izolata vrste *E. faecium* sta bila odporna proti trem različnim antibiotikom, štirje (13,3 %) izolati proti štirim, 13 (43,3 %) proti petim, trije (10,0 %) izolati pa so bili odporni proti kar šestim različnim antibiotikom (**Tabela 24**). Vsi trije šestkratno odporni izolati vrste *E. faecium* z vzorcem odpornosti AMP-CIP-ERY-GEN-SYN-TGC so bili izolirani iz hemokulture.

V skupino večkratno odpornih bakterij se je uvrščalo tudi 21 (29,6 %) izolatov vrste *E. faecalis* iz kliničnih vzorcev ljudi. Med njimi jih je bilo 14 (19,7 %) odpornih proti trem različnim antibiotikom, trije (4,2 %) proti štirim in štirje (5,6 %) proti petim različnim antibiotikom (**Tabela 24**).

**Tabela 24:** Število in delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz kliničnih vzorcev ljudi in živali glede na občutljivost za različne skupine antibiotikov.

**Table 24:** Number and proportion of resistant *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from human and animal clinical samples according to the susceptibility to different groups of antimicrobials.

Odpornost proti skupinam protimikrobnih zdravil (število)	Število (delež [%]) izolatov			
	Humani klinični vzorci		Klinični vzorci živali	
	<i>E. faecalis</i> [n = 71]	<i>E. faecium</i> [n = 30]	<i>E. faecalis</i> [n = 46]	<i>E. faecium</i> [n = 25]
6	0 (0,0)	3 (10,0)	0 (0,0)	1 (4,0)
5	4 (5,6)	13 (43,3)	3 (6,5)	5 (20,0)
4	3 (4,2)	4 (13,3)	4 (8,7)	9 (36,0)
3	14 (19,7)	2 (6,7)	3 (6,5)	5 (20,0)
<b>VOB</b>	<b>21 (29,6)</b>	<b>22 (73,3)</b>	<b>10 (21,7)</b>	<b>20 (80,0)</b>
2	13 (18,3)	3 (10,0)	10 (21,7)	0 (0,0)
1	28 (39,4)	2 (6,7)	10 (21,7)	1 (4,0)
Občutljivi	9 (12,7)	3 (10,0)	16 (34,8)	4 (16,0)

Legenda: V obarvani vrstici je podan seštevek večkratno odpornih izolatov (VOB).

Tudi pri živalskih kliničnih enterokokih smo največji delež odpornosti ugotovili pri izolatih vrste *E. faecium*, med katerimi jih je bilo 20 (80,0 %) odpornih proti trem ali več različnim skupinam antibiotikov. Pet (20,0 %) izolatov vrste *E. faecium* je bilo odpornih proti trem različnim antibiotikom, devet (36,0 %) proti štirim, pet (20,0 %) proti petim, en (4,0 %) izolat pa je bil odporen proti kar šestim različnim antibiotikom (**Tabela 24**). Izolat vrste *E. faecium*, ki je bil odporen proti šestim različnim antibiotikom z vzorcem odpornosti AMP-CIP-ERY-GEN-SYN-TET, je bil izoliran iz brisa podkožnega tkiva pri mačku s fasciitisom.



Delež večkratno odpornih enterokokov iz kliničnih vzorcev živali je bil pri izolatih vrste *E. faecalis* znatno nižji (21,7 %) kot pri izolatih vrste *E. faecium*. V skupino VOB smo uvrstili 10 izolatov *E. faecalis* iz različnih kliničnih vzorcev (urin, bris rane, traheje in sluhovoda). Med temi izolati so bili trije (6,5 %) odporni proti trem različnim antibiotikom, štirje (8,7 %) proti štirim in trije (6,5 %) proti petim različnim antibiotikom (**Tabela 24**).

Pri ostalih vrstah enterokokov, izoliranih iz kliničnih vzorcev živali (*E. cecorum*, *E. hirae*, *E. canis*, *E. canitestini* in *E. gallinarum*), je bilo število odpornih izolatov na splošno precej manjše kot pri izolatih vrst *E. faecium* in *E. faecalis* (**Slika 25**). V tej skupini enterokokov nismo ugotovili VOB (**Tabela 25**).

**Tabela 25:** Število in delež odpornih izolatov drugih vrst enterokokov kliničnih vzorcev živali glede na občutljivost za različne skupine antibiotikov.

**Table 25:** Number and proportion of resistant other enterococcal isolates from animal clinical samples according to susceptibility to different groups of antimicrobials.

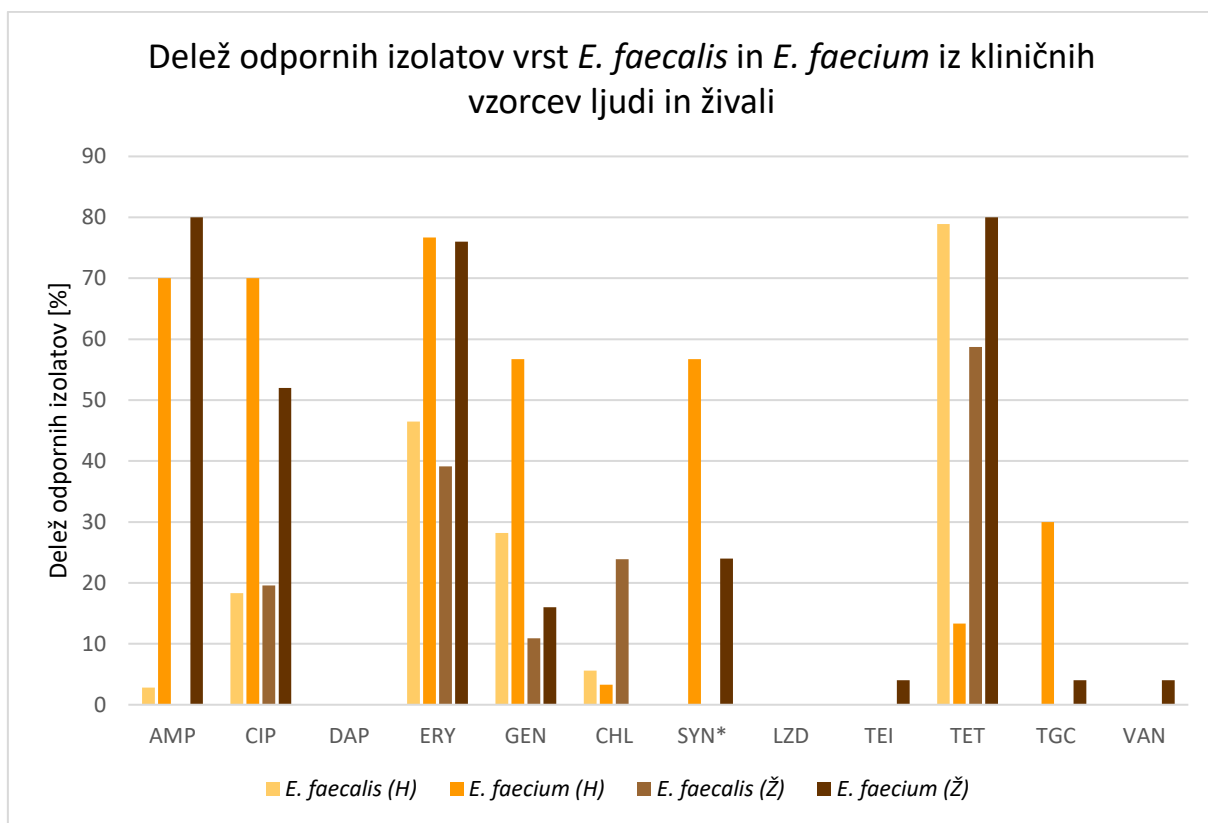
Odpornost proti skupinam protimikrobnih zdravil (število)	Število (delež [%]) izolatov				
	<i>E. cecorum</i> [n = 25]	<i>E. hirae</i> [n = 5]	<i>E. canis</i> [n = 1]	<i>E. canitestini</i> [n = 2]	<i>E. gallinarum</i> [n = 2]
<b>VOB</b>	/	/	/	/	/
2	5 (20,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (100,0)
1	18 (72,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	1 (50,0)	0 (0,0)
občutljivi	2 (8,0)	3 (60,0)	1 (100,0)	1 (50,0)	0 (0,0)

Legenda: V obarvani vrstici je podan seštevek večkratno odpornih izolatov (VOB).

Iz **Slike 25** je razvidno, da so bili humani izolati vrste *E. faecium* najpogosteje odporni proti eritromicinu (76,7 %), ampicilinu in ciprofloksacinu (oba 70,0 %). Več kot polovica jih je bilo odpornih proti gentamicinu in kvinupristinu/dalfopristinu (oba 56,7 %), 30,0 % pa proti tigeciklinu. Manjši delež odpornosti smo ugotovili tudi proti tetraciklinu (13,3 %) in kloramfenikolu (3,3 %). Za razliko od izolatov vrste *E. faecium* je bilo pri humanih kliničnih izolatih vrste *E. faecalis* največ odpornih proti tetraciklinu (78,9 %), malo manj kot polovica (46,5 %) proti eritromicinu, 28,2 % izolatov pa proti gentamicinu. Slaba petina (18,3 %) izolatov je bila odporna proti ciprofloksacinu, manjši delež odpornosti pa smo ugotovili še proti kloramfenikolu (5,6 %) in ampicilinu (2,8 %) (**Slika 25, Priloga 2**).

Pri izolatih vrste *E. faecium* iz kliničnih vzorcev živali je bila večina odporna proti ampicilinu, tetraciklinu (oba 80,0 %) ter eritromicinu (76,0 %), nekaj več kot polovica (52,0 %) izolatov pa je bila odporna proti ciprofloksacinu. Zmanjšano občutljivost izolatov vrste *E. faecium* smo ugotovili še za kvinupristin/dalfopristin (odpornih 24,0 %) in gentamicin (odpornih 16,0 %). Manjši delež odpornosti smo ugotovili tudi proti teikoplaninu, tigeciklinu in vankomicinu (4,0 %) (**Slika 25, Priloga 3**).

Podobno kot za izolate vrste *E. faecium* smo tudi za živalske klinične izolate vrste *E. faecalis* ugotovili, da so v največji meri odporni proti tetraciklinu (58,7 %) in eritromicinu (39,1 %). Nasprotno pa smo pri enajstih izolatih vrste *E. faecalis* ugotovili odpornost proti kloramfenikolu (23,9 %), ki je pri izolatih vrste *E. faecium* nismo ugotovili. Približno petina (19,6 %) izolatov vrste *E. faecalis* je bila odporna tudi proti ciprofloksacinu, proti gentamicinu pa 10,9 % (Slika 25, Priloga 3).



Legenda: AMP, ampicilin; CIP, ciprofloksacin; DAP, daptomicin; ERY, eritromicin; GEN, gentamicin; CHL, kloramfenikol; SYN, kvinupristin/dalfopristin; LZD, linezolid; TEI, teikoplanin; TET, tetraciklin; TGC, tigeciklin; VAN, vankomicin; H, humani klinični vzorci; Ž, klinični vzorci živali; \* Izolati *E. faecalis* so primarno odporni proti SYN, zato niso prikazani.

**Slika 25:** Delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz kliničnih vzorcev ljudi in živali.

**Figure 25:** Proportion of resistant *E. faecalis* in *E. faecium* isolates from human and animal clinical samples.

Med humanimi kliničnimi enterokoki smo 20 (28,2 %) izolatov vrste *E. faecalis* na osnovi vrednosti MIK za gentamicin uvrstili v skupino HLAR (**Priloga 2**); izolati so izvirali iz urina, hemokulture, vaginalnega brisa, rane med operacijo ter ejakulata. V skupino HLAR smo uvrstili tudi 17 (56,7 %) izolatov vrste *E. faecium* (**Priloga 2**) iz hemokulture, urina in aspirata sapnika ljudi. Skupaj smo tako več kot tretjino (36,3 %) vseh testiranih humanih kliničnih enterokokov uvrstili v skupino HLAR. Poleg tega so bili vsi ti izolati tudi večkratno odporni, saj so poleg povečane odpornosti proti aminoglikozidom (gentamicinu) fenotipsko izkazovali odpornost še najmanj proti dvema drugima skupinama protimikrobnih zdravil.

Pri živalih smo v skupino posebno odpornih enterokokov (HLAR) uvrstili štiri (16,0 %) izolate vrste *E. faecium* iz brisa podkožnega tkiva in vzorcev urina ter pet (10,9 %) izolatov vrste *E. faecalis* iz urina, rane in brisa sapnika. Podobno kot pri humanih izolatih HLAR so bili tudi živalski izolati, z izjemo enega (*E. faecalis*), večkratno odporni (**Priloga 3**).

Proti vankomicinu odpornih enterokokov (VRE) iz kliničnih vzorcev bolnikov nismo vključili v raziskavo. Pri živalih smo iz kliničnih vzorcev (hemokulture psa) pridobili en izolat VRE vrste *E. faecium* (**Priloga 3**), pri katerem smo tudi s testom PCR dokazali gen za odpornost proti vankomicinu *vanA*. V skupini živalskih kliničnih izolatov vrste *E. faecalis* nismo ugotovili odpornosti proti vankomicinu.

Med drugimi enterokoki iz živalskih kliničnih vzorcev (**Priloga 5**) sta imela oba izolata vrste *E. gallinarum* vrednost MIK za vankomicin 8 µg/ml; izolat iz piščančjih organov je bil odporen proti ciprofloksacinu in tetraciklinu, izolat iz jeter enodnevnih puranov pa proti tetraciklinu. Izolata vrst *E. canis* in *E. canitestini* iz pasjega sluhovoda sta bila dobro občutljiva za vse testirane antibiotike, medtem ko smo pri izolatu vrste *E. canitestini* iz nosnega izpirka mačka ugotovili odpornost proti eritromicinu.

Delež odpornosti proti posameznim antibiotikom ter distribucija vrednosti MIK sta za vse enterokoke iz kliničnih vzorcev ljudi in živali prikazana v **Prilogah 2–5**.

#### 4.1.2 Geni za virulenčne dejavnike pri enterokokih iz kliničnih vzorcev ljudi in živali

Pri enterokokih iz kliničnih vzorcev smo ugotovili vse preiskovane gene za virulenčne dejavnike, vendar pa noben izolat ni imel vseh sedmih genov hkrati. Prisotnost genov se je razlikovala glede na vrsto enterokokov. Preiskovane gene za virulenčne dejavnike smo ugotovili le pri vrstah *E. faecalis* in *E. faecium*, medtem ko pri izolatih vrst *E. canis*, *E. canitestini*, *E. cecorum*, *E. gallinarum* in *E. hirae* iz kliničnih vzorcev živali nismo ugotovili nobenega. Pogosteje smo gene za virulenčne dejavnike ugotovili pri izolatih vrste *E. faecalis*, razen gena *hyl* (**Tabela 26**).

Delež posameznih genov pri vrsti *E. faecalis* je bil podoben tako pri humanih kot živalskih kliničnih izolatih, prevladoval pa je gen *efaA* (> 97,0 % v obeh skupinah). Pri izolatih vrste *E. faecium* smo znatno več genov ugotovili v skupini izolatov iz kliničnih vzorcev ljudi, kjer je prevladoval gen *esp* (70,0 %). Pri živalih smo v skupini izolatov vrste *E. faecium* ugotovili le dva, ki sta imela gena *esp* in *hyl*. Delež posameznih genov za virulenčne dejavnike, glede na vrsto enterokokov in njihov izvor, je prikazan v **Tabeli 26**.

**Tabela 26:** Prisotnost genov za virulenčne dejavnike pri izolatih vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz kliničnih vzorcev ljudi in živali.

**Table 26:** The presence of virulence genes in *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from human and animal clinical samples.

Gen za virulenčni dejavnik	Število (delež [%]) izolatov			
	Humani klinični vzorci		Klinični vzorci živali	
	<i>E. faecalis</i> [n = 71]	<i>E. faecium</i> [n = 30]	<i>E. faecalis</i> [n = 46]	<i>E. faecium</i> [n = 25]
<i>ace</i>	54 (76,1)	4 (13,3)	35 (76,1)	0 (0,0)
<i>asal</i>	46 (64,8)	2 (6,7)	28 (60,9)	0 (0,0)
<i>cylA</i>	32 (45,1)	2 (6,7)	14 (30,4)	0 (0,0)
<i>efaA</i>	69 (97,2)	4 (13,3)	45 (97,8)	0 (0,0)
<i>esp</i>	51 (71,8)	21(70,0)	22 (47,8)	1 (4,0)
<i>gelE</i>	63 (88,7)	2 (6,7)	32 (69,6)	0 (0,0)
<i>hyl</i>	2 (2,8)	16 (53,3)	1 (2,2)	1 (4,0)

Legenda: *ace*, gen, ki kodira protein za vezavo kolegena; *asal*, gen, ki kodira agregacijsko snov; *cylA*, gen, ki kodira citolizin; *efaA*, gen, ki kodira antigen *Enterococcus faecalis*; *esp*, gen, ki kodira enterokokni površinski protein; *gelE*, gen, ki kodira želatinazo; *hyl*, gen, ki kodira hialuronidazo.

Tako pri humanih kot pri živalskih izolatih vrste *E. faecalis* smo ugotovili večjo pestrost in število različnih virulenčnih tipov kot pri izolatih vrste *E. faecium*. Nekateri virulenčni tipi so se pojavili samo pri izolatih iz kliničnih vzorcev ljudi, drugi pa samo pri izolatih iz kliničnih vzorcev živali; virulenčni tipi in njihov delež pri izolatih vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz kliničnih vzorcev ljudi in živali so prikazani v **Tabeli 27**.

Pri izolatih vrste *E. faecalis* iz kliničnih vzorcev ljudi smo ugotovili 14 različnih virulenčnih tipov z najpogostejšim vzorcem *ace-asal-cylA-efaA-esp-gelE*. Tako kombinacijo genov smo ugotovili pri 22 (31,0 %) izolatih, in sicer iz urina ( $n = 13$ ), hemokulture, vagine (oba  $n = 3$ ) ter iz abdomna, ejakulata in rane (vsi  $n = 1$ ). Med pogostejše virulenčne tipe smo uvrstili še kombinacijo genov *ace-asal-efaA-gelE* pri devetih (12,7 %) izolatih ter kombinaciji *ace-efaA-esp-gelE* in *ace-efaA-gelE* (obe pri sedmih [9,9 %] izolatih). Vseh 71 humanih izolatov vrste *E. faecalis* je hkrati vsebovalo najmanj dva gena za virulenčne dejavnike (**Tabela 27**).

Pri izolatih vrste *E. faecalis* iz kliničnih vzorcev živali smo ugotovili 13 različnih virulenčnih tipov, vseh 46 izolatov pa je vsebovalo vsaj en gen za virulenčne dejavnike. Najpogostejši vzorec *ace-efaA-gelE* smo ugotovili pri desetih (21,7 %) izolatih vrste *E. faecalis* (**Tabela 27**) iz urina psa ( $n = 4$ ), različnih organov psa ( $n = 3$ ), rane in brisa sluhovoda psa (oba  $n = 1$ ) ter brisa sarnika želve ( $n = 1$ ). Med pogostejše virulenčne tipe smo uvrstili še kombinacijo genov *ace-asal-cylA-efaA-esp* pri sedmih (15,2 %) izolatih ter kombinacijo *ace-asal-efaA-gelE* pri šestih (13,0 %) izolatih (**Tabela 27**).

Za razliko od izolatov vrste *E. faecalis* so imeli izolati vrste *E. faecium* manjše število genov za virulenčne dejavnike. Pri izolatih vrste *E. faecium* iz kliničnih vzorcev ljudi smo ugotovili šest različnih virulenčnih tipov z najpogostejšim vzorcem *esp-hyl*. Tak virulenčni tip je imelo 16 humanih izolatov vrste *E. faecium* (53,3 %, **Tabela 27**) iz hemokulture ( $n = 10$ ), urina ( $n =$

4) in aspirata sapnika ( $n = 2$ ). Pri živalskih kliničnih izolatih vrste *E. faecium* pa smo ugotovili le dva različna gena za virulenčne dejavnike pri dveh izolatih; gen *esp* smo ugotovili pri izolatu iz punktata trebušne votline mačka s peritonitisom, gen *hyl* pa pri izolatu iz urina psa (**Tabela 27**).

**Tabela 27:** Virulenčni tipi, ugotovljeni pri izolatih vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz kliničnih vzorcev ljudi in živali.  
**Table 27:** Virulence patterns observed in *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from human and animal clinical samples.

Virulenčni tip	Število (delež [%]) izolatov			
	Humani klinični vzorci		Klinični vzorci živali	
	<i>E. faecalis</i> [ $n = 71$ ]	<i>E. faecium</i> [ $n = 30$ ]	<i>E. faecalis</i> [ $n = 46$ ]	<i>E. faecium</i> [ $n = 25$ ]
<b><i>ace-asa1-cylA-efaA-esp-gelE</i></b>	<b>22 (31,0)</b>	1 (3,3)	5 (10,9)	0 (0,0)
<i>ace-asa1-cylA-efaA-esp</i>	4 (5,6)	0 (0,0)	7 (15,2)	0 (0,0)
<i>ace-asa1-cylA-efaA-gelE</i>	2 (2,8)	0 (0,0)	2 (4,3)	0 (0,0)
<i>ace-asa1-efaA-esp-gelE</i>	2 (2,8)	0 (0,0)	2 (4,3)	0 (0,0)
<i>asa1-cylA-efaA-esp-gelE</i>	4 (5,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>ace-asa1-cylA-efaA</i>	0 (0,0)	1 (3,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>ace-asa1-efaA-gelE</i>	9 (12,7)	0 (0,0)	6 (13,0)	0 (0,0)
<i>ace-efaA-esp-gelE</i>	7 (9,9)	1 (3,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>asa1-efaA-esp-gelE</i>	2 (2,8)	0 (0,0)	2 (4,3)	0 (0,0)
<i>ace-efaA-esp</i>	1 (1,4)	1 (3,3)	3 (6,5)	0 (0,0)
<b><i>ace-efaA-gelE</i></b>	7 (9,9)	0 (0,0)	<b>10 (21,7)</b>	0 (0,0)
<i>asa1-efaA-esp</i>	1 (1,4)	0 (0,0)	3 (6,5)	0 (0,0)
<i>efaA-esp-gelE</i>	6 (8,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>efaA-gelE-hyl</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,2)	0 (0,0)
<i>asa1-efaA</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,2)	0 (0,0)
<i>efaA-gelE</i>	2 (2,8)	0 (0,0)	3 (6,5)	0 (0,0)
<b><i>esp-hyl</i></b>	2 (2,8)	<b>16 (53,3)</b>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>esp</i>	0 (0,0)	2 (6,6)	0 (0,0)	1 (4,0)
<i>gelE</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,2)	0 (0,0)
<i>hyl</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,0)
brez genov za virulenčne dejavnike	0 (0,0)	8 (26,7)	0 (0,0)	23 (92,0)

Legenda: *ace*, gen, ki kodira protein za vezavo kolegena; *asa1*, gen, ki kodira agregacijsko snov; *cylA*, gen, ki kodira citolizin; *efaA*, gen, ki kodira antigen *Enterococcus faecalis*; *esp*, gen, ki kodira enterokokni površinski protein; *gelE*, gen, ki kodira želatinazo; *hyl*, gen, ki kodira hialuronidazo.

S krepko pisavo so označene kombinacije genov za virulenčne dejavnike, ki so bile najpogostejše pri posameznih vrstah enterokokov v tej skupini.

Glede na vrsto vzorca so imeli izolati vrste *E. faecalis* iz urina ljudi ( $n = 38$ ) največ virulenčnih genov. Pri večini teh izolatov smo odkrili štiri najpogostejše virulenčne tipe, skupaj pa 11 različnih. Šest genov hkrati smo ugotovili tudi pri humanem izolatu vrste *E. faecium* iz urina. Pri živalskih izolatih vrste *E. faecalis* iz urina ( $n = 24$ ) pa smo ugotovili 12 različnih virulenčnih tipov, največkrat kombinacije genov *ace-asa1-cylA-efaA-esp* (pri petih izolatih), *ace-asa1-cylA-efaA-esp-gelE* in *ace-efaA-gelE* (obe pri štirih izolatih).

Pri humanih izolatih vrste *E. faecalis* iz hemokultur ( $n = 16$ ) smo ugotovili devet različnih virulenčnih tipov z najpogostejšim vzorcem *efaA-esp-gelE*, prisotni pa so bili tudi štirje najpogostejši virulenčni tipi. Pri dveh humanih izolatih vrste *E. faecalis* iz hemokultur smo ugotovili virulenčni tip *esp-hly*, ki ga nismo zasledili pri nobenem drugem izolatu vrste *E. faecalis*, bil pa je precej pogost pri izolatih vrste *E. faecium*. Pri osmih izolatih vrste *E. faecalis* iz vagine ljudi smo ugotovili pet različnih virulenčnih tipov z najpogostejšim vzorcem *ace-asal-cylA-efaA-esp-gelE*, pri treh izolatih iz ran ljudi tri virulenčne tipe, pri dveh izolatih iz abdomna ljudi pa dva različna virulenčna tipa. Iz ostalih kliničnih vzorcev ljudi (bris žolčnika, ejakulat, ulkus in uho) smo izolirali po en izolat vrste *E. faecalis*, od katerih je imel vsak svoj virulenčni tip.

Pri živalskih izolatih vrste *E. faecalis* iz sluhovodov ( $n = 9$ ) smo ugotovili šest različnih virulenčnih tipov z najpogostejšim vzorcem *ace-asal-efaA-gelE*, poleg tega pa tudi redko kombinacijo genov *efaA-gelE-hyl* pri psu. Izolati vrste *E. faecalis*, izolirani iz različnih pasjih organov ( $n = 4$ ), so imeli dva različna virulenčna tipa *ace-efaA-gelE* in *ace-asal-cylA-efaA-esp*, iz jeter enodnevnih puranov pa smo pridobili izolat s kombinacijo genov *ace-asal-cylA-efaA-gelE*. Pri štirih izolatih vrste *E. faecalis* iz ran živali smo ugotovili tri različne virulenčne tipe, izolati iz dveh vzorcev mleka krave, podkožnega tkiva psa in brisa sapnika želve pa so tudi vsi imeli različne virulenčne tipe.

## 4.2 ENTEROKOKI PRI PERUTNINI

V to skupino smo vključili enterokoke iz mesa in fecesa piščancev ter iz različnih vzorcev perutninske klavnice.

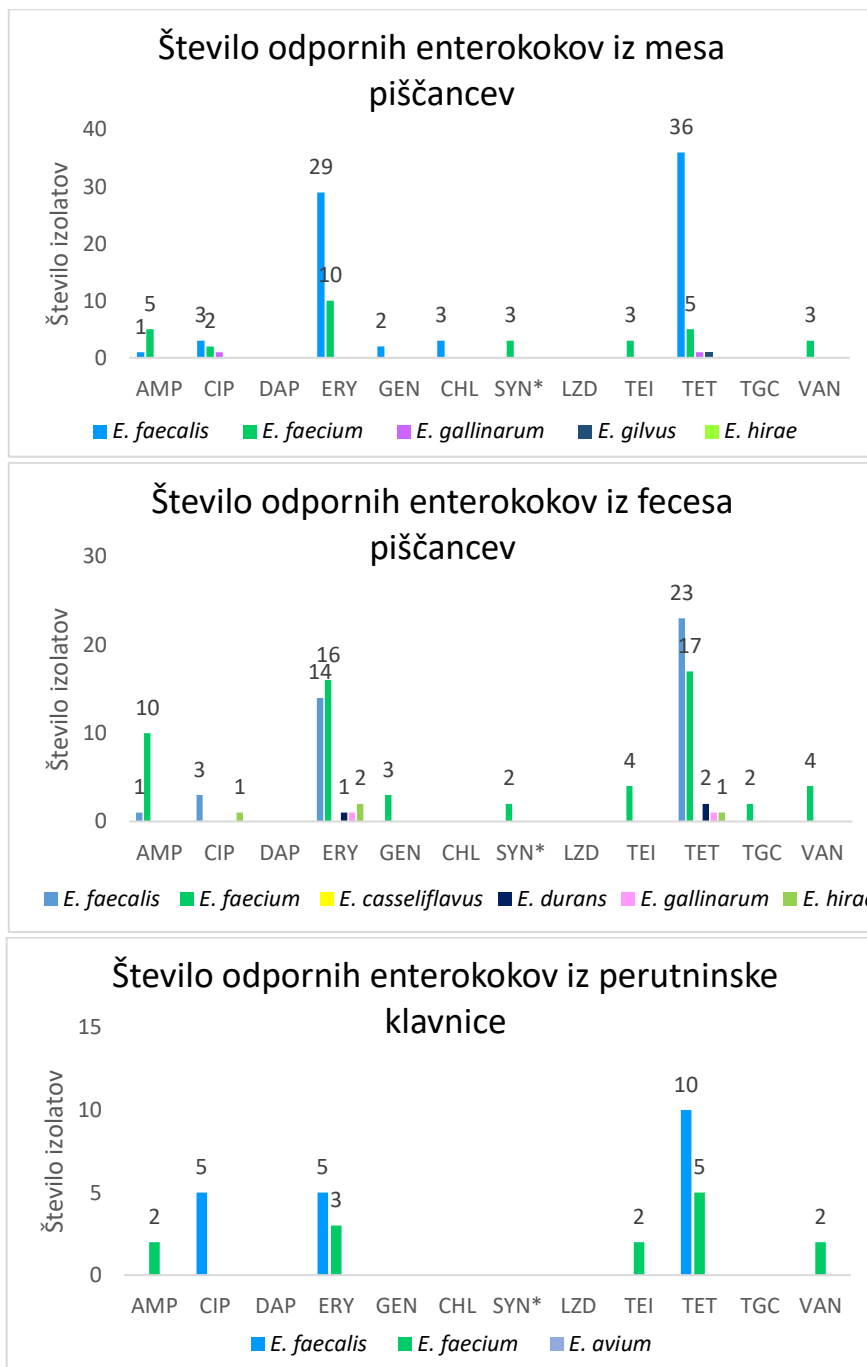
### 4.2.1 Odpornost enterokokov iz mesa in fecesa piščancev ter perutninske klavnice

Vsi izolati, pridobljeni iz vzorcev perutnine, so bili dobro občutljivi za daptomicin in linezolid. Poleg tega so bili izolati iz mesa dobro občutljivi tudi za tigeciklin, izolati iz fecesa še za kloramfenikol, izolati iz klavnice pa tudi za gentamicin, kloramfenikol in tigeciklin (**Slika 26** in **Priloge 6–11**).

Med vsemi 187 izolati iz te skupine jih je bilo 52 (27,8 %) dobro občutljivih za vse testirane antibiotike, medtem ko je ostalih 135 (72,2 %) enterokokov fenotipsko izkazovalo odpornost proti vsaj enemu izmed testiranih antibiotikov. Delež odpornih izolatov se ni veliko razlikoval glede na njihov izvor; odpornost proti vsaj enemu izmed testiranih antibiotikov je izkazovalo 75,3 % enterokokov iz mesa piščancev, 69,0 % iz fecesa piščancev in 72,7 % iz perutninske klavnice (**Tabeli 28** in **29**).

V skupino večkratno odpornih enterokokov se je uvrščalo devet izolatov iz mesa, 10 izolatov iz fecesa in šest izolatov iz klavnice, od teh pa sta največjo odpornost izkazovala izolata vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz mesa, ki sta bila odporna proti petim skupinam protimikrobnih

zdravil (**Tabela 28**). Pri drugih vrstah enterokokov iz vzorcev perutnine smo ugotovili le en večkratno odporen izolat vrste *E. hirae* iz fecesa piščancev (**Tabela 29**) z vzorcem odpornosti CIP-ERY-TET.



Legenda: AMP, ampicilin; CIP, ciprofloksacin; DAP, daptomicin; ERY, eritromicin; GEN, gentamicin; CHL, kloramfenikol; SYN, kvinupristin/dalfopristin; LZD, linezolid; TEI, teikoplanin; TET, tetraciklin; TGC, tigeciklin; VAN, vankomicin; \*Izolati vrste *E. faecalis* so primarno odporni proti SYN, zato niso prikazani. Izolati vrst *E. casseliflavus* in *E. gallinarum* so primarno odporni proti VAN.

**Slika 26:** Število odpornih enterokokov iz mesa in fecesa piščancev ter iz perutninske klavnice.

**Figure 26:** Number of resistant enterococci from broiler meat, feces and poultry slaughterhouse.

**Tabela 28:** Število in delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz mesa in fecesa piščancev ter perutninske klavnice glede na občutljivost za različne skupine antibiotikov.

**Table 28:** Number and proportion of resistant isolates of *E. faecalis* and *E. faecium* from broiler meat, feces and poultry slaughterhouse according to susceptibility to different groups of antimicrobials.

Odpornost proti skupinam protimikrobnih zdravil (število)	Število (delež [%]) izolatov					
	Meso piščancev		Feces piščancev		Perutninska klavnica	
	<i>E. faecalis</i> [n = 59]	<i>E. faecium</i> [n = 19]	<i>E. faecalis</i> [n = 42]	<i>E. faecium</i> [n = 34]	<i>E. faecalis</i> [n = 15]	<i>E. faecium</i> [n = 6]
5	1 (1,7)	1 (5,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
4	1 (1,7)	1 (5,3)	1 (2,4)	3 (8,8)	0 (0,0)	2 (33,3)
3	4 (6,8)	1 (5,3)	2 (4,8)	3 (8,8)	4 (26,7)	0 (0,0)
<b>VOB</b>	<b>6 (10,2)</b>	<b>3 (15,8)</b>	<b>3 (7,1)</b>	<b>6 (17,6)</b>	<b>4 (26,7)</b>	<b>2 (33,3)</b>
2	13 (22,0)	6 (31,6)	8 (19,0)	10 (29,4)	1 (6,7)	1 (16,7)
1	27 (45,8)	4 (21,1)	16 (38,1)	10 (29,4)	6 (40,0)	2 (33,3)
občutljivi	13 (22,0)	6 (31,6)	15 (35,7)	8 (23,5)	4 (26,7)	1 (16,7)
skupaj	78		76		21	

Legenda: V obarvani vrstici je podan seštevek večkratno odpornih izolatov (VOB).

**Tabela 29:** Število in delež odpornih izolatov drugih vrst enterokokov iz mesa in fecesa piščancev ter perutninske klavnice glede na občutljivost za različne skupine antibiotikov.

**Table 29:** Number and proportion of resistant isolates of other enterococcal species from broiler meat, feces and poultry slaughterhouse according to susceptibility to different groups of antimicrobials.

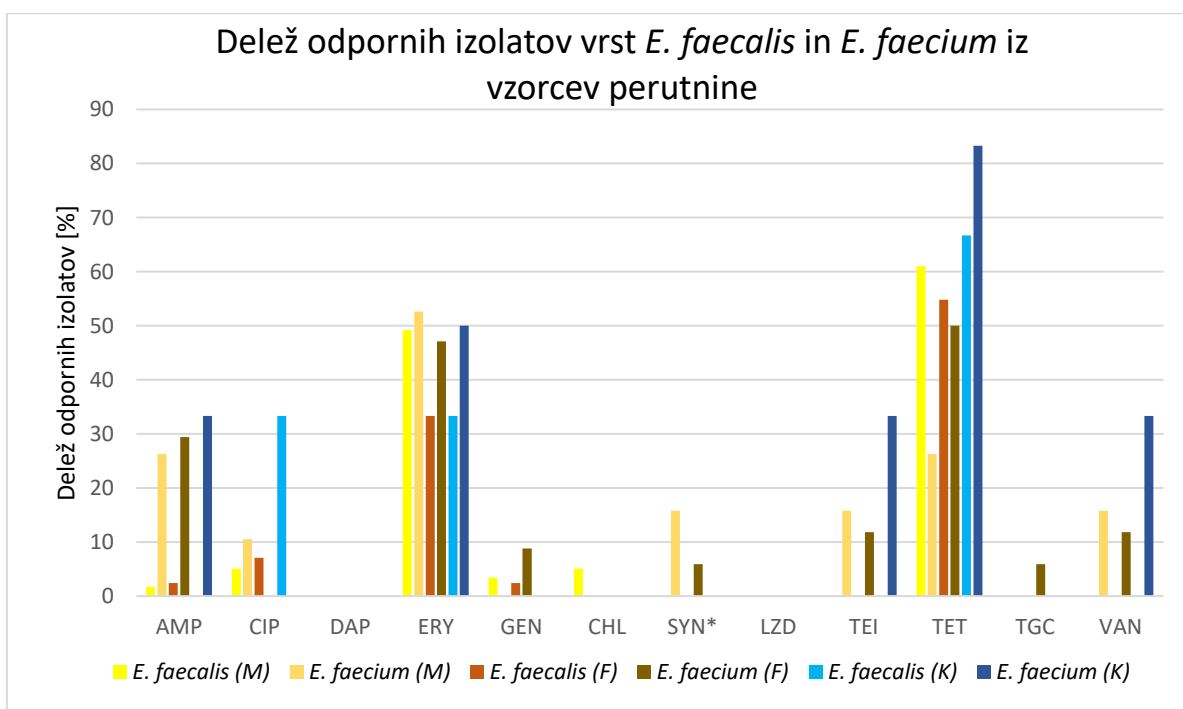
Odpornost proti skupinam protimikrobnih zdravil (število)	Število (delež [%]) izolatov							
	Meso piščancev			Feces piščancev				Perutninska klavnica
	<i>E. gallinarum</i> [n = 1]	<i>E. gilvus</i> [n = 1]	<i>E. hirae</i> [n = 1]	<i>E. casseliflavus</i> [n = 1]	<i>E. durans</i> [n = 2]	<i>E. gallinarum</i> [n = 1]	<i>E. hirae</i> [n = 4]	<i>E. avium</i> [n = 1]
3	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (25,0)	0 (0,0)
<b>VOB</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>1 (25,0)</b>	<b>0 (0,0)</b>
2	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (50,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
1	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	1 (25,0)	0 (0,0)
občutljivi	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (50,0)	1 (100,0)
skupaj	3			8				1

Legenda: V obarvani vrstici je podan seštevek večkratno odpornih izolatov (VOB).



Delež odpornosti proti posameznim antibiotikom ter distribucija vrednosti MIK sta za vse testirane enterokoške iz vzorcev perutnine prikazana v **Prilogah 6–11**.

Med vsemi izolati vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz vzorcev perutnine smo največji delež odpornosti ugotovili proti tetraciklinu in eritromicinu (**Slika 27**). Pri izolatih vrste *E. faecium* smo ne glede na njihov izvor ugotovili večji delež odpornosti tudi proti ampicilinu, teikoplaninu in vankomicinu. Proti vankomicinu (VRE) so bili odporni trije izolati iz mesa, štirje iz fecesa in dva iz klavnice (en izolat smo osamili iz vode v parilniku pred začetkom klanja, drug izolat pa iz brisov piščančjih trupov farme A po zakolu in skubljenju). Sedem izolatov VRE smo uvrstili v skupino VOB, saj je večina izmed njih poleg odpornosti proti glikopeptidom izkazovala odpornost še proti ampicilinu, eritromicinu in tetraciklinu. Pri vseh izolatih VRE smo s testom PCR dokazali prisotnost gena *vanA* za odpornost proti vankomicinu. V nasprotju z izolati vrste *E. faecium* pri izolatih vrste *E. faecalis* nismo ugotovili izolatov VRE, smo pa v povprečju ugotovili večji delež odpornih proti ciprofloksacinu (sklic na sliko/tabelo). Na osnovi visoke vrednosti MIK za gentamicin smo v posebno skupino odpornosti HLAR uvrstili šest enterokokov: dva izolata vrste *E. faecalis* iz mesa in enega iz fecesa ter tri izolate vrste *E. faecium* iz fecesa; vsi so fenotipsko izkazovali odpornost tudi proti drugim antibiotikom in fenotip VOB.



Legenda: AMP, ampicilin; CIP, ciprofloksacin; DAP, daptomicin; ERY, eritromicin; GEN, gentamicin; CHL, kloramfenikol; SYN, kvinupristin/dalfopristin; LZD, linezolid; TEI, teikoplanin; TET, tetraciklin; TGC, tigeciklin; VAN, vankomicin; \*Izolati vrste *E. faecalis* so primarno odporni proti SYN, zato niso prikazani; M, meso piščancev; F, feces piščancev; K, klavnica.

**Slika 27:** Delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz mesa in fecesa piščancev ter perutninske klavnice.

**Figure 27:** Proportion of resistant *E. faecalis* in *E. faecium* isolates from broiler meat, feces and poultry slaughterhouse.

#### 4.2.1.1 Odpornost enterokokov iz mesa piščancev

Največji delež (75,4 %) odpornosti med vsemi enterokoki iz piščančjega mesa smo ugotovili pri izolatih vrste *E. faecalis*, med katerimi jih je bilo šest (10,2 %) odpornih proti trem ali več različnim skupinam antibiotikov. Štirje (6,8 %) izolati vrste *E. faecalis* so bili odporni proti trem različnim antibiotikom (dva izolata z vzorcem odpornosti CIP-ERY-TET in dva z vzorcem CHL-ERY-TET), en (1,7 %) izolat proti štirim (CHL-ERY-GEN-TET) in en (1,7 %) izolat proti petim različnim antibiotikom (AMP-CIP-ERY-GEN-TET) (**Tabela 28**).

Iz **Priloge 6** je razvidno, da je bila več kot polovica (61,0 %) izolatov vrste *E. faecalis* odporna proti tetraciklinu, nekaj manj (49,2 %) pa proti eritromicinu. Manjši delež odpornih izolatov smo ugotovili še proti ciprofloksacinu in kloramfenikolu (oba 5,1 %), gentamicinu (3,4 %) in ampicilinu (1,7 %). Med vsemi izolati je bila sicer najpogostejša odpornost samo proti tetraciklinu (28,8 %), drugi najpogostejši vzorec odpornosti pa ERY-TET (22,0 %). Odpornosti proti ostalim testiranim antibiotikom nismo ugotovili, prav tako v tej skupini nismo ugotovili izolatov VRE.

V nasprotju z izolati vrste *E. faecalis* smo pri izolatih vrste *E. faecium* iz piščančjega mesa ugotovili tri izolate VRE, noben izolat vrste *E. faecium* pa ni bil odporen proti visokim koncentracijam gentamicina (HLAR). Nekaj več kot polovica (52,6 %) izolatov vrste *E. faecium* iz piščančjega mesa je bila odporna proti eritromicinu, proti ampicilinu in tetraciklinu 26,3 % izolatov, proti kvinupristinu/dalfopristinu, teikoplaninu in vankomicinu 15,8 % ter proti ciprofloksacinu 10,5 % izolatov (**Priloga 6**). Tri izolate vrste *E. faecium* smo uvrstili v skupino VOB: en izolat je bil odporen proti trem skupinam antibiotikov (AMP-ERY-TEI-VAN), en proti štirim (AMP-CIP-ERY-TET) in en proti petim različnim skupinam antibiotikov (AMP-CIP-ERY-TET-TEI-VAN) (**Tabela 28**).

Ostali trije izolati vrst *E. gallinarum*, *E. gilvus* in *E. hirae*, ki smo jih prav tako izolirali iz piščančjega mesa, niso izkazovali večkratne odpornosti proti testiranim antibiotikom. Izolat vrste *E. gallinarum* je bil odporen proti tetraciklinu in ciprofloksacinu, izolat vrste *E. gilvus* proti tetraciklinu, medtem ko je bil izolat vrste *E. hirae* dobro občutljiv za vse antibiotike (**Tabela 29, Priloga 7**).

#### 4.2.1.2 Odpornost enterokokov iz fecesa piščancev

Največji delež odpornosti med vsemi enterokoki iz piščančjega fecesa smo ugotovili pri izolatih vrste *E. faecium*, med katerimi jih je bilo šest (17,6 %) odpornih proti trem ali več različnim skupinam antibiotikov (**Tabela 28**). Trije (8,8 %) izolati vrste *E. faecium* so bili odporni proti trem različnim skupinam antibiotikov, od tega sta bila dva izolata odporna proti ampicilinu, tetraciklinu in glikopeptidom (TEI in VAN), en izolat pa proti ampicilinu, eritromicinu in tetraciklinu. V skupino VOB smo uvrstili še tri izolate vrste *E. faecium*, ki so bili odporni proti štirim različnim skupinam antibiotikov z različnim vzorcem odpornosti. Vsi štirikratno odporni

izolati vrste *E. faecium* so bili odporni proti ampicilinu, eritromicinu in tetraciklinu, dva izmed teh sta bila odporna še proti gentamicinu (HLAR), eden pa proti glikopeptidom (VRE).

Iz **Priloge 8** je razvidno, da je bilo največ izolatov vrste *E. faecium* odpornih proti tetraciklinu (50,0 %), eritromicinu (47,1 %) in ampicilinu (29,4 %). Poleg tega so bili odporni tudi proti teikoplaninu in vankomicinu (oba 11,8 %), gentamicinu (8,8 %), kvinupristinu/dalfopristinu in tigeciklinu (oba 5,9 %).

Iz piščančjega fecesa smo izolirali tri večkratno odporne izolate vrste *E. faecalis* (7,1 %) (**Tabela 28**), med katerimi sta bila dva (4,8 %) odporna proti trem različnim skupinam antibiotikov z vzorcem odpornosti CIP-ERY-TET. En izolat vrste *E. faecalis*, odporen proti štirim različnim skupinam antibiotikov (CIP-ERY-GEN-TET), pa smo na osnovi visoke vrednosti MIK za gentamicin uvrstili v skupino HLAR.

V splošnem je bila nekaj več kot polovica (54,8 %) izolatov vrste *E. faecalis* iz piščančjega fecesa odporna proti tetraciklinu, tretjina (33,3 %) proti eritromicinu, v manjšem deležu pa tudi proti ciprofloksacinu (7,1 %), ampicilinu in gentamicinu (oba 2,4 %). Proti vankomicinu odpornih izolatov vrste *E. faecalis* v piščančjem fecesu nismo ugotovili (**Priloga 8**).

Med ostalimi osmimi izolati enterokokov, ki smo jih izolirali iz fecesa piščancev, smo ugotovili en večkratno odporen izolat vrste *E. hirae* (**Tabela 29**) z vzorcem odpornosti CIP-ERY-TET. Proti eritromicinu in tetraciklinu sta bila odporna dva izolata (en vrste *E. durans* in en *E. gallinarum*), izolat vrste *E. durans* je bil odporen proti tetraciklinu, izolat vrste *E. hirae* pa proti eritromicinu. Ostali izolati so bili dobro občutljivi za vse antibiotike (**Priloga 9**).

#### 4.2.1.3 Odpornost enterokokov iz perutninske klavnice

Največji delež (73,3 %) odpornosti med vsemi enterokoki iz piščančje klavnice smo ugotovili pri izolatih vrste *E. faecalis*, med katerimi so bili štirje (26,7 %) odporni proti trem različnim skupinam antibiotikov (**Tabela 28**). Vsi večkratno odporni izolati vrste *E. faecalis* so imeli enak vzorec odpornosti CIP-ERY-TET, izviralni pa so iz vzorcev vode v parilniku pred začetkom klanja, vode v skubilniku (dva izolata) ter brisov trupov piščancev farme A po hlajenju, namenjenih za prodajo.

Iz **Priloge 10** je razvidno, da so bili izolati vrste *E. faecalis* iz perutninske klavnice odporni proti tetraciklinu (66,7 %), ciprofloksacinu in eritromicinu (oba 33,3 %). Odpornosti proti ostalim testiranim antibiotikom nismo ugotovili, prav tako v tej skupini nismo ugotovili izolatov VRE.

V nasprotju z izolati vrste *E. faecalis* smo pri klavniških izolatih vrste *E. faecium* ugotovili dva izolata VRE. Velika večina (83,3 %) izolatov vrste *E. faecium* iz perutninske klavnice je bila odporna proti tetraciklinu, polovica (50,0 %) pa proti eritromicinu. Dva izolata vrste *E. faecium*

VRE sta tako predstavljala tretjino izolatov, ki so bili odporni tudi proti ampicilinu, teikoplaninu in vankomicinu (vsi 33,3 %) (**Priloga 10**).

Izolat vrste *E. avium*, pridobljen iz opranih piščančjih trupov farme C pred hlajenjem, je bil dobro občutljiv za vse testirane antibiotike (**Tabela 29**).

Izolati enterokokov, ki smo jih pridobili iz brisov trupov piščancev, so se glede odpornosti razlikovali med posameznimi farmami (**Tabela 30**). Največ odpornih izolatov smo izolirali iz piščančjih trupov farme A, ki je bila prva na klavni liniji.

Iz vzorcev piščančjih trupov farme A smo izolirali tri izolate vrste *E. faecalis* ter dva izolata vrste *E. faecium*, vsi pa so bili odporni najmanj proti eni skupini testiranih antibiotikov. V skupini izolatov vrste *E. faecalis* je bil izolat trupov po hlajenju, namenjenih za prodajo, odporen proti trem različnim skupinam antibiotikov (CIP-ERY-TET), izolat trupov po visceraciji proti dvema (ERY-TET), izolat trupov po zakolu in skubljenju pa je bil odporen proti eni skupini antibiotikov (CIP). Iz vzorca trupov po zakolu smo izolirali še izolat vrste *E. faecium* VRE, ki je bil odporen proti štirim skupinam antibiotikov (AMP-ERY-TET-TEI-VAN), izolat iz opranih trupov pred hlajenjem pa je bil odporen proti tetraciklinu (**Tabela 30**).

**Tabela 30:** Vzorci odpornosti proti antibiotikom pri enterokokih iz piščančjih farm A, B in C na klavni liniji.  
**Table 30:** Antimicrobial resistance patterns in enterococci from broiler farms A, B and C at the slaughter line.

Farma	Izvor (brisi trupov)	Izolat	Vzorec odpornosti
A	po zakolu in skubljenju	<i>E. faecalis</i>	CIP
		<i>E. faecium</i>	AMP-ERY-TET-TEI-VAN
	po evisceraciji	<i>E. faecalis</i>	ERY-TET
	pred hlajenjem (oprani trupi)	<i>E. faecium</i>	TET
	po hlajenju (za prodajo)	<i>E. faecalis</i>	CIP-ERY-TET
B	po zakolu in skubljenju	<i>E. faecalis</i>	-
		<i>E. faecium</i>	ERY-TET
	po evisceraciji	<i>E. faecalis</i>	-
	po hlajenju (za prodajo)	<i>E. faecalis</i>	TET
C	po zakolu in skubljenju	<i>E. faecalis</i>	-
	po evisceraciji	<i>E. faecalis</i>	-
	pred hlajenjem (oprani trupi)	<i>E. avium</i>	-
	pred hlajenjem (oprani trupi)	<i>E. faecalis</i>	TET
	po hlajenju (za prodajo)	<i>E. faecalis</i>	TET

Iz vzorcev piščančjih trupov farme B smo pridobili tri izolate vrste *E. faecalis* ter en izolat vrste *E. faecium*. Dva izolata vrste *E. faecalis* sta bila dobro občutljiva za vse antibiotike, izolat vrste *E. faecalis* iz trupov po hlajenju, namenjenih za prodajo, pa je bil odporen proti tetraciklinu. Izolat vrste *E. faecium* iz trupov po zakolu in skubljenju je bil odporen proti dvema skupinama antibiotikov (ERY-TET) (**Tabela 30**).

Iz vzorcev piščančjih trupov farme C smo pridobili štiri izolate vrste *E. faecalis* ter en izolat vrste *E. avium*. Izolata vrste *E. faecalis* iz trupov med zakolom in skubljenjem ter po evisceraciji, poleg tega pa tudi izolat vrste *E. avium* iz opranih trupov pred hlajenjem so bili dobro občutljivi za vse antibiotike, medtem ko sta bila izolata vrste *E. faecalis* iz trupov pred hlajenjem ter po hlajenju (za prodajo) odporna proti tetraciklinu (**Tabela 30**).

#### 4.2.2 Geni za virulenčne dejavnike pri enterokokih iz vzorcev perutnine

Pri enterokokih iz mesa in fecesa piščancev ter perutninske klavnice smo ugotovili pet od sedmih iskanih genov za virulenčne dejavnike (nismo ugotovili genov *esp* in *hyl*). Gene za virulenčne dejavnike so imeli samo izolati vrste *E. faecalis*, medtem ko pri vrstah *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. gilvus* in *E. hirae* nismo odkrili nobenega od preiskovanih genov (**Tabela 31**).

Delež posameznih genov se je razlikoval glede na izvor izolatov vrste *E. faecalis*. Gen *efaA* smo ugotovili pri vseh izolatih (100,0 %), pri večini pa tudi gen *gelE* (meso 93,2 %; feces 97,6 %; klavnica 100 %). Pri večini izolatov vrste *E. faecalis* iz mesa in fecesa piščancev smo ugotovili tudi gen *ace* (meso 84,7 %; feces 83,3 %), medtem ko je bil ta gen pri izolatih iz klavnice malo manj pogost (66,7 %). Nasprotno pa sta bila gena *asaI* in *cylA* pogosteje ugotovljena pri izolatih iz klavnice kot pri izolatih iz mesa ali fecesa. Delež posameznih genov za virulenčne dejavnike, glede na izvor izolatov vrste *E. faecalis*, je naveden v **Tabeli 31**.

**Tabela 31:** Prisotnost genov za virulenčne dejavnike pri izolatih vrste *E. faecalis* iz mesa in fecesa piščancev ter perutninske klavnice.

**Table 31:** The presence of virulence genes in *E. faecalis* isolates from broiler meat, feces and poultry slaughterhouse.

Gen za virulenčni dejavnik	Število (delež [%]) izolatov		
	<i>E. faecalis</i> (meso) [n = 59]	<i>E. faecalis</i> (feces) [n = 42]	<i>E. faecalis</i> (klavnica) [n = 15]
<i>ace</i>	50 (84,7)	35 (83,3)	10 (66,7)
<i>asaI</i>	32 (54,2)	25 (59,5)	11 (73,3)
<i>cylA</i>	3 (5,1)	6 (14,3)	7 (46,7)
<i>efaA</i>	59 (100,0)	42 (100,0)	15 (100,0)
<i>esp</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>gelE</i>	55 (93,2)	41 (97,6)	15 (100,0)
<i>hyl</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Legenda: *ace*, gen, ki kodira protein za vezavo kolegena; *asaI*, gen, ki kodira agregacijsko snov; *cylA*, gen, ki kodira citolizin; *efaA*, gen, ki kodira antigen *Enterococcus faecalis*; *esp*, gen, ki kodira enterokokni površinski protein; *gelE*, gen, ki kodira želatinazo; *hyl*, gen, ki kodira hialuronidazo.

Pri izolatih vrste *E. faecalis* iz mesa piščancev smo ugotovili sedem različnih virulenčnih tipov, med katerimi sta bila najpogostejša vzorca *ace-asaI-efaA-gelE* pri 22 (37,3 %) izolatih in *ace-efaA-gelE* pri 21 (35,6 %) izolatih (**Tabela 32**). Trije izolati vrste *E. faecalis* iz mesa so imeli vseh pet ugotovljenih genov hkrati.

Prav tako kot pri izolatih iz mesa smo enaka virulenčna tipa najpogosteje ugotovili tudi pri izolatih vrste *E. faecalis* iz fecesa piščancev, in sicer kombinacijo genov *ace-asa1-efaA-gelE* pri 16 (38,1 %) izolatih in *ace-efaA-gelE* pri 15 (35,7 %) izolatih (**Tabela 32**). Pri izolatih iz fecesa smo sicer ugotovili sedem različnih virulenčnih tipov, ki so bili večinoma enaki tistim iz mesa. Vsi izolati vrste *E. faecalis* iz fecesa so vsebovali vsaj dva gena za virulenčne dejavnike, med njimi smo pri treh našli pet iskanih genov hkrati.

V skupini izolatov vrste *E. faecalis* iz perutninske klavnice pa smo ugotovili šest različnih virulenčnih tipov z najpogostejšim vzorcem *ace-asa1-cylA-efaA-gelE* (**Tabela 32**). Tak virulenčni tip smo ugotovili pri šestih (40,0 %) izolatih, in sicer pri izolatih iz parilnika (vode pred začetkom klanja), skubilnika (na začetku in koncu), naključne klavniške površine, na trupih piščancev farme A po zakolu in skubljenju ter istih trupih po hlajenju, namenjenih za prodajo. Pri vseh izolatih smo ugotovili najmanj dva gena za virulenčne dejavnike (**Tabela 32**).

Skupaj smo pri vseh enterokokih iz vzorcev perutnine ugotovili osem različnih virulenčnih tipov, od katerih se je večina pojavljala pri vseh izolatih vrste *E. faecalis*, ne glede na njihov izvor. Nekateri virulenčni tipi pa so se pojavili samo pri posameznih skupinah, npr. kombinacija genov *ace-efaA* samo pri izolatih iz mesa, kombinacija genov *asa1-cylA-efaA-gelE* samo pri izolatih iz fecesa in klavnice ter kombinacija *ace-asa1-efaA* samo pri izolatih iz mesa in fecesa. Virulenčni tipi in njihov delež pri izolatih vrste *E. faecalis* iz različnih perutninskih vzorcev so prikazani v **Tabeli 32**.

**Tabela 32:** Virulenčni tipi, ugotovljeni pri izolatih vrste *E. faecalis* iz mesa in fecesa piščancev ter perutninske klavnice.

**Table 32:** Virulence patterns observed in *E. faecalis* isolates from broiler meat, feces and poultry slaughterhouse.

Virulenčni tip	Število (delež [%]) izolatov		
	<i>E. faecalis</i> (meso) [n = 59]	<i>E. faecalis</i> (feces) [n = 42]	<i>E. faecalis</i> (klavnica) [n = 15]
<i>ace-asa1-cylA-efaA-gelE</i>	3 (5,1)	3 (7,1)	<b>6 (40,0)</b>
<i>ace-asa1-efaA-gelE</i>	<b>22 (37,3)</b>	<b>16 (38,1)</b>	3 (20,0)
<i>asa1-cylA-efaA-gelE</i>	0 (0,0)	3 (7,1)	1 (6,7)
<i>ace-asa1-efaA</i>	2 (3,4)	1 (2,4)	0 (0,0)
<i>ace-efaA-gelE</i>	<b>21 (35,6)</b>	<b>15 (35,7)</b>	1 (6,7)
<i>asa1-efaA-gelE</i>	5 (8,5)	2 (4,8)	1 (6,7)
<i>ace-efaA</i>	2 (3,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>efaA-gelE</i>	4 (6,8)	2 (4,8)	3 (20,0)
brez genov za virulenčne dejavnike	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Legenda: *ace*, gen, ki kodira protein za vezavo kolegena; *asa1*, gen, ki kodira agregacijsko snov; *cylA*, gen, ki kodira citolizin; *efaA*, gen, ki kodira antigen *Enterococcus faecalis*; *esp*, gen, ki kodira enterokokni površinski protein; *gelE*, gen, ki kodira želatinazo; *hyl*, gen, ki kodira hialuronidazo.

S krepko pisavo so označene kombinacije genov za virulenčne dejavnike, ki so bile najpogostejše pri izolatih vrste *E. faecalis* v tej skupini.

### 4.3 ENTEROKOKI PRI PRAŠIČIH

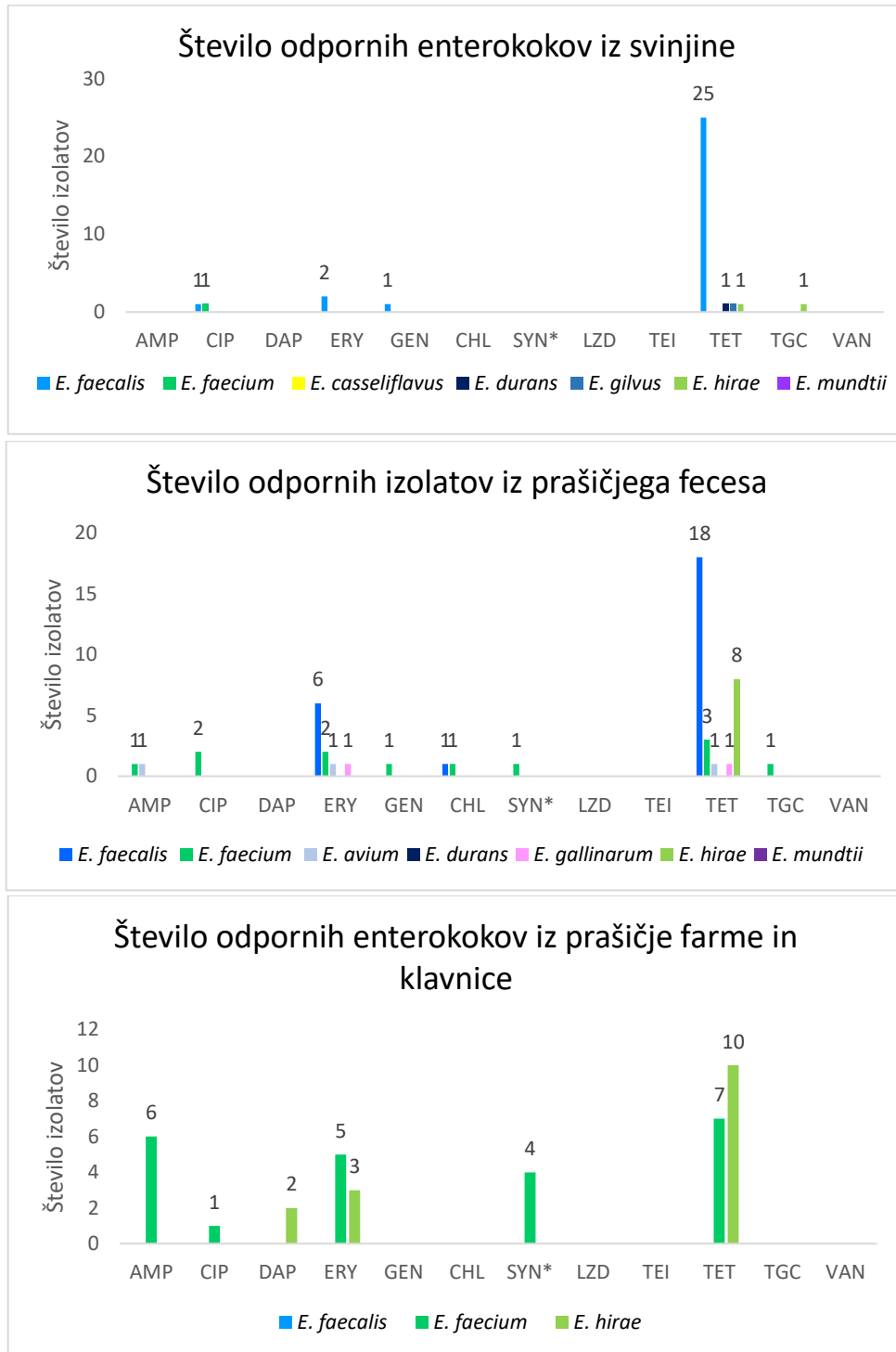
V to skupino smo zajeli enterokoke iz mesa in fecesa prašičev ter vzorcev prašičje farme tik pred klanjem in prašičje klavnice.

#### 4.3.1 Odpornost enterokokov iz mesa in fecesa prašičev ter prašičje farme in klavnice

Vsi izolati, pridobljeni iz vzorcev prašičev, so bili dobro občutljivi za linezolid in teikoplanin, znotraj posameznih skupin enterokokov pa smo ugotovili različne kombinacije odpornosti. Izolati iz svinjine so bili dobro občutljivi za šest antibiotikov, poleg že zgoraj navedenih linezolida in teikoplanina še za ampicilin, daptomicin, kloramfenikol in vankomicin (**Slika 28, Prilogi 12 in 13**). Izolati iz fecesa so bili dobro občutljivi tudi za daptomicin (**Slika 28, Prilogi 14 in 15**), izolati iz prašičje farme in klavnice pa še za kloramfenikol, gentamicin, tigeciklin in vankomicin (**Slika 28, Prilogi 16 in 17**).

Med vsemi 206 izolati jih je bilo 119 (57,8 %) dobro občutljivih za vse testirane antibiotike, medtem ko je preostalih 87 (42,2 %) enterokokov fenotipsko izkazovalo odpornost proti vsaj enemu izmed testiranih antibiotikov (**Tabeli 33 in 34**). Delež odpornih izolatov se je razlikoval tako glede na njihov izvor kot na posamezno vrsto. Odpornost proti vsaj enemu izmed testiranih antibiotikov je izkazovalo 35,3 % enterokokov iz svinjine, 42,1 % iz fecesa prašičev ter 66,7 % iz prašičje farme in klavnice. V skupini enterokokov iz mesa in fecesa prašičev smo večji delež odpornih izolatov ugotovili pri vrsti *E. faecalis* (svinjina 38,2 %; feces 50,0 %), medtem ko izolati vrste *E. faecalis* iz prašičje farme in klavnice niso izkazovali nobene odpornosti proti testiranim antibiotikom (**Tabela 33**). V tej skupini so bili bolj odporni izolati vrste *E. faecium*, saj je bilo vseh sedem odpornih najmanj proti dvema različnima antibiotikoma (**Tabela 33**). Proti vankomicinu odpornih izolatov, razen pri treh izolatih vrste *E. gallinarum* iz fecesa prašičev, nismo ugotovili (**Tabela 34**).

V skupino večkratno odpornih enterokokov smo uvrstili en izolat iz mesa, štiri iz fecesa in pet iz prašičje farme tik pred klanjem, medtem ko na klavni liniji večkratno odpornih enterokokov nismo ugotovili. V skupino VOB smo tako uvrstili izolat vrste *E. faecalis* iz svinjine z vzorcem odpornosti ERY-GEN-TET, šest izolatov vrste *E. faecium* (en iz fecesa z vzorcem odpornosti CHL-ERY-GEN-TET, pet izolatov pa iz farme z različnimi vzorci odpornosti) ter druge vrste enterokokov iz vzorcev fecesa (izolat vrste *E. avium* z vzorcem odpornosti AMP-ERY-TET in vrste *E. gallinarum* z vzorcem odpornosti ERY-TET-VAN) (**Tabeli 33 in 34**).



Legenda: AMP, ampicilin; CIP, ciprofloksacin; DAP, daptomicin; ERY, eritromicin; GEN, gentamicin; CHL, kloramfenikol; SYN, kvinupristin/dalfopristin; LZD, linezolid; TEI, teikoplanin; TET, tetraciklin; TGC, tigeciklin; VAN, vankomicin; \*Izolati vrste *E. faecalis* so primarno odporni proti SYN, zato niso prikazani. Izolati vrst *E. casseliflavus* in *E. gallinarum* so primarno odporni proti vankomicinu.

**Slika 28:** Število odpornih enterokokov iz svinjine fecesa prašičev ter prašičje farme in klavnice.

**Figure 28:** Number of resistant enterococci from pork, pig feces, pig farm and pig slaughterhouse.



**Tabela 33:** Število in delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz svinjine, fecesa prašičev ter iz prašičje farme in klavnice glede na občutljivost za različne skupine protimikrobnih zdravil.

**Table 33:** Number and proportion of resistant isolates of *E. faecalis* and *E. faecium* from pork, pig feces, pig farm and pig slaughterhouse according to susceptibility to different groups of antimicrobials.

Odpornost proti skupinam protimikrobnih zdravil (število)	Število (delež [%]) izolatov					
	Svinjina		Feces prašičev		Prašičja farma in klavnica	
	<i>E. faecalis</i> [n = 68]	<i>E. faecium</i> [n = 10]	<i>E. faecalis</i> [n = 38]	<i>E. faecium</i> [n = 19]	<i>E. faecalis</i> [n = 8]	<i>E. faecium</i> [n = 7]
4	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,3)	0 (0,0)	4 (57,1)
3	1 (1,5)	0 (0,0)	1 (2,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (14,3)
<b>VOB</b>	<b>1 (1,5)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>1 (2,6)</b>	<b>1 (5,3)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>5 (71,4)</b>
2	1 (1,5)	0 (0,0)	4 (10,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (16,7)
1	24 (35,3)	1 (10,0)	14 (36,9)	7 (36,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
občutljivi	42 (61,8)	9 (90,0)	19 (50,0)	11 (57,9)	8 (100,0)	0 (0,0)
skupaj	78		54		15	

Legenda: V obarvani vrstici je podan seštevek večkratno odpornih izolatov (VOB).

**Tabela 34:** Število in delež odpornih izolatov drugih vrst enterokokov iz svinjine, fecesa prašičev ter iz prašičje farme in klavnice glede na občutljivost za različne skupine protimikrobnih zdravil.

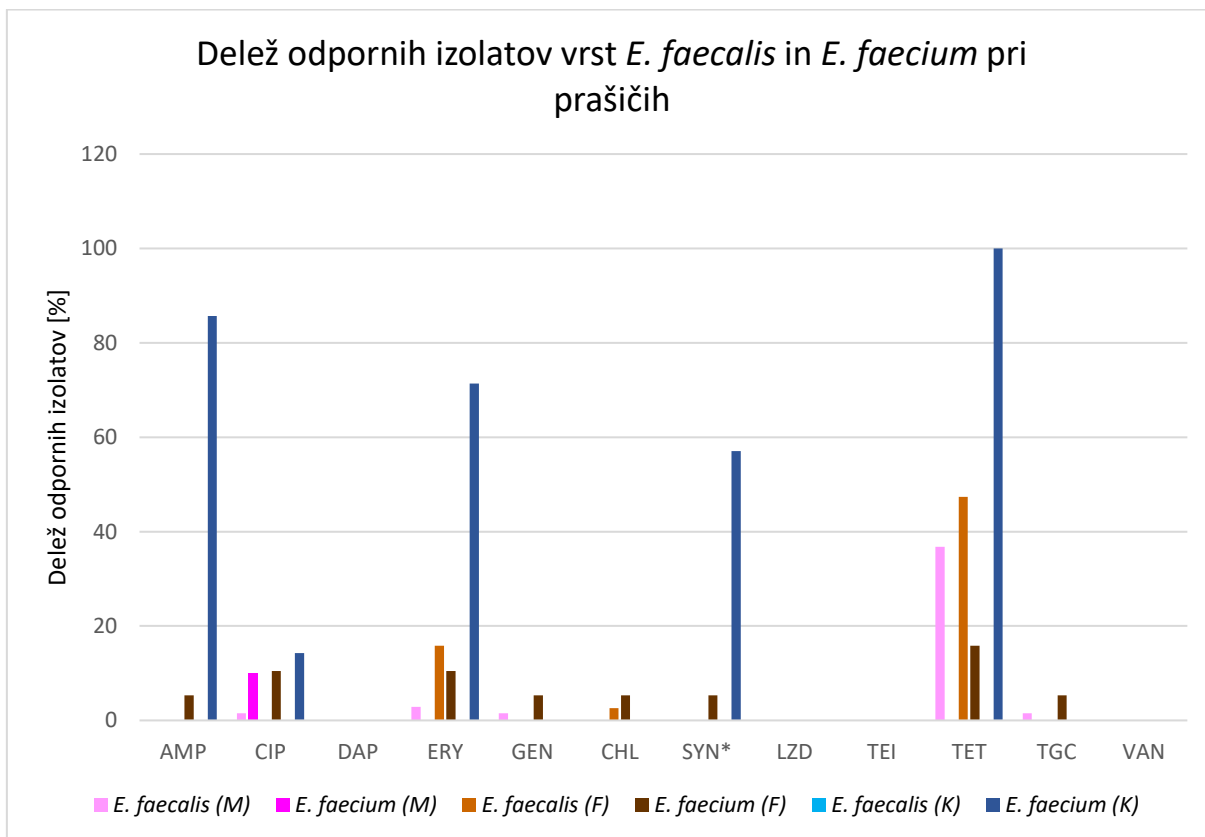
**Table 34:** Number and proportion of resistant isolates of other enterococcal species from pork, pig feces, pig farm and pig slaughterhouse according to susceptibility to different groups of antimicrobials.

Odpornost proti skupinam protimikrobnih zdravil (število)	Število (delež [%]) izolatov						
	Svinjina			Feces prašičev			Prašičja farma in klavnica
	<i>E. durans</i> [n = 2]	<i>E. gilvus</i> [n = 1]	<i>E. hirae</i> [n = 1]	<i>E. avium</i> [n = 1]	<i>E. gallinarum</i> [n = 3]	<i>E. hirae</i> [n = 28]	<i>E. hirae</i> [n = 12]
3	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<b>VOB</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>1 (100,0)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>0 (0,0)</b>
2	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (33,3)	0 (0,0)	4 (33,3)
1	1 (50,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (66,7)	8 (28,6)	7 (58,3)
občutljivi	1 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	20 (71,4)	1 (8,3)
skupaj*	7			37			12

Legenda: V obarvani vrstici je podan seštevek večkratno odpornih izolatov (VOB).

\*: Seštevek pomeni vsoto vseh izolatov, tudi tistih, ki so izključeni iz tabele; Vrste enterokokov, pri katerih nismo ugotovili odpornosti proti antibiotikom, so izvzete iz tabele. V to skupino spadajo: vrsti *E. casseliflavus* (n = 2) in *E. mundtii* (n = 2) iz vzorcev mesa ter vrsti *E. durans* (n = 4) in *E. mundtii* (n = 1) iz vzorcev fecesa. Izolati vrst *E. casseliflavus* in *E. gallinarum* so primarno odporni proti vankomicinu.

Iz **Slike 29** lahko vidimo, da med vsemi izolati vrst *E. faecalis* in *E. faecium* pri prašičih glede odpornosti najbolj izstopajo izolati vrste *E. faecium* iz prašičje farme in klavnice z visokim deležem odpornosti proti tetraciklinu, ampicilinu, eritromicinu in kvinopristinu/dalfopristinu. Povečano odpornost proti tetraciklinu smo ugotovili tudi pri izolatih vrste *E. faecalis* iz mesa ter obeh vrstah iz vzorcev fecesa. Več izolatov je bilo odpornih tudi proti eritromicinu in ciprofloksacinu. Proti vankomicinu odpornih enterokokov v tej skupini nismo ugotovili, en izolat vrste *E. faecalis* iz svinjine pa smo na osnovi visoke vrednosti MIK za gentamicin uvrstili v posebno skupino odpornosti HLAR.



Legenda: AMP, ampicilin; CIP, ciprofloksacin; DAP, daptomicin; ERY, eritromicin; GEN, gentamicin; CHL, kloramfenikol; SYN, kvinupristin/dalfopristin; LZD, linezolid; TEI, teikoplanin; TET, tetraciklin; TGC, tigeciklin; VAN, vankomicin; \*Izolati vrste *E. faecalis* so primarno odporni proti SYN, zato niso prikazani; M, meso prašičev; F, feces prašičev; K, prašičja farma in klavnica.

**Slika 29:** Delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz svinjine, fecesa prašičev ter iz prašičje farme in klavnice.

**Figure 29:** Proportion of resistant *E. faecalis* in *E. faecium* isolates from pork, pig feces, pig farm and pig slaughterhouse.

Delež odpornosti proti posameznim antibiotikom ter distribucija vrednosti MIK sta za vse testirane enterokoke pri prašičih prikazana v **Prilogah 12–17**.

#### 4.3.1.1 Odpornost enterokokov iz svinjine

Največji delež odpornosti med vsemi izolati iz svinjine smo ugotovili pri izolatih vrste *E. faecalis*, med katerimi pa je bil le eden (1,5 %), odporen proti trem različnim skupinam antibiotikov z vzorcem odpornosti ERY-GEN-TET (**Tabela 33**). Ta izolat smo zaradi visoke vrednosti MIK za gentamicin uvrstili v skupino HLAR.

Izolati vrste *E. faecalis* iz svinjine so bili večinoma najbolj odporni proti tetraciklinu (36,8 %), v manjšem deležu pa še proti eritromicinu (2,9 %), ciprofloksacinu, gentamicinu in tigeciklinu (vsi 1,5 %) (**Priloga 12**). Poleg večkratno odpornega izolata vrste *E. faecalis* je bil v tej skupini še en izolat, odporen proti dvema skupinama antibiotikov z vzorcem odpornosti ERY-TET, 24 izolatov vrste *E. faecalis* pa je bilo odpornih samo proti eni skupini antibiotikov (23 izolatov samo proti tetraciklinom in en samo proti ciprofloksacinu) (**Tabela 33**).

Pri izolatih vrste *E. faecium* iz svinjine smo ugotovili le en, proti ciprofloksacinu odporen izolat, medtem ko so bili vsi ostali izolati vrste *E. faecium* dobro občutljivi (**Tabela 33**).

Tako kot pri izolatih vrste *E. faecium* tudi pri ostalih enterokokih iz svinjine nismo ugotovili izolatov VOB (**Tabela 34**). V tej skupini smo ugotovili le odpornost proti skupini tetraciklinov, in sicer proti tetraciklinu (42,9 %) in tigeciklinu (14,3 %) (**Priloga 13**). Izolat vrste *E. hirae* je bil odporen proti obema antibiotikoma (TET-TGC), izolata vrst *E. durans* in *E. gilvus* pa samo proti tetraciklinu.

#### 4.3.1.2 Odpornost enterokokov iz fecesa prašičev

Največji delež odpornosti med vsemi enterokoki iz prašičjega fecesa smo ugotovili pri izolatih vrste *E. faecalis*, kjer je bila polovica izolatov odpornih vsaj proti enemu antibiotiku (**Tabela 33**). Izmed vseh 38 izolatov je bil en (2,6%) hkrati odporen proti eritromicinu, kloramfenikolu in tetraciklinu, zato smo ga zato uvrstili v skupino VOB (**Tabela 33**). Skoraj polovica (47,4 %) izolatov je bila odpornih proti tetraciklinu, proti eritromicinu jih je bilo odpornih 15,8 %, proti kloramfenikolu pa 2,6 % (**Priloga 14**).

Iz **Priloge 14** je razvidno, da je bilo največ izolatov vrste *E. faecium* prav tako odpornih proti tetraciklinu (15,8 %). Poleg tega so bili odporni še proti ciprofloksacinu in eritromicinu (oba 10,5 %) ter v manjšem deležu tudi proti ampicilinu, gentamicinu, kloramfenikolu, kvinupristinu/dalfopristinu in tigeciklinu (vsi 5,3 %). Osem (42,1 %) izolatov vrste *E. faecium* je bilo odpornih vsaj proti enemu antibiotiku, med njimi pa je bil eden (5,3 %) štirikratno odporen proti eritromicinu, gentamicinu, kloramfenikolu in tetraciklinu (**Tabela 33**).

Proti vankomicinu odpornih izolatov (VRE) vrst *E. faecalis* in *E. faecium* v fecesu prašičev nismo ugotovili, prav tako ne izolatov z odpornostjo proti visokim koncentracijam aminoglikozidov (HLAR).

Med ostalimi izolati enterokokov, ki smo jih prav tako izolirali iz fecesa prašičev (**Slika 28**), jih je bila približno tretjina (32,4 %) odpornih proti vsaj enemu antibiotiku (**Tabela 34**). Izolati vrste *E. hirae* so bili v 28,6 % odporni proti tetraciklinu (**Priloga 15**), vsi trije izolati vrste *E. gallinarum* pa so tudi fenotipsko izkazovali odpornost proti vankomicinu. V tej skupini smo ugotovili en večkratno odporen izolat vrste *E. avium* (2,7 %) z vzorcem odpornosti AMP-ERY-TET (**Tabela 34**). Izolat vrste *E. gallinarum* je bil odporen proti tetraciklinu in eritromicinu. Izolati vrst *E. durans* in *E. mundtii* pa so bili dobro občutljivi za vse antibiotike.

#### 4.3.1.3 Odpornost enterokokov iz prašičje farme in klavnice

Iz **Tabela 33** je razvidno, da so bili vsi izolati vrste *E. faecalis* iz prašičje farme in klavnice dobro občutljivi za vse testirane antibiotike. Nasprotno pa so bili vsi izolati vrste *E. faecium* odporni najmanj proti dvema različnima skupinama antibiotikov, med njimi smo pet izolatov vrste *E. faecium* (71,4 %), pridobljenih iz različnih vzorcev na prašičji farmi tik pred klanjem, uvrstili v skupino VOB (**Tabela 33**). Izolat vrste *E. faecium*, pridobljen iz hlevskih prezračevalnikov, je bil odporen proti trem skupinam antibiotikov z vzorcem odpornosti ERY-SYN-TET. Štirje (57,1 %) izolati vrste *E. faecium* pa so bili odporni proti štirim skupinam antibiotikov; trije od njih (iz nosnih brisov prašičev, vode iz napajalnikov ter brisov okenskih polic) so imeli isti vzorec odpornosti AMP-ERY-SYN-TET, izolat iz hlevskega zraka pa je imel vzorec odpornosti AMP-CIP-ERY-TET. Na klavni liniji nismo ugotovili večkratno odpornih izolatov vrste *E. faecium*; dva izolata (bris trupov po omamljanju in vzorec črevesne vsebine) sta bila odporna proti ampicilinu in tetraciklinu.

Vsi izolati vrste *E. faecium* iz prašičje farme in klavnice so bili odporni proti tetraciklinu (100,0 %), večina tudi proti ampicilinu (85,7 %) in eritromicinu (71,4 %), v nekaj manjšem deležu pa še proti kvinupristinu/dalfopristinu (57,1 %) in ciprofloksacinu (14,3 %) (**Priloga 16**).

Iz različnih vzorcev na prašičji farmi ter vzdolž klavne linije smo pridobili 12 izolatov vrste *E. hirae*, med katerimi je bila večina (83,3 %) odporna proti tetraciklinu, poleg tega pa tudi proti eritromicinu (25,0 %) in daptomicinu (16,7 %) (**Priloga 17**). Na farmi smo ugotovili tri izolate vrste *E. hirae* (v nastilju, iz brisov prezračevalnikov in brisov okenskih polic) z vzorcem odpornosti ERY-TET, izolat vrste *E. hirae* s tal kamiona za prevoz prašičev do klavnice je bil odporen proti daptomicinu, iz črevesne vsebine na klavni liniji pa smo pridobili še izolat vrste *E. hirae* z vzorcem odpornosti DAP-TET. Večkratno odpornih izolatov vrste *E. hirae* nismo ugotovili (**Tabela 34**).

#### 4.3.2 Geni za virulenčne dejavnike pri enterokokih iz vzorcev prašičev

Pri enterokokih iz mesa in fecesa prašičev smo ugotovili vse iskane gene za virulenčne dejavnike, razen gena *hyl*. Nasprotno pa smo pri izolatih iz prašičje farme in klavnice ugotovili samo tri (*ace*, *efaA* in *gelE*) od sedmih iskanih genov za virulenčne dejavnike (**Tabela 35**). Iz vseh skupin vzorcev pri prašičih so bili nosilci teh genov le izolati vrste *E. faecalis*, poleg tega

pa še en izolat vrste *E. mundtii* iz svinjine. Pri ostalih vrstah (*E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. gilvus* in *E. hirae*) nismo odkrili nobenega od preiskovanih genov.

**Tabela 35:** Prisotnost genov za virulenčne dejavnike pri izolatih vrste *E. faecalis* iz mesa in fecesa prašičev ter prašičje farne in klavnice.

**Table 35:** The presence of virulence genes in *E. faecalis* isolates from pig meat, feces, farm and slaughterhouse.

Gen za virulenčni dejavnik	Število (delež [%]) izolatov			
	<i>E. faecalis</i> (meso) [n = 68]	<i>E. mundtii</i> (meso) [n = 1]	<i>E. faecalis</i> (feces) [n = 38]	<i>E. faecalis</i> (farma in klavnica) [n = 8]
<i>ace</i>	47 (69,1)	1 (100,0)	32 (84,2)	3 (37,5)
<i>asaI</i>	29 (42,6)	0 (0,0)	13 (34,2)	0 (0,0)
<i>cylA</i>	3 (4,4)	0 (0,0)	2 (5,3)	0 (0,0)
<i>efaA</i>	64 (94,1)	1 (100,0)	38 (100,0)	8 (100,0)
<i>esp</i>	7 (10,3)	0 (0,0)	3 (7,9)	0 (0,0)
<i>gelE</i>	46 (67,6)	1 (100,0)	37 (97,4)	8 (100,0)
<i>hyl</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Legenda: *ace*, gen, ki kodira protein za vezavo kolegena; *asaI*, gen, ki kodira agregacijsko snov; *cylA*, gen, ki kodira citolizin; *efaA*, gen, ki kodira antigen *Enterococcus faecalis*; *esp*, gen, ki kodira enterokokni površinski protein; *gelE*, gen, ki kodira želatinazo; *hyl*, gen, ki kodira hialuronidazo.

Delež posameznih genov se je razlikoval glede na izvor izolatov vrste *E. faecalis*, pri vseh pa so prevladovali geni *efaA*, *gelE* in *ace*. Pri izolatih vrste *E. faecalis* iz svinjine smo najpogosteje ugotovili gene *efaA* (94,1 %), *ace* (69,1 %) in *gelE* (67,6 %), v manjšem deležu pa gene *asaI* (42,6 %), *esp* (10,3 %) in *cylA* (4,4 %). Pri vseh 38 izolatih vrste *E. faecalis* iz fecesa smo ugotovili gen *efaA* (100,0 %), pri večini tudi gena *gelE* (97,4 %) in *ace* (84,2 %), v manjšem deležu pa še gene *asaI* (34,2 %), *esp* (7,9 %) in *cylA* (5,3 %). Vsi izolati vrste *E. faecalis* iz prašičje farne in klavnice so bili nosilci genov *efaA* in *gelE* (oba 100,0 %), malo več kot tretjina pa še gena *ace* (37,5 %). Ostalih genov pri izolatih vrste *E. faecalis* iz prašičje farne in klavnice nismo ugotovili (**Tabela 35**).

Število ugotovljenih virulenčnih tipov se je prav tako razlikovalo glede na izvor izolatov. Največ različnih virulenčnih tipov smo ugotovili pri izolatih vrste *E. faecalis* iz mesa, dva izolata v tej skupini pa nista bila nosilca nobenega izmed iskanih genov (**Tabela 36**). Med 15 različnimi virulenčnimi tipi pri izolatih iz mesa so bile najpogosteje zastopane kombinacije genov *ace-efaA-gelE* pri 16 (23,5 %) izolatih, *ace-asaI-efaA-gelE* pri 12 (17,6 %) izolatih in *ace-efaA* pri devetih (13,2 %) izolatih (**Tabela 36**). Pri izolatu vrste *E. mundtii* iz mesa smo prav tako ugotovili najpogostejšo kombinacijo genov *ace-efaA-gelE*.

Pri izolatih vrste *E. faecalis* iz fecesa smo ugotovili 10 virulenčnih tipov z najpogostejšim vzorcem *ace-efaA-gelE* pri 19 (50,0 %) izolatih in *ace-asaI-efaA-gelE* pri devetih (23,7 %) izolatih (**Tabela 36**). Vsi izolati iz fecesa so imeli vsaj dva gena za virulenčne dejavnike.

V skupini izolatov vrste *E. faecalis* iz prašičje farme in klavnice smo ugotovili le dva različna virulenčna tipa (**Tabela 36**). Pogostejši vzorec *efaA-gelE* smo našli pri petih (62,5%) izolatih vrste *E. faecalis*, ki so pripadali vzorcem nosnih brisov prašičev in brisom boksov v višini prašičjih nosov na farmi ter še trem vzorcem brisov trupov pred hlajenjem na klavnici. Tip *ace-efaA-gelE* smo ugotovili pri treh (37,5 %) izolatih vrste *E. faecalis* iz vzorcev umazane bazenske vode ter brisov noža mesarja po evisceraciji in noža veterinarja na klavni liniji.

Skupaj smo pri vseh enterokokih iz vzorcev prašičev ugotovili 17 različnih virulenčnih tipov. Večina se jih je pojavila predvsem pri izolatih iz mesa, razen kombinacij *ace-asa1-efaA-esp-gelE* in *ace-cylA-efaA-gelE*, ki smo ju našli samo pri izolatih iz fecesa. Virulenčni tipi in njihov delež pri izolatih vrste *E. faecalis* iz različnih vzorcev prašičev so navedeni v **Tabeli 36**.

**Tabela 36:** Virulenčni tipi, ugotovljeni pri izolatih vrste *E. faecalis* iz mesa in fecesa pašičev ter prašičje farme in klavnice.

**Table 36:** Virulence patterns observed in *E. faecalis* isolates from pig meat, feces, farm and slaughterhouse.

Virulenčni tip	Število (delež [%]) izolatov		
	<i>E. faecalis</i> (meso) [n = 68]	<i>E. faecalis</i> (feces) [n = 38]	<i>E. faecalis</i> (farma in klavnica) [n = 8]
<i>ace-asa1-cylA-efaA-esp</i>	2 (2,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>ace-asa1-cylA-efaA-gelE</i>	1 (1,5)	1 (2,6)	0 (0,0)
<i>ace-asa1-efaA-esp-gelE</i>	0 (0,0)	1 (2,6)	0 (0,0)
<i>ace-asa1-efaA-gelE</i>	12 (17,6)	9 (23,7)	0 (0,0)
<i>ace-cylA-efaA-gelE</i>	0 (0,0)	1 (2,6)	0 (0,0)
<i>ace-efaA-esp-gelE</i>	2 (2,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>asa1-efaA-esp-gelE</i>	1 (1,5)	1 (2,6)	0 (0,0)
<i>ace-asa1-efaA</i>	5 (7,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
<b><i>ace-efaA-gelE</i></b>	<b>16 (23,5)</b>	<b>19 (50,0)</b>	3 (37,5)
<i>asa1-efaA-gelE</i>	5 (7,4)	1 (2,6)	0 (0,0)
<i>efaA-esp-gelE</i>	3 (4,4)	1 (2,6)	0 (0,0)
<i>ace-efaA</i>	9 (13,2)	1 (2,6)	0 (0,0)
<i>asa1-efaA</i>	1 (1,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>asa1-gelE</i>	1 (1,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
<b><i>efaA-gelE</i></b>	4 (5,9)	3 (7,9)	<b>5 (62,5)</b>
<i>efaA</i>	3 (4,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>gelE</i>	1 (1,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
brez genov za virulenčne dejavnike	2 (2,9)	0 (0,0)	0 (0,0)

Legenda: *ace*, gen, ki kodira protein za vezavo kolegena; *asa1*, gen, ki kodira agregacijsko snov; *cylA*, gen, ki kodira citolizin; *efaA*, gen, ki kodira antigen *Enterococcus faecalis*; *esp*, gen, ki kodira enterokokni površinski protein; *gelE*, gen, ki kodira želatinazo; *hyl*, gen, ki kodira hialuronidazo.

S krepko pisavo so označene kombinacije genov za virulenčne dejavnike, ki so bile najpogostejše pri izolatih vrste *E. faecalis* v tej skupini.

#### 4.4 ENTEROKOKI PRI PREŽVEKOVALCIH

V to skupino smo zajeli enterokoke iz govejega mesa ter mleka in mlečnih izdelkov krav, ovc in koz.

##### 4.4.1 Odpornost enterokokov iz govedine ter mleka in mlečnih izdelkov

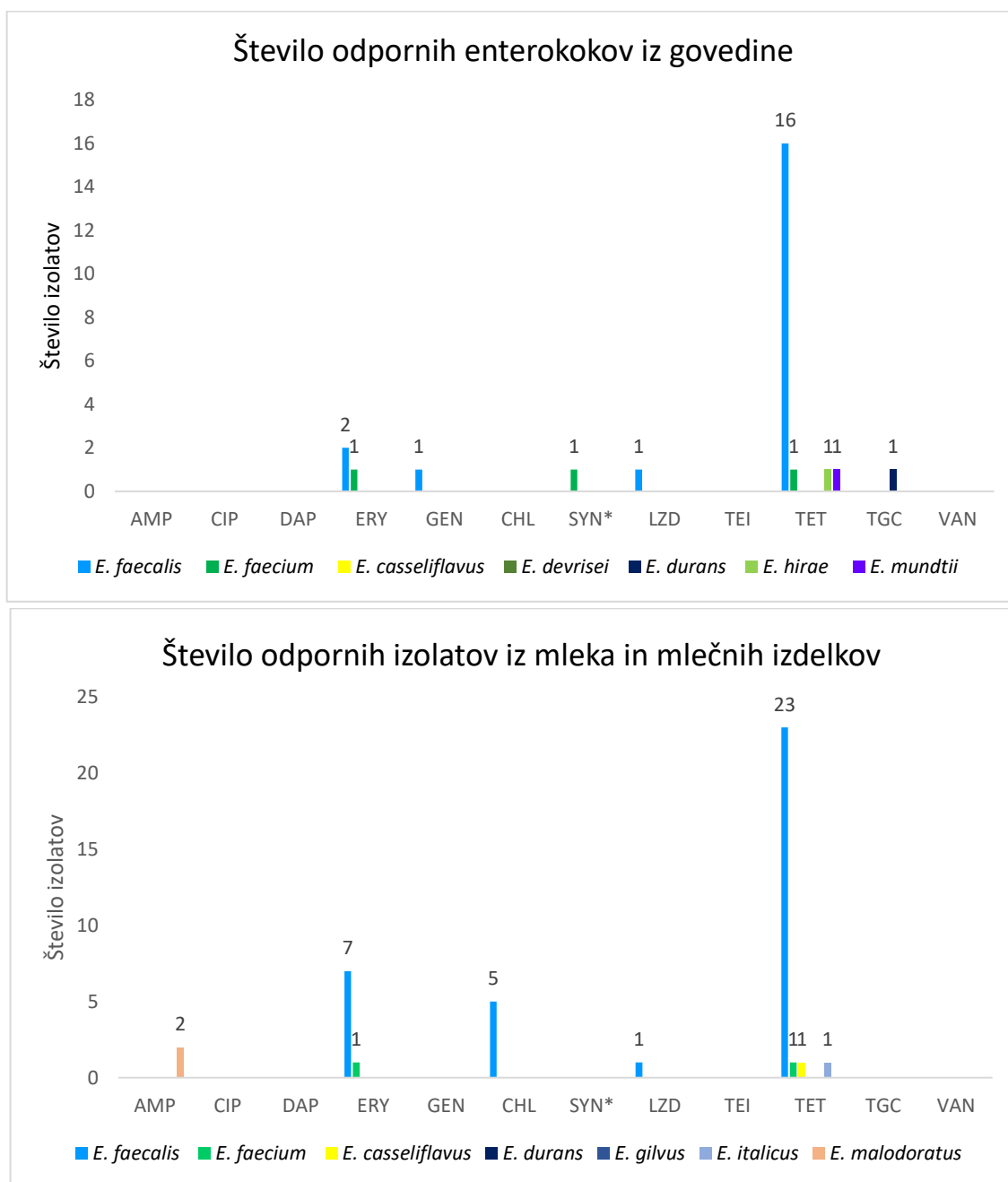
Vsi izolati, pridobljeni iz vzorcev prežvekovalcev, so bili dobro občutljivi za ciprofloksacin, daptomicin, teikoplanin in vankomicin. Poleg tega so bili izolati iz mesa dobro občutljivi tudi za ampicilin in kloramfenikol, izolati iz mleka in mlečnih izdelkov pa tudi za gentamicin in tigeciklin (**Slika 30**, **Priloge 18–21**).

Med vsemi 172 izolati iz te skupine jih je bilo 122 (70,9 %) dobro občutljivih za vse testirane antibiotike, medtem ko je preostalih 50 (29,1 %) enterokokov fenotipsko izkazovalo odpornost proti vsaj enemu izmed testiranih antibiotikov. Delež odpornih izolatov se je, glede na njihov izvor, razlikoval med obema skupinama; odpornost proti vsaj enemu izmed testiranih antibiotikov je izkazovalo 24,4 % enterokokov iz mesa govede ter 33,7 % iz mleka in mlečnih izdelkov (**Priloge 18–21**).

Večkratno odporne enterokoke pri prežvekovalcih smo ugotovili samo pri izolatih vrste *E. faecalis* (**Tabela 37**), medtem ko so bili izolati drugih vrst odporni največ proti dveh skupinam antibiotikov. V skupino VOB smo uvrstili izolat iz mesa, ki je bil odporen proti trem skupinam antibiotikov z vzorcem odpornosti ERY-GEN-TET. Ta izolat smo zaradi visoke vrednosti MIK za gentamicin uvrstili tudi v skupino HLAR. Poleg tega smo v skupino VOB uvrstili še štiri izolate iz mleka in mlečnih izdelkov; štirikratno odporen izolat vrste *E. faecalis* iz surovega mleka iz mlekomata z vzorcem odpornosti CHL-ERY-LZD-TET ter trikratno odporne izolate z vzorcem odpornosti CHL-ERY-TET (**Tabela 37**). Izmed teh sta bila dva izolata prav tako izolirana iz surovega mleka iz mlekomata, eden pa iz kravjega sira.

Proti vankomicinu odpornih izolatov v tej skupini nismo ugotovili.

Delež odpornosti proti posameznim antibiotikom ter distribucija vrednosti MIK sta za vse testirane enterokoke iz vzorcev prežvekovalcev prikazana v **Prilogah 18–21**.



Legenda: AMP, ampicilin; CIP, ciprofloksacin; DAP, daptomicin; ERY, eritromicin; GEN, gentamicin; CHL, kloramfenikol; SYN, kvinupristin/dalfopristin; LZD, linezolid; TEI, teikoplanin; TET, tetraciklin; TGC, tigeciklin; VAN, vankomicin; \*Izolati vrste *E. faecalis* so primarno odporni proti SYN, zato niso prikazani; Izolati vrste *E. casseliflavus* so primarno odporni proti vankomicinu.

**Slika 30:** Število odpornih enterokokov iz govedine ter iz mleka in mlečnih izdelkov.

**Figure 30:** Number of resistant enterococci from beef, milk and dairy products.



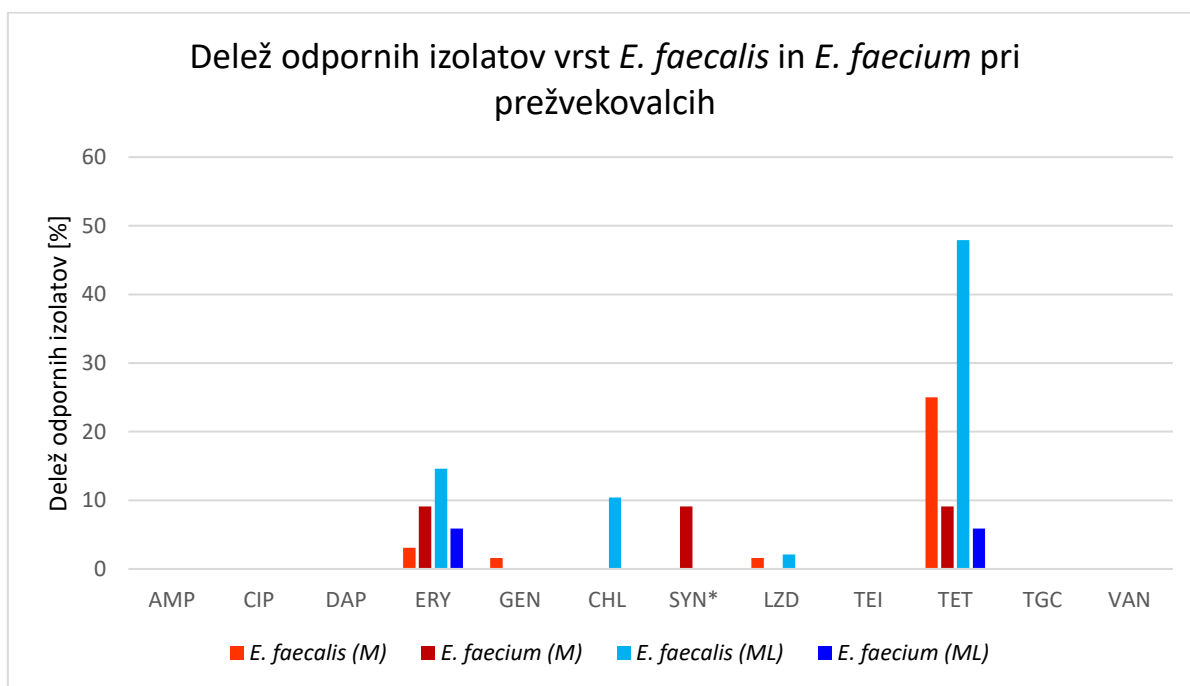
**Tabela 37:** Število in delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* pri prežvekovalcih glede na občutljivost za različne skupine protimikrobnih zdravil.

**Table 37:** Number and proportion of resistant *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from ruminants according to susceptibility to different groups of antimicrobials.

Odpornost proti skupinam protimikrobnih zdravil (število)	Število (delež [%]) izolatov			
	Govedina		Mleko in mlečni izdelki	
	<i>E. faecalis</i> [n = 64]	<i>E. faecium</i> [n = 11]	<i>E. faecalis</i> [n = 48]	<i>E. faecium</i> [n = 17]
4	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,1)	0 (0,0)
3	1 (1,6)	0 (0,0)	3 (6,3)	0 (0,0)
<b>VOB</b>	<b>1 (1,6)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>4 (8,3)</b>	<b>0 (0,0)</b>
2	0 (0,0)	1 (9,1)	3 (6,3)	1 (5,9)
1	17 (26,6)	1 (9,1)	17 (35,4)	0 (0,0)
občutljivi	46 (71,9)	9 (81,8)	24 (50,0)	16 (94,1)
skupaj	75		65	

Legenda: V obarvani vrstici je podan seštevek večkratno odpornih izolatov (VOB).

Med vsemi izolati vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz vzorcev prežvekovalcev smo največji delež odpornosti ugotovili proti tetraciklinu in eritromicinu (**Slika 31**). Pri dveh izolatih vrste *E. faecalis* (en iz mesa, en iz mleka iz mlekomata) smo ugotovili odpornost proti linezolidu, kar nismo ugotovili pri nobeni drugi skupini enterokokov. Izolat iz mlekomata, odporen proti linezolidu, je bil hkrati odporen proti štirim skupinam antibiotikov.



Legenda: AMP, ampicilin; CIP, ciprofloksacin; DAP, daptomicin; ERY, eritromicin; GEN, gentamicin; CHL, kloramfenikol; SYN, kvinupristin/dalfopristin; LZD, linezolid; TEI, teikoplanin; TET, tetraciklin; TGC, tigeciklin; VAN, vankomicin; \*Izolati vrste *E. faecalis* so primarno odporni proti SYN, zato niso prikazani; M, meso govede; ML, mleko in mlečni izdelki.

**Slika 31:** Delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz govedine ter mleka in mlečnih izdelkov.

**Figure 31:** Proportion of resistant *E. faecalis* in *E. faecium* isolates from beef milk and dairy products.

#### 4.4.1.1 Odpornost enterokokov iz govedine

Največji delež odpornosti med vsemi izolati iz govejega mesa smo ugotovili pri vrsti *E. faecalis*, pri kateri je bilo proti tetraciklinu odpornih 25 % izolatov, proti eritromicinu 3,1 %, proti gentamicinu in linezolidu pa po 1,6 % izolatov (**Priloga 18**). Trikratno odporen izolat vrste *E. faecalis* z vzorcem odpornosti ERY-GEN-TET smo na osnovi visoke vrednosti MIK za gentamicin uvrstili v skupino HLAR.

Iz **Priloge 18** in **Slike 31** je razvidno tudi, da so bili izolati vrste *E. faecium* odporni le proti eritromicinu, kvinupristinu/dalfopristinu in tetraciklinu (vsi 9,1 %), pri čemer je bil en izolat odporen proti dvema antibiotikoma (ERY-TET), en pa samo proti kvinupristinu/dalfopristinu (**Tabela 37**).

Tudi pri ostalih enterokokih iz govedine nismo ugotovili večkratno odpornih izolatov (**Priloga 19**). V tej skupini so bili vsi izolati dobro občutljivi za testirane antibiotike, razen za tigeciklin (delež odpornosti 9,1 %), kjer je bila pri izolatu vrste *E. durans* presežena mejna vrednost MIK 0,5 µg/ml.

#### 4.4.1.2 Odpornost enterokokov iz mleka in mlečnih izdelkov

Največji delež odpornosti med vsemi izolati iz mleka in mlečnih izdelkov smo ugotovili pri izolatih vrste *E. faecalis*, kjer je bilo proti tetraciklinu odpornih 47,9 % izolatov, proti eritromicinu 14,6 %, proti kloramfenikolu 10,4 % in proti linezolidu 2,1 % (**Priloga 20**).

Izolatov vrste *E. faecium* iz mleka in mlečnih izdelkov so bili vsi, razen enega, dobro občutljivi za vse testirane antibiotike (**Priloga 20**). Edini izolat vrste *E. faecium* iz te skupine je bil odporen proti eritromicinu in tetraciklinu (delež odpornosti je bil za oba 5,9 %), izoliran pa je bil iz surovega mleka iz mlekomata (**Slika 30, Priloga 20**).

Pri ostalih vrstah enterokokov iz mleka in mlečnih izdelkov nismo ugotovili večkratno odpornih izolatov (**Priloga 21**). V tej skupini smo ugotovili odpornost le proti ampicilinu in tetraciklinu (oba 9,5 %). Zmanjšano občutljivost za ampicilin sta fenotipsko izkazovala dva izolata vrste *E. malodoratus*, en iz kravjega sira, drugi pa iz surovega mleka iz mlekomata. Proti tetraciklinu sta bila prav tako odporna dva izolata, en vrste *E. casseliflavus* iz mleka iz mlekomata ter en vrste *E. italicus* iz kravjega mleka (**Slika 30**).

V tej skupini nismo ugotovili proti vankomicinu odpornih izolatov (VRE), niti izolatov, ki bi bili odporni proti visokim koncentracijam aminoglikozidov (HLAR).

Delež odpornosti proti posameznim antibiotikom ter distribucija vrednosti MIK sta za vse testirane enterokoke iz mleka ter mlečnih izdelkov prikazana v **Prilogah 20** in **21**.

#### 4.4.2 Geni za virulenčne dejavnike pri enterokokih iz vzorcev prežvekovalcev

Pri enterokokih iz vzorcev prežvekovalcev smo ugotovili vse iskane gene za virulenčne dejavnike, razen gena *hyl* (Tabela 38). Nosilci genov med preiskovanimi vrstami enterokokov iz govedine so bili izolati vrst *E. faecalis*, *E. hirae* in *E. mundtii*, medtem ko pri vrstah *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. devrisei* in *E. durans* nismo odkrili nobenega od preiskovanih genov. Pri vzorcih mleka in mlečnih izdelkov so bili nosilci genov le izolati vrste *E. faecalis*, pri ostalih vrstah (*E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gilvus*, *E. italicus* in *E. malodoratus*) pa prav tako nismo našli nobenega od preiskovanih genov (Tabela 38).

**Tabela 38:** Prisotnost genov za virulenčne dejavnike pri enterokokih iz govedine, mleka in mlečnih izdelkov.

**Table 38:** The presence of virulence genes in enterococci from beef, milk and dairy products.

Gen za virulenčni dejavnik	Število (delež [%]) izolatov			
	Meso			Mleko in mlečni izdelki
	<i>E. faecalis</i> [n = 64]	<i>E. hirae</i> [n = 6]	<i>E. mundtii</i> [n = 1]	<i>E. faecalis</i> [n = 48]
<i>ace</i>	54 (84,4)	2 (33,3)	1 (100,0)	38 (79,2)
<i>asal</i>	16 (25,0)	1 (16,7)	0 (0,0)	27 (56,3)
<i>cylA</i>	5 (7,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (14,6)
<i>efaA</i>	63 (98,4)	2 (33,3)	1 (100,0)	48 (100,0)
<i>esp</i>	7 (10,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	23 (47,9)
<i>gelE</i>	41 (64,1)	0 (0,0)	1 (100,0)	37 (77,1)
<i>hyl</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Legenda: *ace*, gen, ki kodira protein za vezavo kolegena; *asal*, gen, ki kodira agregacijsko snov; *cylA*, gen, ki kodira citolizin; *efaA*, gen, ki kodira antigen *Enterococcus faecalis*; *esp*, gen, ki kodira enterokokni površinski protein; *gelE*, gen, ki kodira želatinazo; *hyl*, gen, ki kodira hialuronidazo.

Pri izolatih vrste *E. faecalis* se je delež posameznih genov razlikoval glede na njihov izvor, pri vseh pa so prevladovali geni *efaA*, *gelE* in *ace*. Pri izolatih vrste *E. faecalis* iz govedine smo najpogosteje ugotovili gene *efaA* (98,4 %), *ace* (84,4 %) in *gelE* (64,1 %), v manjšem deležu pa še gene *asal* (25,0 %), *esp* (10,9 %) in *cylA* (7,8 %). Vsi izolati vrste *E. faecalis* iz mleka in mlečnih izdelkov so bili nosilci gena *efaA*, pogosta sta bila tudi gena *ace* (79,2 %) in *gelE* (77,1 %). Za razliko od izolatov iz mesa je imela približno polovica izolatov vrste *E. faecalis* iz mleka in mlečnih gene *asal* (56,3 %) in *esp* (47,9 %), medtem ko je bil delež za gen *cylA* manjši (14,6 %).

V skupini izolatov vrste *E. faecalis* iz govedine smo ugotovili 11 različnih virulenčnih tipov z najpogostejšo kombinacijo virulenčnih genov *ace-efaA-gelE* pri 25 (39,1 %) izolatih, en izolat pa ni vseboval nobenega izmed iskanih genov za virulenčne dejavnike (Tabela 39).

Gene za virulenčne dejavnike smo ugotovili tudi pri dveh izolatih vrste *E. hirae* iz govedine (Tabela 38), in sicer pri enem kombinacijo *ace-asal-efaA*, pri drugem pa *ace-efaA*. Prav tako smo najpogostejši virulenčni tip *ace-efaA-gelE* odkrili tudi pri izolatu vrste *E. mundtii* iz govedine (Tabela 38).

Pri izolatih vrste *E. faecalis* iz mleka in mlečnih izdelkov smo ugotovili 13 različnih virulenčnih tipov z najpogostejšima vzorcema *ace-efaA-esp-gelE* pri 12 (25,0 %) izolatih ter *ace-asa1-efaA-gelE* pri 11 (22,9 %) izolatih. Vsi izolati so vsebovali vsaj dva gena za virulenčne dejavnike (**Tabela 39**).

Šest izolatov vrste *E. faecalis*, pri katerih smo hkrati ugotovili pet različnih genov za virulenčne dejavnike, je izviralo iz kravjega sira ter surovega mleka iz mlekomatov. Pri izolatih surovega mleka iz mlekomatov ( $n = 2$ ) smo ugotovili kombinacijo genov *asa1-cylA-efaA-esp-gelE*, pri izolatih iz kravjega sira pa kombinaciji *ace-asa1-cylA-efaA-esp-gelE* ( $n = 3$ ) in *ace-asa1-efaA-esp-gelE* ( $n = 1$ ).

Skupaj smo pri vseh enterokokih iz vzorcev prežvekovalcev ugotovili 16 različnih virulenčnih tipov, nekatere kombinacije so se pojavile samo pri izolatih iz mesa, druge pa samo pri izolatih iz mleka in mlečnih izdelkov, noben izolat vrste *E. faecalis* pa hkrati ni vseboval vseh šestih ugotovljenih genov. Virulenčni tipi in njihov delež pri izolatih vrste *E. faecalis* iz različnih vzorcev prežvekovalcev so prikazani v **Tabeli 39**.

**Tabela 39:** Virulenčni tipi, ugotovljeni pri izolatih vrste *E. faecalis* iz govedine ter mleka in mlečnih izdelkov.

**Table 39:** Virulence patterns observed in *E. faecalis* isolates from beef, milk and dairy products.

Virulenčni tip	Število (delež [%]) izolatov	
	<i>E. faecalis</i> (meso govedi) [ $n = 64$ ]	<i>E. faecalis</i> (mleko in mlečni izdelki) [ $n = 48$ ]
<i>ace-asa1-cylA-efaA-esp</i>	3 (4,7)	0 (0,0)
<i>ace-asa1-cylA-efaA-gelE</i>	1 (1,6)	3 (6,25)
<i>ace-asa1-efaA-esp-gelE</i>	0 (0,0)	1 (2,1)
<i>asa1-cylA-efaA-esp-gelE</i>	1 (1,6)	2 (4,2)
<i>ace-asa1-cylA-efaA</i>	0 (0,0)	2 (4,2)
<b><i>ace-asa1-efaA-gelE</i></b>	6 (9,4)	<b>11 (22,9)</b>
<b><i>ace-efaA-esp-gelE</i></b>	2 (3,1)	<b>12 (25,0)</b>
<i>asa1-efaA-esp-gelE</i>	0 (0,0)	2 (4,2)
<i>ace-asa1-efaA</i>	5 (7,8)	6 (12,5)
<i>ace-efaA-esp</i>	0 (0,0)	1 (2,1)
<b><i>ace-efaA-gelE</i></b>	<b>25 (39,1)</b>	2 (4,2)
<i>efaA-esp-gelE</i>	1 (1,6)	3 (6,3)
<i>ace-efaA</i>	12 (18,8)	0 (0,0)
<i>efaA-esp</i>	0 (0,0)	2 (4,2)
<i>efaA-gelE</i>	5 (7,8)	1 (2,1)
<i>efaA</i>	2 (3,1)	0 (0,0)
brez genov za virulenčne dejavnike	1 (1,6)	0 (0,0)

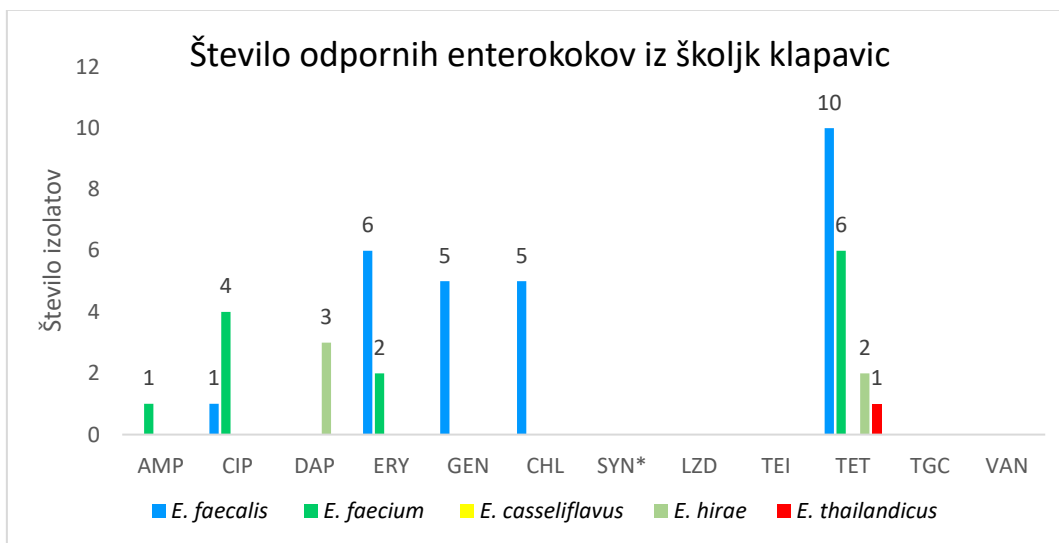
Legenda: *ace*, gen, ki kodira protein za vezavo kolegena; *asa1*, gen, ki kodira agregacijsko snov; *cylA*, gen, ki kodira citolizin; *efaA*, gen, ki kodira antigen *Enterococcus faecalis*; *esp*, gen, ki kodira enterokokni površinski protein; *gelE*, gen, ki kodira želatinazo; *hyl*, gen, ki kodira hialuronidazo.

S krepko pisavo je označena kombinacija genov za virulenčne dejavnike, ki je bila najpogostejša pri enterokokih v tej skupini.

## 4.5 ENTEROKOKI IZ ŠKOLJK KLAPAVIC

### 4.5.1 Odpornost enterokokov iz školjk klapavic

Vsi izolati iz školjk so bili dobro občutljivi za linezolid, teikoplanin, tigeceklin in vankomicin (Slika 32, Prilogi 22 in 23). Med vsemi 82 izolati jih je bilo 55 (67,1 %) dobro občutljivih za vse testirane antibiotike, medtem ko je ostalih 27 (32,9 %) enterokokov fenotipsko izkazovalo odpornost proti vsaj enemu izmed testiranih antibiotikov (Tabela 40, Prilogi 22 in 23).



Legenda: AMP, ampicilin; CIP, ciprofloksacin; DAP, daptomicin; ERY, eritromicin; GEN, gentamicin; CHL, kloramfenikol; SYN, kvinupristin/dalfopristin; LZD, linezolid; TEI, teikoplanin; TET, tetraciklin; TGC, tigeceklin; VAN, vankomicin; \*Izolati vrste *E. faecalis* so primarno odporni proti SYN, zato niso prikazani; Izolati vrste *E. casseliflavus* so primarno odporni proti vankomicinu.

**Slika 32:** Število odpornih enterokokov iz školjk klapavic.

**Figure 32:** Number of resistant enterococci from mussels.

Največji delež (75,4 %) odpornosti med vsemi enterokoki iz školjk klapavic smo ugotovili pri izolatih vrste *E. faecalis*, med katerimi jih je bilo pet (17,9 %) odpornih proti štirim različnim skupinam antibiotikov z istim, v tej skupini najpogostejšim, vzorcem odpornosti CHL-ERY-GEN-TET (Tabela 40). Na osnovi visoke vrednosti MIK za gentamicin smo te izolate uvrstili tudi v posebno skupino odpornosti HLAR.

Iz Priloge 22 je razvidno, da je bila več kot tretjina (35,7 %) izolatov vrste *E. faecalis* odpornih proti tetraciklinu, nekaj manj pa proti eritromicinu (21,4 %), gentamicinu in kloramfenikolu (oba 17,9 %). Manjši delež odpornih izolatov smo ugotovili še proti ciprofloksacinu (3,6 %). Odpornosti proti ostalim testiranim antibiotikom nismo ugotovili, prav tako v tej skupini nismo ugotovili proti vankomicinu odpornih izolatov.

V nasprotju z izolati vrste *E. faecalis* pri izolatih vrste *E. faecium* iz klapavic nismo ugotovili večkratno odpornih enterokokov, poleg tega jih je bila več kot polovica (66,7 %) dobro občutljivih za vse testirane antibiotike (Tabela 40). Izolati vrste *E. faecium* so bili odporni proti

tetraciklinu (16,7 %), ciprofloksacinu (11,1 %), eritromicinu (5,6 %) in ampicilinu (2,8 %) (**Priloga 22**).

Večkratno odpornih izolatov prav tako nismo ugotovili med drugimi vrstami enterokokov, ki smo jih izolirali iz školjk klapavic (**Tabela 40**). Pri teh izolatih smo ugotovili le odpornost proti daptomicinu in tetraciklinu (oba 16,7 %, **Priloga 23**). Dva izolata vrste *E. hirae* sta bila odporna proti obema antibiotikoma (DAP-TET), en izolat vrste *E. hirae* je bil odporen samo proti daptomicinu, izolat vrste *E. thailandicus* pa je bil odporen samo proti tetraciklinu. Večina izolatov (77,8 %) pa je bila dobro občutljiva za vse testirane antibiotike (**Tabela 40**).

**Tabela 40:** Število in delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis*, *E. faecium* in drugih vrst enterokokov iz školjk klapavic glede na občutljivost za različne skupine protimikrobnih zdravil.

**Table 40:** Number and proportion of resistant isolates of *E. faecalis*, *E. faecium* and other enterococcal species from mussels according to susceptibility to different groups of antimicrobials.

Odpornost proti skupinam protimikrobnih zdravil (število)	Število (delež [%]) izolatov		
	<i>E. faecalis</i> [n = 28]	<i>E. faecium</i> [n = 36]	drugi enterokoki* [n = 18]
4	5 (17,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
3	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<b>VOB</b>	<b>5 (17,9)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>0 (0,0)</b>
2	1 (3,6)	1 (2,8)	2 (11,1)
1	5 (17,9)	11 (30,6)	2 (11,1)
občutljivi	17 (60,7)	24 (66,7)	14 (77,8)

Legenda: V obarvani vrstici je podano število izolatov, ki smo jih uvrstili v skupino večkratno odpornih bakterij (VOB), odpornih proti trem ali več različnim skupinam protimikrobnih zdravil.

\*Drugi enterokoki: *E. casseliflavus* (n = 3), *E. hirae* (n = 14) in *E. thailandicus* (n = 1).

Delež odpornosti proti posameznim antibiotikom ter distribucija vrednosti MIK sta za vse testirane enterokoke iz školjk klapavic prikazana v **Prilogah 22** in **23**.

#### 4.5.2 Geni za virulenčne dejavnike pri enterokokih iz školjk klapavic

Pri enterokokih iz školjk klapavic smo ugotovili vse iskane gene za virulenčne dejavnike, razen gena *hyl*. Med preiskovanimi vrstami enterokokov so bili nosilci genov le izolati vrst *E. faecalis* in *E. faecium*, medtem ko pri vrstah *E. casseliflavus*, *E. hirae* in *E. thailandicus* nismo odkrili nobenega od preiskovanih genov (**Tabela 41**).

Pri izolatih vrste *E. faecalis* smo najpogosteje ugotovili gena *efaA* (96,4 %) in *gelE* (89,3 %), manj kot polovica izolatov je imela gene *ace* (42,9 %), *esp* (32,1 %) in *asaI* (25 %), v manjšem deležu pa tudi gen *cylA* (14,3 %). Gena *hyl* pri izolatih *E. faecalis* iz školjk nismo ugotovili (**Tabela 41**).

V skupini izolatov vrste *E. faecalis* smo ugotovili devet različnih virulenčnih tipov z najpogostejšim vzorcem *efaA-gelE* pri 11 (39,3 %) izolatih. Pri treh izolatih smo našli

kombinacijo vseh šestih ugotovljenih genov, medtem ko pri enem nismo ugotovili niti enega gena za virulenčne dejavnike (**Tabela 42**). Pri izolatih vrste *E. faecium* je imel le en (2,8 %) gen *esp*, pri vseh ostalih pa nismo ugotovili genov za virulenčne dejavnike. Pri vseh ostalih vrstah enterokokov iz školjk nismo ugotovili preiskovanih genov za virulenčne dejavnike. Delež posameznih genov za virulenčne dejavnike, glede na vrsto enterokokov, je prikazan v **Tabeli 41**, virulenčni tipi in njihov delež pri izolatih vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz školjk pa v **Tabeli 42**.

**Tabela 41:** Prisotnost genov za virulenčne dejavnike pri izolatih vrst *E. faecalis*, *E. faecium* in ostalih vrstah enterokokov iz školjk.

**Table 41:** The presence of virulence genes in *E. faecalis*, *E. faecium* and other enterococcal isolates from mussels.

Gen za virulenčni dejavnik	Število (delež [%]) izolatov		
	<i>E. faecalis</i> [n = 28]	<i>E. faecium</i> [n = 36]	drugi enterokoki* [n = 18]
<i>ace</i>	12 (42,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>asa1</i>	7 (25,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>cylA</i>	4 (14,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>efaA</i>	27 (96,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>esp</i>	9 (32,1)	1 (2,8)	0 (0,0)
<i>gelE</i>	25 (89,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>hyl</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Legenda: *ace*, gen, ki kodira protein za vezavo kolegena; *asa1*, gen, ki kodira agregacijsko snov; *cylA*, gen, ki kodira citolizin; *efaA*, gen, ki kodira antigen *Enterococcus faecalis*; *esp*, gen, ki kodira enterokokni površinski protein; *gelE*, gen, ki kodira želatinazo; *hyl*, gen, ki kodira hialuronidazo.

\*Drugi enterokoki: *E. casseliflavus* (n = 3), *E. hirae* (n = 14) in *E. thailandicus* (n = 1).

**Tabela 42:** Virulenčni tipi, ugotovljeni pri izolatih *E. faecalis* in *E. faecium* iz školjk klapavic.

**Table 42:** Virulence patterns observed in *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from mussels.

Virulenčni tip	Število (delež [%]) izolatov	
	<i>E. faecalis</i> [n = 28]	<i>E. faecium</i> [n = 36]
<i>ace-asa1-cylA-efaA-esp-gelE</i>	3 (10,7)	0 (0,0)
<i>ace-asa1-cylA-efaA-esp</i>	1 (3,6)	0 (0,0)
<i>ace-asa1-efaA-gelE</i>	1 (3,6)	0 (0,0)
<i>ace-efaA-esp-gelE</i>	1 (3,6)	0 (0,0)
<i>asa1-efaA-esp-gelE</i>	2 (7,1)	0 (0,0)
<i>ace-efaA-gelE</i>	5 (17,9)	0 (0,0)
<i>efaA-esp-gelE</i>	2 (7,1)	0 (0,0)
<i>ace-efaA</i>	1 (3,6)	0 (0,0)
<i>efaA-gelE</i>	<b>11 (39,3)</b>	0 (0,0)
<i>esp</i>	0 (0,0)	<b>1 (2,8)</b>
brez genov za virulenčne dejavnike	1 (3,6)	35 (97,2)

Legenda: *ace*, gen, ki kodira protein za vezavo kolegena; *asa1*, gen, ki kodira agregacijsko snov; *cylA*, gen, ki kodira citolizin; *efaA*, gen, ki kodira antigen *Enterococcus faecalis*; *esp*, gen, ki kodira enterokokni površinski protein; *gelE*, gen, ki kodira želatinazo; *hyl*, gen, ki kodira hialuronidazo.

S krepko pisavo je označena kombinacija genov za virulenčne dejavnike, ki je bila najpogostejša pri enterokokih v tej skupini.

#### 4.6 TVORBA BIOFILMA

Izolati enterokokov ( $n = 92$ ), ki smo jih testirali glede sposobnosti tvorbe biofilma (filmotvornost) na mikrotitrskih ploščicah z metodo barvanja s kristal vijoličnim, so fenotipsko izkazali različno stopnjo filmotvornosti. Glede na povprečne vrednosti izmerjene absorbance kristal vijoličnega v raztopini pri valovni dolžini 540 nm ( $OD_{540}$ ) smo izolate razvrstili v predhodno opisane skupine (Stepanović in sod., 2007) (**Tabela 43**). V skupino močno filmotvornih izolatov (S) se je uvrščalo 57,6 % izbranih enterokokov, med katerimi so bili vsi izolati pripadniki vrst *E. faecalis* in *E. faecium*. V skupino zmerno močnih filmotvornih izolatov (M) se je uvrščalo 33,7 % izolatov, ki so pripadali vsem štirim vrstam enterokokov, v skupino izolatov s šibko filmotvornostjo (W) se je uvrščalo 8,7 % izolatov vrst *E. faecalis*, *E. faecium* in *E. hirae*, medtem ko v skupino nefilmotvornih izolatov nismo uvrstili nobenega izmed testiranih enterokokov. V **Tabeli 44** je predstavljena razvrstitev izolatov enterokokov glede na njihovo filmotvornost (Stepanović in sod., 2007) in predhodno ugotovljen virulenčni tip.

Povprečne vrednosti  $OD_{540}$  za izbrane izolate enterokokov smo grafično prikazali z grafikoni kvantilov; pri tem smo izolate razvrstili v skupine glede na prisotnost genov *ace*, *asal*, *esp*, ki so udeleženi pri nastanku biofilma (Ch'ng in sod., 2019). Za vsakega od omenjenih genov in za kombinacijo genov *ace*–*asal*–*esp* smo ugotavljali morebitno statistično povezavo med prisotnostjo gena (genov) in filmotvornostjo. Statistično značilno povezavo smo ugotovili pri genih *ace* ( $p = 0,0011$ ) in *esp* ( $p < 0,0001$ ), ne pa tudi pri genu *asal* ( $p = 0,1611$ ). Pri primerjavi izolatov, ki so imeli vse tri gene (*ace*, *asal* in *esp*), in izolatov brez njih, smo prav tako ugotovili statistično močno značilno povezavo s filmotvornostjo ( $p < 0,0001$ ) (**Slika 33**).

**Tabela 43:** Kategorije filmotvornosti med izbranimi vrstami enterokokov. Kategorije smo povzeli po avtorjih Stepanović in sod. (2007). V oklepajih je naveden delež.

**Table 43:** Biofilm-forming categories among the selected *Enterococcus* species as described in Stepanović et al. (2007). Percentages are shown in parentheses.

Kategorija	<i>E. faecalis</i> [ $n = 76$ ]	<i>E. faecium</i> [ $n = 12$ ]	<i>E. hirae</i> [ $n = 2$ ]	<i>E. mundtii</i> [ $n = 2$ ]	Skupaj [ $n = 92$ ]
S	51 (67,1)	2 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	53 (57,6)
M	24 (31,6)	4 (33,3)	1 (50,0)	2 (100,0)	31 (33,7)
W	1 (1,3)	6 (50,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	8 (8,7)
N	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Legenda: S, močno filmotvorni izolati (angl. *strong*); M, srednje močno filmotvorni izolati (angl. *moderate*); W, šibko filmotvorni izolati (angl. *weak*); N, nefilmotvorni izolati.



**Tabela 44:** Kategorije filmotvornosti glede na različne kombinacije genov za virulenčne dejavnike.

**Table 44:** Biofilm-forming categories according to different virulence patterns.

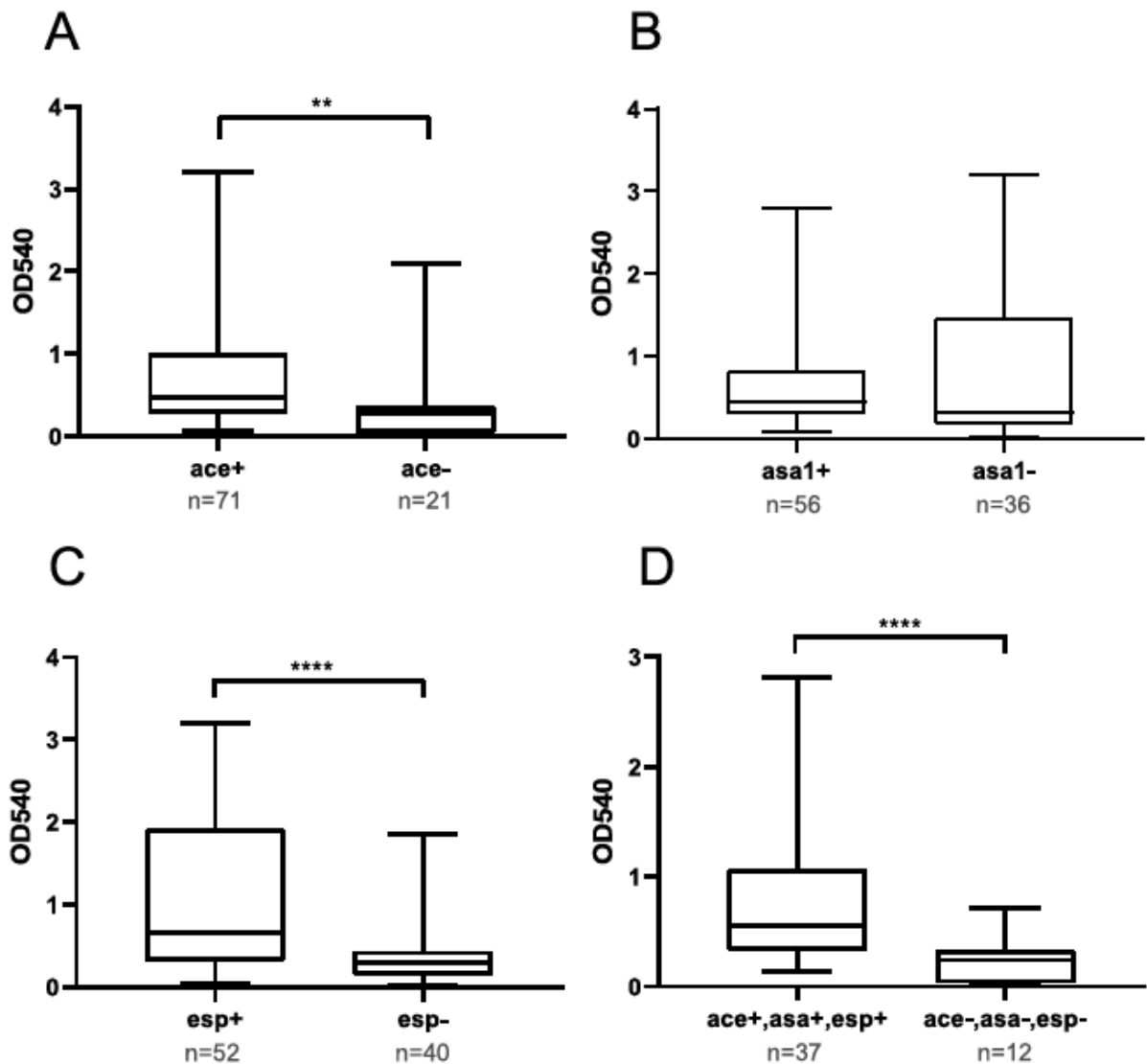
Izbrana kombinacija genov	S	M	W	Skupaj
<i>ace-asa1-esp</i>				
<i>ace-asa1-cylA-efaA-esp-gelE</i>	13	4	0	17
<i>ace-asa1-efsaA-esp-gelE</i>	5	0	0	5
<i>ace-asa1-cylA-efaA-esp</i>	9	6	0	15
<i>ace-asa1</i>				
<i>ace-asa1-cylA-efaA-gelE</i>	2	6	1	9
<i>ace-asa1-efaA</i>	6	1	0	7
<i>ace-esp</i>				
<i>ace-efaA-esp-gelE</i>	2	0	0	2
<i>ace-efaA-esp</i>	5	1	0	6
<i>ace</i>				
<i>ace-efaA-gelE</i>	2	3	0	5
<i>ace-efaA</i>	2	2	1	5
<i>asa1-esp</i>				
<i>asa1-efaA-esp-gelE</i>	0	1	0	1
<i>asa1</i>				
<i>asa1-efaA</i>	1	1	0	2
<i>esp</i>				
<i>efaA-esp-gelE</i>	1	0	0	1
<i>efaA-esp</i>	2	0	0	2
<i>esp</i>	0	2	1	3
brez izbrane kombinacije genov				
<i>efaA-gelE</i>	2	1	0	3
brez genov				
-	1	3	5	9
skupaj po kategorijah	53	31	8	92

Legenda: *ace*, gen, ki kodira protein za vezavo kolegena; *asa1*, gen, ki kodira agregacijsko snov; *cylA*, gen, ki kodira citolizin; *efaA*, gen, ki kodira antigen *Enterococcus faecalis*; *esp*, gen, ki kodira enterokokni površinski protein; *gelE*, gen, ki kodira želatinazo; *hyl*, gen, ki kodira hialuronidazo.

Za razvrstitev izolatov v skupine glede na filmotvornost glej **Tabelo 43**.

S krepko pisavo je označena kombinacija genov za virulenčne dejavnike, na osnovi katere smo naredili izbor izolatov za testiranje filmotvornosti.

Izbrane izolate enterokokov smo primerjali tudi glede na izvor, in sicer izolate iz kliničnih in nekliničnih vzorcev, pri katerih nismo ugotovili statistično značilne povezave med izvorom izolata in filmotvornostjo ( $p = 0,4638$ ). Statistično značilno povezavo v povezavi s filmotvornostjo pa smo ugotovili med izolati iz mleka v primerjavi z izolati iz mesa. Pri izolatih iz mleka (po večini so bili to vzorci surovega mleka iz mlekomata) smo ugotovili značilno povezavo s filmotvornostjo ( $p = 0,0066$ ).



**Slika 33:** Povprečje vseh izmerjenih vrednosti OD<sub>540</sub> za izbrane izolate enterokokov. Izolate smo primerjali glede na prisotnost in odsotnost genov *ace* (A), *asa1* (B), *esp* (C) ter kombinacijo vseh treh genov (D), ki sodelujejo pri tvorbi biofilma.

**Figure 33:** Average OD<sub>540</sub> values for selected enterococcal isolates; comparison of the presence and absence of biofilm producing genes *ace* (A), *asa1* (B), *esp* (C) and combination of all three genes (D) involved in biofilm formation.

Legenda: *ace*, gen, ki kodira protein za vezavo kolegena; *asa1*, gen, ki kodira agregacijsko snov; *esp*, gen, ki kodira enterokokni površinski protein; +, prisotnost gena; -, odsotnost gena; n, število izolatov, zajetih v analizo.

Statistično značilne povezave med prisotnostjo in odsotnostjo genov so označene z zvezdicami:

\*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  (test Mann-Whitney).

#### 4.7 REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE

Pri statistični analizi povezave med odpornostjo oz. virulenčnimi determinantami in kliničnim izvorom izolatov smo med seboj primerjali dve skupini izolatov glede na izvor (izolati iz kliničnih in ostalih vzorcev). V prvo skupino smo vključili vse izolate iz kliničnih vzorcev ljudi in živali (klinični izolati), v drugo skupino pa smo vključili vse izolate iz vzorcev hrane in okolja (neklinični izolati). Vse statistično značilne povezave ( $p < 0,05$ ) so v **Tabelah 45** in **46** zapisane s krepko pisavo za posamezen element.

Ugotovili smo značilno povezavo med izolati iz kliničnih vzorcev in odpornostjo proti ampicilinu, ciprofloksacinu, eritromicinu, gentamicinu, kloramfenikolu, tetraciklinu in tigeciklinu. Vse omenjene fenotipsko izražene odpornosti so bile bolj zastopane pri izolatih kliničnega izvora. Pri ostalih antibiotikih (daptomicin, kvinupristin/dalfopristin, linezolid, teikoplanin in vankomicin) statistične povezave nismo ugotovili (**Tabela 45**).

**Tabela 45:** Statistična primerjava izolatov kliničnega in nekliničnega izvora v povezavi z odpornostjo proti antibiotikom.

**Table 45:** Statistical comparison of isolates of clinical and non-clinical origin with respect to antimicrobial resistance.

Antibiotik	Fisherjev natančni test	Hi-kvadrat test
AMP		< 0,0001
CIP		< 0,0001
DAP	0,3437	
ERY		< 0,0001
GEN		< 0,0001
CHL		0,0003
SYN		0,2236
LZD	1	
TEI	0,4655	
TET		< 0,0001
TGC		0,0003
VAN	1	

Statistično značilne povezave ( $p < 0,05$ ) so označene s krepko pisavo.

Ugotovili smo tudi značilno povezavo med izolati iz kliničnih vzorcev v povezavi s prisotnostjo naslednjih genov za virulenčne dejavnike: *asa1*, *cylA*, *esp* in *hyl*. Pri genih *ace*, *efaA* in *gelE* povezave nismo ugotovili (**Tabela 46**).

**Tabela 46:** Statistična primerjava izolatov kliničnega in nekliničnega izvora v povezavi s prisotnostjo genov za virulenčne dejavnike.

**Table 46:** Statistical comparison of isolates of clinical and non-clinical origin with respect to the presence of virulence genes.

Gen za virulenčni dejavnik	Fisherjev natančni test	Hi-kvadrat test
<i>ace</i>		0,8248
<i>asaI</i>		<b>0,0009</b>
<i>cylA</i>		<b>&lt; 0,0001</b>
<i>efaA</i>		0,9744
<i>esp</i>		<b>&lt; 0,0001</b>
<i>gelE</i>		0,8824
<i>hyl</i>	<b>&lt; 0,0001</b>	

Legenda: *ace*, gen, ki kodira protein za vezavo kolegena; *asaI*, gen, ki kodira agregacijsko snov; *cylA*, gen, ki kodira citolizin; *efaA*, gen, ki kodira antigen *Enterococcus faecalis*; *esp*, gen, ki kodira enterokokni površinski protein; *gelE*, gen, ki kodira želatinazo; *hyl*, gen, ki kodira hialuronidazo.

Statistično značilne povezave ( $p < 0,05$ ) so označene s krepko pisavo.

## 5 RAZPRAVA

Izolate enterokokov za preučevanje njihove odpornosti proti antibiotikom, prisotnosti genov za virulenčne dejavnike ter filmotvornosti, smo glede na izvor uvrstili v dve večji skupini. V prvo smo uvrstili patogene enterokoke iz različnih kliničnih vzorcev ljudi in živali, v drugo pa komezalne oz. indikatorske enterokoke.

Enterokoke iz kliničnih vzorcev živali smo zbirali več let v okviru rednega dela v kliničnem laboratoriju IMP VF in so odraz okužb živali na ravni države, saj smo vzorce dobili z različnih veterinarskih ambulant po Sloveniji. Glede na dostopen nabor vzorcev smo največ enterokokov izolirali iz vzorcev malih živali, predvsem psov (vrsti *E. faecalis* in *E. faecium*), ter iz vzorcev perutnine (vrsta *E. cecorum*). Humane klinične izolate smo pridobili iz zbirke Oddelka za medicinsko mikrobiologijo NLZOH Kranj. Če bi želeli pridobiti širšo sliko glede odpornosti in virulenčnih dejavnikov enterokokov pri ljudeh v Sloveniji, bi nabor humanih kliničnih izolatov lahko predstavljal omejitev te raziskave, saj predvidevamo, da ti izolati odražajo stanje enterokoknih okužb pri ljudeh predvsem na Gorenjskem. V raziskavo nismo uvrstili izolatov VRE iz humanih kliničnih vzorcev, saj smo predvidevali, da jih bomo pri živalih izolirali zelo redko ali pa sploh ne.

V naši raziskavi smo pridobili 854 enterokokov, ki so pripadali šestnajstim vrstam. Več kot polovica vseh izolatov je pripadala vrsti *E. faecalis*, četrtna vrsti *E. faecium*, druge vrste (*E. hirae*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. italicus*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. avium*, *E. canitestini*, *E. canis*, *E. devriesei* in *E. thailandicus*) pa so bile zastopane v manj kot 10 % deležu.

Tako pri ljudeh kot pri živalih smo največ kliničnih izolatov pridobili iz vzorcev urina, saj so enterokoki, poleg bakterije *E. coli*, najpogostejši povzročitelji okužb sečil (Germ in Seme, 2020; Hall in sod., 2013). Pogosti vzorci, iz katerih smo izolirali enterokoke pri živalih, so bili tudi notranji organi in sklepi piščancev, pri katerih smo kot povzročitelja okužbe izolirali vrsto *E. cecorum*, kar se ujema z ugotovitvami drugih raziskav (Jung in sod., 2018). Drugi najpogostejši vir analiziranih enterokokov pri ljudeh so bile hemokulture. Delež kliničnih primerov bakteriemije pri ljudeh, ki jo povzročata vrsti *E. faecalis* in *E. faecium*, je 11–13 %, kar uvršča enterokoke na tretje mesto povzročiteljev bakteriemije v Evropi in ZDA (Ammerlaan in sod., 2013; de Kraken in sod., 2013). V Sloveniji je enterokokna bakteriemija, ki je povezana z visoko smrtnostjo, predstavljala 5,4–8,1 % vseh okužb krvi v obdobju med 2006 in 2011 (Müller Premru in sod., 2013).

Pri humanih vzorcih sta bili zaradi klinične pomembnosti zastopani le vrsti *E. faecalis* in *E. faecium*, pri živalskih kliničnih pa poleg obeh omenjenih še vrsta *E. cecorum* pri piščancih ter druge, manj pogoste vrste *E. canis*, *E. canitestini*, *E. gallinarum* in *E. hirae*, kar se sklada s podatki iz literature o vrstah, ki povzročajo okužbe pri živalih (Aarestrup in sod., 2002; Arias in Murray, 2012; deHerdt in sod., 2008; Foulquié Moreno in sod., 2006; García-Solache in

Rice, 2019; Germ in Seme, 2020; Hollenbeck in Rice, 2012; Jung in sod., 2018; Stewart, 2013; Torres in sod., 2018).

Enterokoki, kot črevesni komenzali pri rejnih živalih, se lahko uporabljajo kot indikatorji fekalne kontaminacije živil. Redkeje so neposredno odgovorni za okužbe, ki se prenašajo s hrano, vendar pa njihov vnos preko hrane lahko pomeni kolonizacijo prebavil in posledične endogene okužbe (Sorsen in sod., 2001). Znano je, da je hrana, kontaminirana z enterokoki, velikokrat vzrok bakteriemije z vrsto *E. faecium* ali vzrok okužbe sečil pri ljudeh (Abriouel in sod., 2008; Billington in sod., 2014). V industrializiranih državah je sicer neposreden stik ljudi z živalmi omejen predvsem na kmete, veterinarje ter delavce na klavnici, ki predstavljajo manjši del populacije. Po drugi strani pa se zaradi slabše gospodinjske prakse lahko bakterije, vključno z enterokoki, preko uživanja, rokovanja s hrano ali navzkrižno kontaminacijo prenesejo do širše populacije ljudi (Bortolaia in sod., 2016).

Izolate, ki smo jih uvrstili v skupino indikatorskih oz. komenzalnih enterokokov, smo izolirali iz vzorcev perutnine (meso in feces piščancev, vzorci iz perutninske klavnice), vzorcev prašičev (meso in feces prašičev, vzorci s prašičje farne tik pred zakolom živali ter iz klavnice), vzorcev prežvekovalcev (meso govedu ter mleko in mlečni izdelki) in školjk klapavic. Ugotavljanje prevalence komenzalnih enterokokov sicer ni bil namen naše raziskave, vendar v procesu pridobivanja izolatov ni bilo mogoče spregledati dejstva, da iz vzorcev živil, fecesa in okolja samo v redkih primerih nismo izolirali enterokokov. To nakazuje na visoko prevalenco enterokokov v fecesu rejnih živali ter živilih živalskega izvora. Tudi različni drugi avtorji poročajo o več kot 90 % deležu enterokokov pri vzorcih piščančjega mesa, svinjine in govedine (Bortolaia in sod., 2015; Giraffa, 2020; Hayes in sod., 2003; Tyson in sod., 2017). Večina enterokokov iz mesa naj bi izvirala iz živali kot posledica kontaminacije ob zakolu in ne od delavcev, če se v klavnici upoštevajo ustrezni sanitarno higienski standardi. Zaradi drugačne tehnologije klanja v perutninski klavnici je kontaminacija trupov perutnine ob zakolu višja kot pri zakolu prašičev in govedu (Bortolaia in sod., 2015). Podobno kot pri mesu je prevalenca enterokokov visoka tudi v surovem mleku (> 90 %) (Klein, 2003; McAuley in sod., 2015). Zelo pomembno je tudi dejstvo, da pri klanju velikih živali veliko lažje preprečimo kontaminacijo mesa z vsebino črevesa, medtem ko pri perutnini pogosto to ni mogoče. Do kontaminacije mleka z enterokoki po navadi pride preko človeških ali živalskih iztrebkov, vode, farmskega okolja, opreme za molžo, bazenov za mleko ali opreme, ki se uporablja med predelavo mleka (Gelsomino in sod., 2002).

Več raziskav je pokazalo, da sta vrsti *E. faecalis* in *E. faecium* najpogosteje izolirani iz živil živalskega izvora (Aslam in sod., 2012; Golob in sod., 2019; Klein, 2003; Peters in sod., 2003; Tyson in sod., 2018). To potrjujejo tudi rezultati naše raziskave, saj sta omenjeni vrsti prevladovali v vzorcih mesa, mleka in mlečnih izdelkov. Iz vzorcev mesa piščancev, govedine in svinjine smo izolirali še manj pogoste vrste *E. casseliflavus*, *E. devriesei*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. hiraе* in *E. mundtii*, iz vzorcev mleka in mlečnih izdelkov pa tudi vrste *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gilvus*, *E. italicus* in *E. malodoratus*. Slednji dve smo

izolirali samo iz vzorcev kravjega mleka in sira. Nabor različnih enterokoknih vrst bi bil morebiti še bolj obsežen, če bi iz vsake primarne kulture presajali še več morfoloških tipov enterokokov. Maietti in sod. (2007) poročajo, da je vrsta *E. italicus* pogosto izolirana iz vzorcev mleka. Naši rezultati se glede najpogostejših vrst v mleku in mlečnih izdelkih skladajo z rezultati raziskave o raznolikosti enterokokov iz slovenskih tradicionalnih sirov, ne pa tudi glede drugih, manj pogosto ugotovljenih vrst (Mohar Lorbeg, 2008).

Tudi iz vzorcev fecesa piščancev in okoljskih vzorcev smo izolirali različne vrste komenzalnih oz. indikatorskih enterokokov, med njimi najpogosteje vrsti *E. faecalis* in *E. faecium*, kar se sklada tudi s podatki v raziskavi o odpornosti komenzalnih enterokokov iz goveda, prašičev in piščancev v devetih evropskih državah (de Jong in sod., 2019). To pa ni veljalo za vzorce fecesa prašičev ter vzorce okolja na prašičji farmi in klavnici, iz katerih smo v večjem deležu kot enterokoke vrste *E. faecium* (20,2 %) izolirali enterokoke vrste *E. hirae* (29,8 %), prevladovala pa je vrsta *E. faecalis* (40,4 %). Druge vrste enterokokov smo ugotovili v manjšem deležu (9,6 %). Iz vzorcev s prašičje farme in klavnice pa smo v največjem deležu izolirali vrsto *E. hirae* (44,4 %), poleg tega pa še vrsti *E. faecalis* (29,6 %) in *E. faecium* (25,9 %), kar je v nasprotju z že omenjeno raziskavo v devetih evropskih državah, kjer so med enterokoki, izoliranimi iz fecesa zdravega goveda, prašičev in piščancev, najpogosteje ugotovili vrsti *E. faecium* in *E. faecalis* (de Jong in sod., 2019).

Na osnovi zgoraj navedenih rezultatov smo deloma potrdili prvo hipotezo. Z ugotovljeno pogosto prisotnostjo enterokokov, ne glede na izvor preiskovanih vzorcev, ter z razlikami v pogostosti pojavljanja posameznih vrst smo potrdili prvi del te hipoteze. Drugega dela te hipoteze nismo potrdili v celoti pri vseh skupinah vzorcev, saj smo iz fecesa prašičev ter okoljskih vzorcev s prašičje farme in klavnice pogosteje izolirali vrsto *E. hirae*. Po podatkih iz literature v fecesu ljudi in rejnih živali med enterokoki prevladuje vrsta *E. faecium* (Lebreton, 2014). Poleg tega se pri živalih pogosto pojavljata tudi vrsti *E. faecalis* in *E. cecorum*, redkeje pa vrste *E. gallinarum*, *E. durans*, *E. hirae* in *E. avium* (Klein, 2003). Novais in sod. (2013) prav tako poročajo, da so iz različnih vzorcev na šestih prašičjih farmah (nosni brisi in feces živali, krma, voda, brisi sten in tal v hlevu, hlevski zrak, bazeni za gnoj, oprema za razdeljevanje krme) najpogosteje izolirali vrsto *E. faecium*. Soares-Santos in sod. (2015) pa navajajo, da so pri izolatih s prašičje klavnice najpogosteje izolirali vrsto *E. faecalis*.

## 5.1 ODPORNOST ENTEROKOKOV

Svetovna zdravstvena organizacija je objavila prednostni seznam patogenih bakterij, odpornih proti antibiotikom, ki ogrožajo javno zdravje in za katere bi bilo potrebno razviti nova zdravila in v 2. skupino z visoko pomembnostjo (angl. *high priority*) uvrstila tudi proti vankomicinu odporno seve vrste *E. faecium* (WHO, 2017b). V kliničnem pomenu ima večjo vlogo tudi vrsta *E. faecalis*, medtem ko so ostale vrste, ki se pogosto pojavljajo pri živalih (*E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. durans*), manj pomembne za javno zdravje. Kljub temu pa so enterokoki pomemben kazalnik stanja odpornosti pri po Gramu pozitivnih bakterijah in lahko predstavljajo

rezervoar odpornih genov, ki se lahko prenašajo na patogene ali druge komenzalne bakterije (Ahmed in Baptiste, 2018). Delež odpornih bakterij, ki naseljujejo črevesje živali, je lahko neposreden pokazatelj selekcijskega pritiska zaradi uporabe antibiotikov (de Jong in sod., 2019). Možnost prenosa odpornih črevesnih bakterij iz živali na ljudi predstavlja globalno skrb za javno zdravje, kar so v zadnjem času izpostavile tudi različne mednarodne organizacije. Evropska unija je z Evropskim akcijskim načrtom »Eno zdravje« zoper odpornost bakterij proti protimikrobnim zdravilom pripravila strategijo nadzora glede spremljanja odpornosti bakterij, ki se znotraj celotne EU izvaja v okviru Izvedbenega sklepa komisije (EU) 2020/1729 in pri katerem sodeluje tudi Slovenija. Podatke, ki jih prispevajo članice EU, nato EFSA vsako leto analizira in objavi v skupnem poročilu. Vendar pa razpoložljivi podatki glede odpornosti enterokokov pri rejnih živalih temeljijo le na majhnem deležu držav, saj od leta 2014 spremljanje odpornosti pri enterokokih v okviru Izvedbenega sklepa ni obvezno in se za to države članice odločajo le na podlagi svojih nacionalnih načrtov, kar velja tudi za Slovenijo. Zaradi tega primanjkljaja v uradnem nadzoru so podatki o odpornosti enterokokov, ki smo jih dobili v okviru naše naloge, zelo pomembni za poznavanje stanja v Sloveniji in lepo zapolnijo vrzel za ta del Evrope. Za spremljanje odpornosti bakterij pri ljubiteljskih živalih pa tak sistem na evropski ravni sploh ni vzpostavljen (Pomba in sod., 2017).

Z našo raziskavo smo dobili vpogled v odpornost enterokokov proti antibiotikom pri različnih skupinah vzorcev. Odpornost enterokokov iz kliničnih vzorcev ljudi in živali ter ostalih (nekliničnih) vzorcev se je značilno razlikovala. Odpornost proti ampicilinu, ciprofloksacinu, eritromicinu, gentamicinu, kloramfenikolu, tetraciklinu in tige ciklinu je bila statistično močno povezana ( $p < 0,001$ ) z izolati iz kliničnih vzorcev. Pri ostalih testiranih antibiotikih (daptomicin, kvinupristin/dalfopristin, linezolid, teikoplanin in vankomicin) pa statistične povezave s kliničnimi oz. nekliničnimi izolati nismo ugotovili. Taki rezultati se zdijo logični, glede na to, da se slednji antibiotiki v humani medicini zelo redko uporabljajo, v veterinarski medicini pa sploh ne. Največji delež odpornosti (t.j. izolat, odporen proti vsaj enemu testiranemu antibiotiku) smo ugotovili ravno pri izolatih iz skupine kliničnih vzorcev ljudi (88,1 %) in živali (74,5 %) ter pri izolatih iz vzorcev perutnine (v mesu piščancev je bil delež odpornih enterokokov 75,3 %, v fecesu 69,0 % in v perutninski klavnici 72,7 %). Visok delež odpornih enterokokov smo zasledili tudi pri okoljskih vzorcih na prašičji farmi (66,7 %), za razliko od nižjega deleža odpornih enterokokov v svinjini (35,3 %) in fecesu prašičev (41,5 %). Najmanjši delež odpornih enterokokov pa smo zasledili v skupini mesa govedu (24,4 %), mleka in mlečnih izdelkov (33,7 %) ter pri školjkah (32,9 %).

Podobno situacijo smo ugotovili glede pojavnosti večkratno odpornih enterokokov (t.j. izolat, odporen proti najmanj trem skupinam antibiotikov), saj je bil delež VOB najvišji pri izolatih iz kliničnih vzorcev ljudi (73,3 % pri vrsti *E. faecium* in 29,6 % pri vrsti *E. faecalis*) in živali (80 % pri vrsti *E. faecium* in 21,7 % pri vrsti *E. faecalis*). Visok delež VOB smo ugotovili tudi pri izolatih iz vzorcev prehranske verige pri piščancih in s farme prašičev. V vseh skupinah vzorcev pri piščancih (meso, feces, klavnica) smo pri vrstah *E. faecalis* in *E. faecium* ugotovili VOB, v največjem deležu pri izolatih s klavnice, pri katerih je bilo večkratno odpornih 33,3 %



izolatov *E. faecium* in 26,7 % izolatov *E. faecalis*. Poleg tega smo zelo visok delež VOB ugotovili tudi pri izolatih *E. faecium* (71,4 %) s prašičje farme, ne pa tudi pri izolatih vrste *E. faecalis*. Najnižji delež izolatov VOB smo zaznali v skupini vzorcev rdečega mesa (meso prašičev in govedi). Precej visok delež (17,9 %) odpornih izolatov *E. faecalis* smo ugotovili tudi pri školjkah. Med izolati vrste *E. faecium* iz mesa prašičev in goved, mleka in mlečnih izdelkov ter školjk nismo ugotovili večkratno odpornih enterokokov, kar je presenetljivo glede na sicer visoko stopnjo odpornosti vrste *E. faecium*.

Naši rezultati glede pojavnosti večjega deleža odpornih komenzalnih izolatov se večinoma skladajo z drugimi raziskavami v Evropi in ZDA. Avtorji med različnimi vrstami rejnih živali prav tako ugotavljajo največjo odpornost enterokokov (vključno z VOB) pri perutnini, tako pri piščancih kot pri puranih (Aslam in sod., 2012; de Jong in sod., 2019; Hayes in sod., 2003; Tyson in sod., 2017). Podobno kot v naši raziskavi, kjer smo pri perutnini ugotovili največ VOB pri vrsti *E. faecium*, so poročali tudi Diarra in sod. (2010), vendar pa so ugotovili veliko večji delež VOB v fecesu piščancev (94,2 %, v naši raziskavi 17,6 %). Večji delež odpornosti pri izolatih vrste *E. faecalis* in *E. faecium* iz perutnine pripisujejo večji uporabi antibiotikov v fazi prireje živali, saj morajo živali v zelo kratkem času pridobiti zadostno klavno težo, hkrati pa ostati zdrave (Aslam in sod., 2012). Zaradi tehnologije klanja v perutninski klavnici je kontaminacija trupov perutnine ob zakolu višja kot pri zakolu prašičev in goved, zaradi manj ustreznih higienskih postopkov pa lahko odporni enterokoki tudi dalj časa ostanejo prisotni znotraj predelovalnega obrata (Aslam in sod., 2012; Bortolaia in sod., 2015).

V poročilu EFSA za leto 2013 (EFSA, 2015) so predstavljeni rezultati testiranja indikatorskih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz fecesa pri piščancih iz šestih evropskih držav (Danska, Finska, Hrvaška, Španija, Švedska in Švica) in fecesa pri kokoših nesnicah (Norveška). Pri obeh vrstah enterokokov iz piščančjega fecesa so v večini držav ugotovili največji delež odpornosti proti tetraciklinu (53,7–88,9 %) in eritromicinu (20,2–78,7 %), kar potrjujejo tudi naši rezultati. Namreč, med vsemi testiranimi enterokoki smo največji delež odpornosti ugotovili proti tetraciklinu (43,3 %), eritromicinu (25,4 %) in ciprofloksacinu (10,0 %). V naši raziskavi smo ugotovili odpornost enterokokov tudi proti ostalim antibiotikom, vendar v precej nižjem deležu (< 10,0 %), ki se je med posameznimi skupinami vzorcev in vrstami enterokokov precej razlikoval. Visok delež odpornosti proti tetraciklinom je lahko posledica dejstva, da se v veterinarski medicini za zdravljenje živali uporabi največ antibiotikov iz skupine tetraciklinov (ESVAC, 2020). Po podatkih Evropske agencije za uporabo antibiotikov v veterinarski medicini (angl. *European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption*, ESVAC) za leto 2018 pa kažejo, da se v Sloveniji za zdravljenje živali uporablja največ antibiotikov iz skupine penicilinov oz. betalaktamov, ki jim sledijo tetraciklini, aminoglikozidi, fluorokinoloni in sulfonamidi (ESVAC, 2020). Uporaba antibiotikov kot pospeševalcev rasti v živinoreji v EU že od leta 2006 ni dovoljena. Vsekakor pa je raba antibiotikov v terapevtske namene povezana z večjo stopnjo pridobljene odpornosti pri komenzalnih bakterijah. Cuong in sod. (2018) so ugotovili, da se največ antibiotikov porabi v reji piščancev, sledita pa prašičjereja in govedoreja. Pri primerjavi porabljenih antibiotikov na kilogram proizvedenega mesa pa je bila na prvem

mestu prašičjereja, ki sta ji sledili perutninarska proizvodnja ter govedoreja. Za zdravljenje rejnih živali je veterinarjem na voljo precej omejeno število protimikrobnih zdravil, odvisno tudi od posamezne države. V prašičjereji najpogosteje uporabljajo tetracikline, polipeptide, peniciline in aminoglikozide. Pri govedu so najbolj uporabljani penicilini, cefalosporini in tetraciklini. Pri perutnini pa so na prvem mestu tetraciklini, ki jim sledijo makrolidi, polipeptidi in penicilini (Cuong in sod., 2018).

Nikakor ne smemo prezreti visokega deleža (71,4 %) VOB izolatov vrste *E. faecium* s prašičje farme, ki so bili odporni proti ampicilinu, eritromicinu, tetraciklinu in/ali kvinupristinu/dalfopristinu, en izolat pa še proti ciprofloksacinu. Na vlogo farmskega okolja v prašičjereji pri širjenju večkratno odpornih enterokokov, vključno z visoko tveganimi kloni, in možnosti prenosa z živali na ljudi so opozorili tudi v raziskavi, ki so jo opravili Novais in sod. (2013). Na šestih med seboj oddaljenih prašičjih farmah so izolirali enterokoke iz različnih vzorcev okolja in pri vseh kategorijah prašičev. Ugotovili so 98 % prevalenco enterokokov, iz vzorcev pa so najpogosteje izolirali vrste *E. faecium*, *E. faecalis* in *E. hirae*. Pri vrsti *E. faecium* so, ne glede na izvor, ugotovili zelo visoke deleže odpornosti proti tetraciklinu (96–100 %), eritromicinu (96–100 %), kvinupristinu/dalfopristinu (83–100 %), ciprofloksacinu (85–100 %), visokim koncentracijam aminoglikozidov (60–94 %) in kloramfenikolu (60–77 %). V manjšem deležu in le pri nekaterih skupinah vzorcev pa so ugotovili tudi ARE (9–35 %) in VRE (5–17 %). Prisotnost VOB na vseh farmah je zaskrbljujoča, saj le-ti predstavljajo rezervoar genov za odpornost, ki se pod vplivom selekcijskega pritiska zaradi različnih antibiotikov lahko širijo na živali in ljudi, pri tem pa lahko pride do sočasnega prenosa genov za odpornost proti ampicilinu in glikopeptidom. Poleg tega so v raziskavi ugotovili tudi prisotnost različnih klonov enterokokov, povezanih z okužbami pri ljudeh. Iz različnih vzorcev (gnoj, bazeni za odpadno vodo, feces, pitna voda) iste farme so izolirali klona *E. faecium* ST78 in *E. faecalis* ST16, na geografsko oddaljenih farmah pa tudi klone *E. faecium* CC5, *E. faecalis* CC21 in *E. faecalis* ST16. Glede na rezultate so povzeli, da je okolje prašičjih farm podcenjeno pri prenosu VOB enterokokov na živali ter posledično na ljudi. Neprekinjen stik prašičev z VOB iz okolja (preko prahu, krme, vode, opreme) lahko zmanjša restriktivne ukrepe glede uporabe antibiotikov v prašičjereji, kar pomeni potrebo po iskanju drugačnih rešitev, povezanih predvsem z upravljanjem in boljšimi pogoji reje na farmah, učinkovitejšim režimom razkuževanja in nadzorom odpadnih vod oz. fecesa (Novais in sod., 2013). Na širjenje VOB znotraj in med prašičjimi farmami vplivajo različni dejavniki: kolonizacija črevesja živali od mladičkov do odraslih in posledično širjenje teh sevov v okolje, transport živali, iste vzrejne linije oz. vzrejališča za plemenske svinje, ki se nato prodajajo v različne države, komercialna trgovina z živalmi ter prenos preko živali v naravnem okolju (prosto živeče ptice in glodavci). Vloga vseh teh dejavnikov je bila predhodno že opisana pri širjenju drugih bakterij, npr. VOB v perutninskih jatah in bakterij MRSA pri prašičih (EFSA, 2010; Heuer in sod., 2002; Rule in sod., 2008).

Opozoriti moramo tudi na prisotnost VOB vrste *E. faecalis* (HLAR) iz vzorcev školjk klapavic iz slovenskega morja, ki smo jih ugotovili v 17,9 % deležu in ki so bili hkrati odporni proti

eritromicinu, gentamicinu, kloramfenikolu in tetraciklinom. Pri vseh vrstah enterokokov iz školjk smo ugotovili odpornost proti tetraciklinu (16,7–35,7 %). Proti njemu je bil odporen tudi edini izolat vrste *E. thailandicus*. Zanimivo je tudi, da so trije izolati vrste *E. hirae* izkazovali fenotipsko odpornost proti daptomicinu. Podobne rezultate smo dobili v raziskavi glede odpornosti enterokokov iz školjk, nabranih v letu 2011. Takrat smo pri vseh vrstah enterokokov ugotovili visok delež odpornosti proti tetraciklinu (68,8 %) in eritromicinu (56,3 %), v manjši meri pa tudi proti daptomicinu (12,5 %) in gentamicinu (3,1 %) (Golob in sod., 2018). Drugih raziskav o odpornosti enterokokov v školjkah klapavicah nismo zasledili. Boss in sod. (2016) poročajo 55 izolatih vrste *E. faecalis* iz morskih izdelkov, vključno z ostrigami, ki so bili odporni proti tetraciklinu (16 %), gentamicinu in tigeciklinu (oba 4,0 %) in kloramfenikolu (2,0 %), medtem ko so bili vsi izolati dobro občutljivi za ampicilin, ciprofloksacin, daptomicin, linezolid, teikoplanin in vankomicin. V nasprotju z našo raziskavo večkratno odpornih izolatov vrste *E. faecalis* niso ugotovili. Pri vseh vrstah školjk se moramo zavedati, da lahko zaradi načina prehranjevanja, ki temelji na filtraciji, v svojih tkivih kopičijo mikrobo ter potencialno škodljive snovi. Slovensko morje, omejeno na Tržaški zaliv, je zalivskega tipa z intenzivnim ladijskim prometom zaradi Luke Koper. Je plitvo morje, v katerega se steka veliko rek, ki s seboj prinašajo komunalne in industrijske odplake, kar pripomore k onesnaženju morja in kontaminaciji školjk (Henigman in sod., 2015). Školjke so zelo dober pokazatelj fekalne kontaminacije vode, hkrati pa občutljivo živilo, ki mora biti podvrženo ustreznemu nadzoru. Uživanje surovih ali nezadostno toplotno obdelanih školjk iz slovenskega morja je lahko zdravju škodljivo, zato velja upoštevati pravila dobre gospodinjske prakse.

Glede na posamezne vrste enterokokov smo največ odpornih izolatov ugotovili pri vrstah *E. faecalis* in *E. faecium*, medtem ko pri vrstah *E. canis*, *E. devriesei* in *E. mundtii* odpornih izolatov sploh nismo odkrili. V nadaljevanju razprave bomo izpostavili le pomembnejše ugotovitve, predvsem glede odpornosti vrst *E. faecalis* in *E. faecium* proti antibiotikom, ki se uporabljajo za zdravljenje enterokoknih okužb ter skupino kritičnih antibiotikov (CIA), namenjenih zgolj za zdravljenje okužb z VOB pri ljudeh.

Najvišji delež odpornosti pri izolatih vrste *E. faecalis*, ne glede na njihov izvor, smo ugotovili proti tetraciklinu in eritromicinu. Izjema so bili vzorci iz prašičje farme in klavnice, pri katerih odpornih izolatov vrste *E. faecalis* nismo ugotovili. Poleg tega so bili vsi izolati vrste *E. faecalis* dobro občutljivi za antibiotike iz skupine CIA (daptomicin, teikoplanin in vankomicin). Odpornost proti določenim antibiotikom smo ugotovili samo pri nekaterih skupinah vzorcev; proti ampicilinu samo pri humanih kliničnih izolatih ter izolatih iz mesa in fecesa piščancev, proti linezolidu samo pri izolatih iz govedine in mleka ter proti tigeciklinu samo pri izolatih iz svinjine. Prav tako smo odporne izolate vrste *E. faecalis* proti ciprofloksacinu v večjem deležu ugotovili v skupini kliničnih enterokokov ter pri vzorcih perutnine. Večjih razlik v deležih odpornosti pri izolatih vrste *E. faecalis* iz kliničnih vzorcev ljudi in živali v naši raziskavi nismo ugotovili, razen za ampicilin in gentamicin. V obeh primerih je bil delež odpornosti višji pri humanih kliničnih izolatih vrste *E. faecalis* (ampicilin 2,8 %, gentamicin 28,2 %) kot pri izolatih iz kliničnih vzorcev živali (ampicilin 0,0 %, gentamicin 10,9 %). Med izolate ARE pri vrsti

*E. faecalis* sta se uvrstila dva humana klinična izolata iz hemokultur, en izolat iz mesa piščancev in en izolat iz fecesa piščancev. Izolati iz hemokultur in mesa piščancev so bili poleg proti ampicilinu odporni tudi proti ciprofloksacinu, eritromicinu in gentamicinu (dva izmed njih tudi proti tetraciklinu).

Leta 2017 je bila v poročilu SKUOPZ omenjena nizka odpornost humanih kliničnih izolatov vrste *E. faecalis* proti ampicilinu (0,6 %), linezolidu (0,4 %), vankomicinu (0,04 %) in ciprofloksacinu (0,5 %). Večji delež odpornosti izolatov vrste *E. faecalis* je bil ugotovljen za nitrofurantoin (24,2 %) in visoke doze gentamicina (19,2 %) (Štrumbelj in sod., 2018). V naši raziskavi je bilo le 12,7 % kliničnih izolatov vrste *E. faecalis* iz različnih humanih kliničnih vzorcev občutljivih za vse testirane antibiotike. Večina humanih kliničnih izolatov vrste *E. faecalis* je bila odporna proti tetraciklinu (78,9 %), sledil je eritromicin (46,5 %). Dvajset (28,2 %) kliničnih izolatov vrste *E. faecalis*, ki so izvirali iz hemokultur, urina, nožnice, operacijske rane in ejakulata, je bilo uvrščenih med HLAR; med njimi jih je 15 izkazovalo tudi odpornost proti tetraciklinu in eritromicinu. Polega tega sta bila dva izolata HLAR iz hemokultur odporna tudi proti ampicilinu in ciprofloksacinu. Humani klinični izolati vrste *E. faecalis* so v manjši meri izkazovali odpornost proti ciprofloksacinu (18,3 %), tigeciklinu (7,0 %), kloramfenikolu (5,6 %) in ampicilinu (2,8 %). Ti izsledki so v nasprotju z raziskavo, v kateri so opisani višji deleži odpornosti izolatov vrste *E. faecalis* iz različnih kliničnih vzorcev ljudi (urin, sapnik, hemokultura, rana, absces) proti tetraciklinu (88,0 %), eritromicinu (62,3 %) in ciprofloksacinu (39,4 %) (Nasaj in sod., 2016).

Pri izolatih vrste *E. faecium* smo največji delež odpornosti ugotovili proti tetraciklinu, eritromicinu in ampicilinu, vendar se je delež odpornih izolatov precej razlikoval med posameznimi skupinami vzorcev. Pri izolatih iz svinjine odpornosti proti tem antibiotikom nismo zaznali. Večjih razlik v deležih odpornosti pri izolatih vrste *E. faecium* iz kliničnih vzorcev ljudi in živali v naši raziskavi nismo ugotovili, razen za gentamicin, kvinupristin/dalfopristin in tetraciklin. Pri gentamicinu in kvinupristinu/dalfopristinu je bil delež odpornosti višji pri humanih kliničnih izolatih vrste *E. faecium* (gentamicin 28,2 %, kvinupristinu/dalfopristinu 56,7 %, tetraciklin 13,3 %), pri tetraciklinu pa je bil delež odpornih veliko večji pri izolatih iz kliničnih vzorcev živali (gentamicin 16 %, kvinupristinu/dalfopristinu 24 %, tetraciklin 80 %). Nasprotno kot pri izolatih vrste *E. faecalis* smo v tej skupini ugotovili 10 proti vankomicinu odpornih izolatov vrste *E. faecium*, pri katerih smo s testom PCR dokazali gen *vanA*. Devet izolatov VRE smo izolirali iz mesa in fecesa piščancev ter okoljskih vzorcev na perutninski klavnici, en izolat VRE je izviral iz vzorca hemokulture psa. Pri tem moramo še enkrat izpostaviti dejstvo, da pri izboru enterokokov iz humanih kliničnih vzorcev nismo izbrali izolatov VRE, ker nismo pričakovali, da bomo odkrili tak tip odpornosti pri vzorcih živali in živil živalskega izvora. V prihodnje bi bilo smiselno analizirati tudi izolate VRE iz humanih kliničnih vzorcev ter jih primerjati z živalskimi izolati.

Pri humanih kliničnih izolatih vrste *E. faecium* v Sloveniji je bil leta 2017 opisan nizek delež odpornosti proti vankomicinu (0,6 %) in linezolidu (0,5 %), medtem ko so bili precej visoki

deleži odpornosti proti ampicilinu (89,9 %), ciprofloksacinu (94,3 %) in visokim dozam gentamicina (49,1 %) (Štrumbej in sod. 2018). V naši raziskavi je bila večina kliničnih izolatov vrste *E. faecium* odporna proti eritromicinu (76,7 %), ampicilinu (70,0 %) in ciprofloksacinu (70,0 %). Več kot polovica (56,7 %) izolatov, ki so izvirali iz hemokultur, urina in aspirata sapnika, je bila močno odpornih proti gentamicinu (HLAR *E. faecium*); med temi jih je bilo 15 odpornih tudi proti ampicilinu, ciprofloksacinu in eritromicinu. Odpornost proti kvinopristinu/dalfopristinu smo ugotovili pri 56,7 % kliničnih izolatih vrste *E. faecium*. Podatki pretekle raziskave kažejo na širok razpon odpornosti proti kvinopristinu/dalfopristinu (1–70 %) pri izolatih iz ljudi (Nasaj in sod., 2016; Wang in sod., 2016). Poleg tega je bilo 30,0 % izolatov odpornih tudi proti tigeciklinu, medtem ko je bil delež odpornosti proti tetraciklinu manjši (13,3 %). Večji delež proti ampicilinu odpornih humanih kliničnih izolatov vrste *E. faecium* v primerjavi z izolati vrste *E. faecalis* je v skladu s preteklimi raziskavami, ki kažejo, da izolati vrste *E. faecium* pogosteje pridobijo odpornost proti ampicilinu in vankomicinu kot izolati vrste *E. faecalis*. Slednji so manj učinkoviti pri kopičenju genov za odpornost, čeprav so odgovorni za več okužb pri ljudeh kot bakterije vrste *E. faecium* (Tenover in sod., 2005; Leavis in sod., 2006). Po drugi strani pa so bakterije vrste *E. faecium* pomembne povzročiteljice bolnišničnih okužb inso pridobile odpornost tudi proti drugim skupinam protimikrobnih zdravil. Večkratno odporne bakterije vrste *E. faecium* so povezane s povečano stopnjo smrtnosti pri ljudeh (Miller in sod., 2014; Guzman Prieto in sod., 2016).

Glede na visoke vrednosti MIK za gentamicin smo v skupino HLAR uvrstili 59 (6,9 %) izolatov, od tega jih je 35 (7,2 %) pripadalo vrsti *E. faecalis* in 24 (11,2 %) vrsti *E. faecium*. Največ izolatov HLAR smo ugotovili pri kliničnih vzorcih ljudi, in sicer 36,6 % (*E. faecalis* 28,2 %; *E. faecium* 56,7 %), pri kliničnih vzorcih živali pa 8,5 % (*E. faecalis* 10,9 %; *E. faecium* 16,0 %). Delež HLAR v školjkah je bil 6,1 %, v fecesu piščancev 4,8 %, v mesu piščancev 2,5 % ter v svinjini in govedini po 1,2 %. V skupini vzorcev mleka in mlečnih izdelkov, fecesu prašičev ter na piščančji in prašičji klavnici izolatov z visoko vrednostjo MIK za gentamicin nismo ugotovili.

Leta 2013 so Slovenija in tri druge evropske države poročale o odpornosti enterokokov iz piščančjega, prašičjega in govejega mesa (EFSA, 2015). V splošnem so izolati vrste *E. faecalis* izkazovali odpornost proti tetraciklinom (42,2 %), streptomycinu (11,1 %) in eritromicinu (6,7 %). Izolati vrste *E. faecium* so bili odporni proti kvinopristinu/dalfopristinu (50,0 %) in tetraciklinom (9,1 %). Na splošno so bili enterokoki iz svinjine in govedine manj odporni kot enterokoki iz piščančjega mesa, z izjemo odpornosti proti kloramfenikolu in linezolidu. Slovenija je poročala o odpornosti proti izbranim antibiotikom za 93 izolatov enterokokov iz piščančjega mesa in 52 izolatov vrste *E. faecalis* iz svinjine. Med slednjimi jih je bilo 50,0 % odpornih proti tetraciklinom, 21,2 % proti eritromicinu in 17,3 % proti streptomycinu (EFSA, 2015). Zanimivo je, da je bila večja stopnja odpornosti izolatov iz svinjine ugotovljena leta 2013 kot pa v naši raziskavi. Nasprotno pa smo v naši raziskavi ugotovili večjo stopnjo odpornosti pri izolatih vrste *E. faecalis* v piščančjem mesu za vse testirane antibiotike. Leta 2013 je Slovenija poročala le o odpornih izolatih vrste *E. faecalis* proti tetraciklinom (51,9 %)

in streptomycinu (10,4 %) (EFSA, 2015). V naši raziskavi pa smo pri tej vrsti enterokokov v piščančjem mesu ugotovili odpornost proti tetraciklinu (61,0 %), eritromicinu (49,2 %), v manjšem deležu pa tudi proti ciprofloksacinu, kloramfenikolu, gentamicinu in ampicilinu (vsi  $\leq 5$  %). Pri izolatih vrste *E. faecium* iz piščančjega mesa pa je bil trend odpornosti glede na posamezne antibiotike različen. Glede na leto 2013 se je delež odpornosti proti tetraciklinu znižal iz 50,0 % na 26,3 % ter proti kvinupristinu/dalfopristinu iz 62,5 % na 15,8 %. Nasprotno pa smo v naši raziskavi ugotovili porast odpornosti proti ampicilinu, eritromicinu in vankomicinu glede na podatke iz leta 2013 (EFSA, 2015).

Glede na trenutno veljavno zakonodajo EU, spremljanje odpornosti enterokokov (vrst *E. faecalis* in *E. faecium*) pri živalih in v mesu ni obvezno. Vendar pa je nadzor nad odpornostjo enterokokov v mesu, še zlasti, če se ga uživa surovega ali pa ne gre skozi proces eliminacije živih bakterij pred zaužitjem, pomemben zaradi ocenjevanja morebitnih zoonotičnih tveganj (EFSA, 2012b). Različni podatki glede odpornosti enterokokov v Sloveniji znotraj relativno kratkega časovnega obdobja kažejo na nujnost sprotnega spremljanja stanja v vsaki državi.

Znano je, da pri kliničnih izolatih vrste *E. faecalis* lahko pogosteje pričakujemo pridobljeno odpornost proti gentamicinu, medtem ko je pri kliničnih izolatih vrste *E. faecium* pogostejša pridobljena odpornost proti ampicilinu in vankomicinu (Miller in sod., 2014).

Odpornost proti ampicilinu (MIK  $\geq 128$   $\mu\text{g/ml}$ ) je pri vrsti *E. faecium* povezana s povečano proizvodnjo PBP5 ali s spremenjenim zapisom v nukleotidnem zaporedju (Torres in sod., 2018). Glede na populacijsko strukturo vrste *E. faecium* razlikujemo pri ljudeh dve liniji. Linija A1, ki je povezana z bolnišnicami, vsebuje številne mobilne genetske elemente, povzroča okužbe pri ljudeh in je v večini primerov odporna proti ampicilinu z vrednostjo MIK  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$ ; linija B pa se pojavlja predvsem pri zdravih ljudeh, ni povezana z okužbami in je občutljiva za ampicilin z vrednostjo MIK  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$ . Pri živalih poznamo samo eno linijo, in sicer A2, ki se pojavlja v okolju živali, zanjo pa je značilen širok razpon vrednosti MIK (0,5–128  $\mu\text{g/ml}$ ). Pri vrsti *E. faecalis* je pridobljena odpornost proti ampicilinu neobičajna in je najpogosteje posledica mutacije gena *pbp4* (Torres in sod., 2018). Redko pojavnost izolatov vrste *E. faecalis* ARE smo potrdili tudi v naši raziskavi, saj smo izmed 487 izolatov vrste *E. faecalis* odpornost proti ampicilinu ugotovili le pri 0,8 % izolatov. Nasprotno pa smo velik delež odpornih izolatov proti ampicilinu ugotovili pri vrsti *E. faecium*, vendar ne pri vseh skupinah vzorcev. Najvišji delež vrste *E. faecium* ARE smo ugotovili pri izolatih na prašičji farmi (85,7 %) ter pri živalskih in humanih kliničnih izolatih (80 % oz. 70 %). V manjšem deležu pa tudi pri vseh vzorcih perutnine (v mesu 26,3 %, v fecesu 29,4 %, na klavnici 33,3 %), v fecesu prašičev (5,3 %) in pri školjkah (2,8 %). Pri izolatih vrste *E. faecium* iz mesa prašičev in govedi ter mleka in mlečnih izdelkov odpornosti proti ampicilinu nismo ugotovili. Naši rezultati se skladajo z ugotovitvami drugih avtorjev, saj pri izolatih vrste *E. faecalis*, razen nekaj izjem, niso ugotovili odpornosti proti ampicilinu, medtem ko se je prevalenca odpornih izolatov vrste *E. faecium* razlikovala med državami in vrstami živali (Torres in sod., 2018). Podobno kot v naši raziskavi so odpornost proti ampicilinu (30 %) odkrili v fecesu perutnine na

Portugalskem, ne pa tudi pri govedu na klavnici v Avstraliji (Poeta in sod., 2006; Barlow in sod., 2017).

Pri psih je bil delež proti ampicilinu odpornih izolatov *E. faecium* iz vzorcev fecesa različen: 3 % na Portugalskem, 23 % v Veliki Britaniji, 63 % v ZDA ter 76 % na Danskem (Damborg in sod., 2009; Jackson in sod., 2009; Poeta in sod., 2006). Večina teh izolatov je pripadala klonalnemu kompleksu CC17, ki je povezan z bolnišnicami. Naši rezultati se najbolj skladajo z ugotovitvami danskih avtorjev, saj smo pri psih ugotovili zelo visok delež (88,2 %) proti ampicilinu odpornih izolatov vrste *E. faecium*, pri čemer pa moramo poudariti klinični izvor teh izolatov (urin, punktat trebušne votline, rana, organi, sluhovod in hemokultura). Za nadaljnje raziskave bi bilo dobro, če bi lahko naše izolote tipizirali in ugotovili, ali tudi ti pripadajo klonalnemu kompleksu CC17.

Vankomicin in teikoplanin sta najpomembnejša predstavnika glikopeptidov in se uporabljata za zdravljenje različnih okužb ljudi, medtem ko se načeloma za zdravljenje živali ne uporabljata. Tako pri rejnih kot ljubiteljskih živalih se med izolate VRE najpogosteje uvršča vrsta *E. faecium* z genotipom *vanA* (Torres in sod., 2018). V naši raziskavi smo odpornost proti glikopeptidom ugotovili pri 10 izolatih (1,2 %) vrste *E. faecium* iz živali in živil živalskega izvora, pri vseh smo dokazali gen *vanA*. Devet izolatov VRE smo izolirali iz vzorcev perutnine, in sicer tri (15,8 %) iz mesa piščancev, štiri (11,8 %) iz fecesa piščancev ter dva (33,3 %) iz okoljskih vzorcev na perutninski klavnici. En izolat (4 %) VRE pa smo izolirali iz vzorca hemokulture psa, kar je po nam dostopni literaturi prvi opisan primer okužbe psa s proti vankomicinu odpornim izolatom vrste *E. faecium* iz hemokulture. Po podatkih iz literature se delež proti vankomicinu odpornih enterokokov razlikuje glede na posamezno skupino rejnih živalih; najvišji je pri perutnini (0–77 %), nižji pa pri prašičih (0–25,3 %) in govedu (0–0,5 %) (povzeto po Torres in sod., 2018), kar se ujema tudi z našimi ugotovitvami. Pri psih so proti vankomicinu odporne enterokoke (vrsta *E. faecium* z genotipom *vanA*) do sedaj ugotovili le v fecesu v obdobju med 1996 in 2003 (prevalenca 2,8–22,7 %). Pozneje bakterije VRE vrste *E. faecium* pri psih, niti pri bolnih, niso bile več opisane (povzeto po Torres in sod., 2018). Opisan pa je primer iz Nove Zelandije, kjer so pri psički z mastitisom izolirali *E. faecalis* VRE z genotipom *vanA* (Manson in sod., 2003).

Po navedenem lahko sklepamo, da so enterokoki sposobni povzročiti tudi hujše okužbe pri ljubiteljskih živalih. Težava pri zdravljenju takih okužb je ustrezna izbira zdravila, saj se zaradi možnosti selekcijskega pritiska pri živalih antibiotiki iz skupine CIA naj ne bi uporabljali. Izguba učinkovitih antibiotikov lahko resno ogrozi zdravje in dobro počutje živali, zato se tudi v veterinarski medicini, podobno kot v humani, že pojavlja potreba po razvoju novih protimikrobnih zdravil. Okužbe z VRE ali z drugimi večkratno odpornimi bakterijami pri psih imajo tudi velik zoonotični pomen, saj psi v današnjem času bivajo v tesnem stiku s človekom. Okužbe z večkratno odpornimi bakterijami pri ljubiteljskih živalih predstavljajo dvojno težavo: za pacienta v kliničnem smislu ter za javno zdravje zaradi možnega prenosa odpornih bakterij na ljudi (Pomba in sod., 2017; Weese, 2008). Izkazalo se je, da izolati VRE vrste *E. faecium*

pri psih pripadajo isti genetski liniji kot izolati, ki povzročajo okužbe ljudi, povezane z zdravstvom. V ZDA so prvič opisali prisotnost VRE vrste *E. faecium* pri psu, pri katerem so ugotovili, da je gen za odpornost proti vankomicinu *vanA* lociran na transpozonu Tn1546 s posebno obliko (z manjkajočim segmentom v regiji ORF1). Takšna oblika transpozona Tn1546 pa je bila značilna za klinične izolate vrste *E. faecium* pri ljudeh. Avtorji sicer niso mogli natančno ugotoviti izvora tega izolata, so pa, na osnovi svojih ugotovitev, opozorili na možnost prenosa genov za odpornost proti vankomicinu preko mobilnih genetskih elementov med enterokoki ljudi in psov (Simjee in sod., 2002). Zaradi pojavljanja visoko patogenih enterokokov pri ljubiteljskih živalih, kar potrjuje ugotovitev prisotnosti klonalnega kompleksa CC17 vrste *E. faecium* v fecesu zdravih psov (Damborg in sod., 2008), bi bilo zelo smiselno, če bi se poleg spremljanja odpornosti pri rejnih živalih to izvajalo tudi pri ljubiteljskih živalih, še posebej pri psih in mačkah.

V raziskavi poročamo o relativno ugodnem stanju glede občutljivosti izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* za daptomicin, linezolid, teikoplanin in vankomicin, kar je izjemno pomembno, saj ti antibiotiki sodijo med kritične antibiotike za zdravljenje okužb ljudi. Vsi izolati vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz vseh testiranih vzorcev so bili dobro občutljivi za daptomicin. Poleg že opisanih 10 izolatov vrste *E. faecium*, ki so bili odporni proti vankomicinu in teikoplaninu, pa moramo izpostaviti še dva izolata vrste *E. faecalis* pri govedu, ki sta fenotipsko izkazovala odpornost proti linezolidu. En izolat smo izolirali iz govedine, drugi izolat pa smo izolirali iz kravjega mleka v mlekomatu. Prvič so gen za odpornost proti linezolidu opisali v letu 2011 ravno pri izolatu vrste *E. faecalis*, ki je izviral z goveje farme (Liu in sod., 2012), kar se ujema z rezultati naše raziskave. Gene za odpornost proti linezolidu so pozneje ugotovili tudi pri enterokokih iz drugih rejnih živali (prašiči) in iz živil živalskega izvora, pri enterokokih iz ljubiteljskih živalih pa ne. Kljub temu, da se linezolid ne uporablja za zdravljenje živali, pojav enterokokov, ki nosijo gene za odpornost proti linezolidu na mobilnih genetskih elementih, po svoje preseneča in predstavlja tveganje za javno zdravje (Torres in sod., 2018; Tyson in sod., 2018).

Na podlagi rezultatov testiranja enterokokov glede odpornosti proti protimikrobnim zdravilom smo potrdili drugo in tretjo hipotezo, saj smo pri ljudeh, živalih, živilih živalskega izvora ter vzorcih iz prehranske verige izolirali enterokoke s pridobljeno odpornostjo proti eni ali več skupinam protimikrobnih zdravil, vključno z odpornostjo proti ampicilinu in visokim koncentracijam aminoglikozidov (HLAR), izjemoma pa proti vankomicinu odporne enterokoke (VRE).

## 5.2 VIRULENČNI DEJAVNIKI

V raziskavi smo ugotavljali prisotnost genov za virulenčne dejavnike iz skupine adhezinov (*ace*, *asa1*, *efaA* in *esp*), sekrecijskih faktorjev (*cylA*, *gelE*) in hialuronidazo (*hyl*). Gene za iskane virulenčne dejavnike smo ugotovili le pri štirih vrstah: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* in *E. mundtii*. Pri izolatih vrst *E. faecalis* in *E. faecium* smo odkrili vseh sedem iskanih genov,



medtem ko smo pri izolatih vrste *E. hirae* ugotovili le gene *ace*, *asaI* in *efaA*, pri vrsti *E. mundtii* pa gene *ace*, *efaA* in *gelE*.

Največ genov za virulenčne dejavnike smo ugotovili pri izolatih vrste *E. faecalis*, in sicer iz vseh skupin vzorcev, od tega najpogosteje gene *efaA* (98,2 %), *gelE* (82,1 %) in *ace* (76,0 %). Pri izolatih vrste *E. faecium* smo gene za virulenčne dejavnike ugotovili samo pri izolatih iz kliničnih vzorcev ljudi in živali ter iz školjk, pri čemer so bili najpogosteje nosilci genov *esp* (10,7 %) in *hyl* (7,9 %). Pri nobenem izolatu nismo hkrati ugotovili vseh sedmih iskanih genov za virulenčne dejavnike. Kombinacijo petih ali šestih virulenčnih determinant hkrati smo ugotovili pri 47,9 % izolatih vrste *E. faecalis* iz kliničnih vzorcev ljudi ter pri 34,8 % izolatih vrste *E. faecalis* iz kliničnih vzorcev živali. Pri izolatih iz školjk je bil ta delež 14,3 %, pri izolatih iz ostalih skupin vzorcev pa pod 10 %. Kombinacije več genov za virulenčne dejavnike ( $\geq 5$  genov hkrati) smo tako pogosteje ugotovili pri kliničnih izolatih kot pri izolatih iz vzorcev živali ter živil živalskega izvora, kar se ujema z ugotovitvami predhodnih raziskav (Eaton in Gasson, 2001; Medeiros in sod., 2014). Eaton in Gasson (2001) sta raziskovala prisotnost genov za virulenčne dejavnike pri vrstah *E. faecalis*, *E. faecium* in *E. durans* iz različnih medicinskih vzorcev (kri, urin, gnoj iz abscesov oz. ran, feces, bolnišnično okolje) v primerjavi z enterokoki iz hrane (mleko, sir, meso) ter štarterskimi kulturami. Ugotovila sta, da so izolati vrste *E. faecalis* iz različnih vzorcev nosilci večjega števila virulenčnih determinant (6–11) v primerjavi z izolati vrste *E. faecium*, ter da je kombinacija več genov hkrati za virulenčne dejavnike pogosteje prisotna pri kliničnih izolatih vrste *E. faecalis* kot pri enterokokih iste vrste iz hrane in štarterskih kultur. Medeiros in sod. (2014) pa so preučevali prisotnost petih genov za virulenčne dejavnike (*ace*, *agg*, *cylA*, *esp* in *gelE*) pri izolatih vrste *E. faecalis* iz humanih kliničnih vzorcev (urin, hemokultura, izcedek materničnega vratu) in iz hrane (zelenjava, surovo meso, mleko, mlečni izdelki). Ugotovili so, da so bili klinični izolati vrste *E. faecalis* nosilci večjega števila genov za virulenčne dejavnike kot izolati iz živil. Več kot tri gene hkrati so ugotovili pri 77,2 % kliničnih izolatov vrste *E. faecalis*, medtem ko je bil delež izolatov iz živil z več kot tremi geni 18,2 %. Kombinacijo vseh petih iskanih genov za virulenčne dejavnike so ugotovili le v skupini kliničnih izolatov.

V naši raziskavi smo pri izolatih iz kliničnih vzorcev ugotovili statistično značilno povezavo s prisotnostjo naslednjih genov za virulenčne dejavnike: *asaI*, *cylA*, *esp* in *hyl*, medtem ko prisotnosti genov *ace* ( $p < 0,8248$ ), *efaA* ( $p < 0,9744$ ) in *gelE* ( $p < 0,8824$ ) nismo značilno povezali s kliničnimi izolati, kar je v skladu z ugotovitvami raziskovalcev v Braziliji (Medeiros in sod., 2014). Rezultati naše raziskave so v skladu z objavami, ki navajajo, da je enterokokni površinski protein (Esp) eden najpogostejših dejavnikov za kolonizacijo in perzistenco bakterij vrste *E. faecalis* pri okužbah urinarnega trakta pri ljudeh (Shankar in sod., 2001) ter za tvorbo biofilma (Tsikrikonis in sod., 2012). V naši raziskavi smo analizirali 49 enterokokov iz urina ljudi, od tega jih je 38 pripadalo vrsti *E. faecalis*, 11 pa vrsti *E. faecium*. Prisotnost gena *esp* smo potrdili pri 68,4 % urinskih izolatih vrste *E. faecalis* ter pri 72,7 % vrste *E. faecium*. Pri humanih kliničnih izolatih vrste *E. faecalis* so geni za adhezine (*esp* in *asaI*), citotoksin (*cylA*) in želatinazo (*gelE*) pogosteje opisani kot pri izolatih vrste *E. faecium* (Strateva in sod., 2016).

To potrjuje tudi naša raziskava, in sicer za gene *asa1*, *cylA* in *gelE*, ki smo jih ugotovili pri manj kot desetini humanih kliničnih izolatov vrste *E. faecium* v nasprotju z izolati vrste *E. faecalis*, pri katerih je bil delež izolatov z omenjenimi geni znatno višji (45,1–88,7 %), ne pa tudi za gen *esp*, ki smo ga odkrili pri približno enako visokem deležu izolatov obeh vrst. Podobno velja tudi za rezultate pri živalskih kliničnih izolatih, saj smo pri živalskih kliničnih izolatih vrste *E. faecalis* omenjene štiri gene odkrili v 30,4 % do 69,6 %, medtem ko smo pri izolatih vrste *E. faecium* ugotovili le gen *esp*.

Skupaj smo pri vseh testiranih enterokokih določili 28 različnih virulenčnih tipov. Največjo raznolikost smo ugotovili pri izolatih vrste *E. faecalis*, kjer smo pri izolatih iz svinjine ugotovili 15 različnih virulenčnih tipov, pri humanih kliničnih izolatih 14, pri izolatih iz kliničnih vzorcev živali ter vzorcev mleka in mlečnih izdelkov pa 13 različnih virulenčnih tipov. Najmanj virulenčnih tipov (dva) smo ugotovili pri izolatih vrste *E. faecalis* s prašičje farme in klavnice. Pri izolatih vrste *E. faecium* smo ugotovili precej manj virulenčnih tipov; šest pri humanih kliničnih izolatih, dva pri izolatih iz kliničnih vzorcev živali ter en virulenčni tip pri izolatih iz školjk. Pri vrsti *E. hirae* smo ugotovili dva virulenčna tipa, pri vrsti *E. mundtii* pa enega.

Ugotovitev, da je bila največja raznolikost virulenčnih tipov pri izolatih iz mesa prašičev, najmanjša pa pri izolatih s prašičje farme in klavnice, si lahko razlagamo z vzorčenjem oz. načinom pridobivanja teh izolatov. Enterokoke iz svinjine smo izolirali iz vzorcev mesa, ki so bili poslani v laboratorij v okviru vzorčenja za temeljno študijo o spremljanju in poročanju odpornosti zoonotskih in komenzalnih bakterij proti protimikrobnim zdravilom in v okviru Programa monitoringa zoonoz Uprave za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR). Vzorčenje je bilo načrtovano skozi celotno leto 2017, na način, da so bili ustrezno zastopani vsi maloprodajni obrati, ki neposredno oskrbujejo končnega potrošnika s svežim mesom (trgovine) na celotnem ozemlju Slovenije. Enterokoke, ki smo jih testirali v naši raziskavi, smo skozi celotno leto izolirali iz nepakiranega in pakiranega ohlajenega svežega svinjskega mesa slovenskega in tujega izvora. Po drugi strani pa smo enterokoke s prašičje farme in klavnice pridobili iz vzorcev v okviru ciljnega raziskovalnega projekta z naslovom Izvor in širjenje odpornih bakterij preko živil živalskega izvora (V4-1606), s katerim smo želeli raziskati kritična mesta, kjer lahko odporne bakterije, vključno z VRE, vstopajo v prehransko verigo. V tem primeru smo izolate enterokokov pridobili iz le dveh vzorčenj. Izbrano rejo prašičev smo najprej vzorčili na posestvu, nato pa isto skupino živali še na klavnici, v obeh primerih smo vzorčili tudi površine v okolici živali. Razlike v načinu vzorčenja so lahko vzrok, da smo na prašičji farmi in klavnici ugotovili le dva različna virulenčna tipa, v primerjavi z 15 virulenčnimi tipi, ugotovljenimi v svinjini, ki je bila zelo raznolikega izvora. Drugi razlog pa bi lahko bil povezan tudi s številom in vrsto enterokokov. Namreč, iz vzorcev prašičje farme in klavnice smo pridobili 27 izolatov, ki so pripadali trem vrstam enterokokov: *E. hirae* ( $n = 12$ ), *E. faecalis* ( $n = 8$ ) in *E. faecium* ( $n = 7$ ). Delež izoliranih enterokokov vrste *E. faecalis* je predstavljal 29,6 % vseh izolatov v tej skupini in samo pri tej vrsti smo ugotovili virulenčne determinante. V večini smo torej izolirali enterokoke vrste *E. hirae*, pri katerih nismo ugotovili nobenega iskanega gena za virulenčne dejavnike, prav tako genov nismo ugotovili pri izolatih

vrste *E. faecium*. Zanimivo je tudi, da smo virulenčni tip *efaA-gelE* ugotovili le pri živalih; iz nosnih brisov prašičev ter brisov boksa v višini nosov na farmi, nato pa na brisih trupov pred hlajenjem pri vseh treh skupinah prašičev. Na drugi strani pa smo virulenčni tip *ace-efaA-gelE* ugotovili pri enterokokih na klavnici v vzorcih umazane bazenske vode, brisa nožev mesarja po evisceraciji in brisa noža veterinarja na klavni liniji. Vsekakor pa bi morali, če bi želeli naše sklepe zanesljivo potrditi, analizirati več izolatov, tako na prašičji farmi kot na klavnici.

Pri izolatih vrste *E. faecalis* iz humanih kliničnih vzorcev smo odkrili 14 različnih virulenčnih tipov, med katerimi je bil najpogostejši *ace-asal-cylA-efaA-esp-gelE*. Ta tip smo ugotovili pri tretjini izolatov, ki so pretežno izviral iz vzorcev urina ( $n = 13$ ), pa tudi iz hemokulture ( $n = 3$ ), nožnice ( $n = 3$ ), rane ( $n = 2$ ) in ejakulata ( $n = 1$ ). Poleg tega je bilo pri 47,9 % ( $n = 34$ ) humanih kliničnih izolatov vrste *E. faecalis* hkrati prisotnih pet ali več genov za virulenčne dejavnike, za razliko od 3,3 % ( $n = 1$ ) humanih kliničnih izolatov vrste *E. faecium*. Te ugotovitve so v skladu z raziskavo, v kateri so ugotovili, da so izolati vrste *E. faecalis*, povezani z bakteriemijo in okužbami urinarnega trakta, v večini vsebovali gene *ace*, *asal*, *cylA*, *efaA*, *esp* in *gelE* (zastopanost posameznega gena pri izolatih, povezanih z bakteriemijo: 36,4–100 %, zastopanost posameznega gena pri izolatih, povezanih z okužbami sečil: 41,7–100%), medtem ko izolati, povezani z endokarditisom, niso imeli vseh zgoraj naštetih genov, temveč le gene *ace*, *asal* in *efaA* (zastopanost posameznega gena pri izolatih 44,4–100%) (Creti in sod., 2004). Med šestimi vzorci virulenčnih dejavnikov pri humanih kliničnih izolatih vrste *E. faecium* je bil najpogostejši *esp-hyl*; ugotovili smo ga pri polovici izolatov, po večini iz hemokultur ( $n = 10$ ), pa tudi iz vzorcev urina ( $n = 4$ ) in aspiratov sapnika ( $n = 2$ ). Precej manj humanih kliničnih izolatov vrste *E. faecium* je vsebovalo gene za virulenčne dejavnike kot izolati vrste *E. faecalis*, z izjemo gena *hyl*. Gen *hyl* smo ugotovili pri 53,3 % izolatih vrste *E. faecium* in samo pri 2,8 % izolatih vrste *E. faecalis* iz humanih kliničnih vzorcev. Ta gen je široko razširjen pri kliničnih izolatih vrste *E. faecium*, zanj je dolgo veljalo, da je njegova prisotnost omejena na to vrsto (Laverde in sod., 2011). Vendar pa je bil nedavno opisan tudi pri izolatih vrste *E. faecalis* (Hasan in sod., 2018; Strateva in sod., 2016; Ben Yahia in sod., 2018), kar podpira ugotovitve naše raziskave. Kombinacija genov *esp* in *hyl* je bila značilno povezana s humanimi kliničnimi izolati vrste *E. faecium*. Tako kombinacijo genov smo ugotovili le še pri 2,8 % izolatov vrste *E. faecalis* iz humanih kliničnih vzorcev, medtem ko pri vseh ostalih skupinah vzorcev ni bila prisotna. Pogostost prisotnosti gena *esp* pri kliničnih izolatih vrste *E. faecium* naj bi se po poročanju drugih avtorjev povečevala v primerjavi s kliničnimi izolati vrste *E. faecalis* (Nasaj in sod., 2016). Izolati iz urina so bili, glede na izvor vzorca, v skupini humanih kliničnih vzorcev nosilci največ virulenčnih genov.

Pri izolatih vrste *E. faecalis* iz živalskih kliničnih vzorcev smo ugotovili 13 različnih virulenčnih tipov, med katerimi je bil najpogostejši *ace-efaA-gelE* (21,7 %), kar predstavlja glavno razliko v primerjavi s humanimi izolati iste vrste. Namreč, pri izolatih iz humanih kliničnih vzorcev smo hkratno kombinacijo šestih genov (*ace-asal-cylA-efaA-esp-gelE*) ugotovili pri 31,0 % izolatih vrste *E. faecalis* in 3,3 % vrste *E. faecium*, pri izolatih iz živalskih kliničnih vzorcev pa le v 10,9 % deležu pri vrsti *E. faecalis*. Pri živalih so največ genov hkrati

vsebovali štirje izolati iz vzorcev urina in en izolat iz sluhovoda. Glede na prisotnost posameznih genov pri enterokokih iz kliničnih vzorcev ljudi in živali, smo pri vrsti *E. faecalis* večje razlike v deležu ugotovili pri genih *cylA*, *esp* in *gelE*, pri ostalih iskanih genih pa so bili deleži primerljivi ali celo enaki. Pri humanih kliničnih izolatih vrste *E. faecalis* so bili geni za virulenčne dejavnike zastopani v sledečih deležih: *ace* (76,1 %), *asa1* (64,8 %), *cylA* (45,1 %), *efaA* (97,2 %), *esp* (71,8 %), *gelE* (88,7 %) in *hyl* (2,8 %). Pri živalskih kliničnih izolatih vrste *E. faecalis* pa je bila zastopanost genov naslednja: *ace* (76,1 %), *asa1* (60,9 %), *cylA* (30,4 %), *efaA* (97,8 %), *esp* (47,8 %), *gelE* (69,6 %) in *hyl* (2,2 %). Nasprotno pa je veljalo za izolate vrste *E. faecium*, kjer so bili geni veliko bolj zastopani pri humanih kliničnih izolatih. Pri humanih kliničnih izolatih vrste *E. faecium* smo gene za virulenčne dejavnike ugotovili v sledečih deležih: *ace* (13,3 %), *asa1* (6,7 %), *cylA* (6,7 %), *efaA* (13,3 %), *esp* (70,0 %), *gelE* (6,7 %) in *hyl* (53,3 %), medtem ko so bili živalski klinični izolati vrste *E. faecium* nosilci le gena *esp* (2,8 %). Podatkov o prisotnosti virulenčnih dejavnikov enterokokov pri kliničnih vzorcih ljubiteljskih živali, predvsem psov in mačk, od koder smo izolirali večino enterokokov v naši raziskavi, po nam dostopnih informacijah, ni na voljo. Obstajajo pa nekatere raziskave, v katerih so ugotavljali prisotnost določenih virulenčnih dejavnikov pri enterokokih v fecesu zdravih ljubiteljskih živali (Iseppi in sod., 2015; Kubašová in sod., 2017; Pillay in sod., 2018). V primerjavi z njihovimi rezultati, smo pri kliničnih izolatih vrste *E. faecalis* za vse iskane gene, razen za gen *gelE*, ugotovili večji delež prisotnosti genov za virulenčne dejavnike, kar nakazuje vlogo teh genov pri nastanku okužbe. Nasprotno pa so v opisanih raziskavah pri izolatih vrste *E. faecium* komenzalni enterokoki izkazovali večji delež prisotnosti genov *efaA* in *gelE* kot klinični izolati vrste *E. faecium* v naši raziskavi. Pri vseh skupinah, ne glede na klinični izvor, je bilo število genov virulenčnih dejavnikov veliko večje pri vrsti *E. faecalis* (Iseppi in sod., 2015; Kubašová in sod., 2017).

Prisotnost gena *esp*, ki kodira enterokokni površinski protein, je bila pri enterokokih iz ljudi, živali in živil živalskega izvora predhodno že opisana (Eaton in Gasson, 2001; Mannu in sod., 2003; Mohar Lorbeg, 2008; Tsirikonis in sod., 2012; Valenzuela in sod., 2009). Vendar pa je bila pogosteje ugotovljena pri kliničnih kot pri komenzalnih izolatih (Shankar in sod., 1999) in je bila pri izolatih iz mesa, mleka in mlečnih izdelkov odkrita v manjšem deležu (Jahan in Holley, 2014; Klibi in sod., 2013; Mannu in sod., 2003; Mohar Lorbeg, 2008). V naši raziskavi smo gen *esp* ugotovili v skoraj enakih deležih pri humanih kliničnih izolatih vrst *E. faecalis* (71,8 %) in *E. faecium* (70,0 %). V precej visokem deležu smo gen *esp* ugotovili tudi pri izolatih vrste *E. faecalis* iz kliničnih vzorcev živali (47,8 %), mleka in mlečnih izdelkov (47,9 %) in školjk (32,1 %). Podatki o prisotnosti gena *esp* pri enterokokih v mleku in mlečnih izdelkih se v literaturi razlikujejo (Mannu in sod., 2003; Martins Perin in sod., 2014; Mohar Lorbeg, 2008; Valenzuela in sod., 2009), medtem ko podatkov o prisotnosti genov za virulenčne dejavnike pri enterokokih iz školjk klapavic nismo zasledili. Pri izolatih iz drugih skupin vzorcev pa je bil delež pojavnosti gena *esp* nižji ali pa ga sploh nismo ugotovili (enterokoki iz vseh vzorcev perutnine in enterokoki s prašičje farne in klavnice).

Pri izolatih vrste *E. faecium* smo gene, povezane z virulenco, našli v večjem deležu (kot je že opisano zgoraj) samo pri humanih kliničnih izolatih, v zelo majhnem deležu pa smo ugotovili tudi posamezne gene pri izolatih iz kliničnih vzorcev živali in školjk. Pri izolatih vrste *E. faecium* iz vzorcev perutnine, prašičev in prežvekovalcev iskanih genov za virulenčne dejavnike nismo ugotovili. Po podatkih iz literature je bila prisotnost genov *asa1*, *cylA*, *efaA*, *esp*, *gelE* and *hyl* sicer potrjena pri izolatih vrste *E. faecium* iz mesa in mesnih izdelkov ter mleka in mlečnih izdelkov (Jahan in sod., 2014; Martins Perin in sod., 2014; Valenzuela in sod., 2008). V splošnem izkazujejo izolati vrste *E. faecalis* iz živil več virulenčnih lastnosti kot izolati vrste *E. faecium* (Jahan in sod., 2014). Izolati vrste *E. faecium* živalskega izvora niso posebej pomembni za okužbe ljudi, jih je pa pomembno upoštevati kot morebitne prenašalce genov za odpornost na druge patogene enterokoke (Hammerum, 2012). Tudi vrsti *E. hirae* in *E. mundtii* lahko predstavljata rezervoar genov za virulenčne dejavnike; v naši raziskavi smo odkrili gene *ace*, *asa1* in *efaA* pri izolatih vrste *E. hirae* ter gene *ace*, *efaA* in *gelE* pri vrsti *E. mundtii*. Po drugi strani pa naj bi izolati vrste *E. faecalis* živalskega izvora sami po sebi predstavljali nevarnost za ljudi, saj so bili odkriti enaki tipi izolatov vrste *E. faecalis* pri živalih, v mesu, v blatu ljudi in pri bolnikih z enterokokno bakteriemijo (Hammerum, 2012).

Rezultati naše raziskave so pokazali visoko prevalenco genov za virulenčne dejavnike pri izolatih vrste *E. faecalis* iz mesa, mleka, mlečnih izdelkov in školjk. Več kot tri gene hkrati smo odkrili pri 38,0 % izolatov iz živil živalskega izvora, kar predstavlja večji delež kot poročajo drugi avtorji (Medeiros in sod., 2014). Kar 98,8 % izolatov iz živil je vsebovalo vsaj en gen za virulenčne dejavnike, kar je v skladu s predhodno objavljeno raziskavo, v kateri so prav tako ugotovili visok delež izolatov vrste *E. faecalis* iz štirih vrst mesa, ki so bili nosilci genov za virulenčne dejavnike (Aslam in sod., 2012). V naši raziskavi je bila pri izolatih vrste *E. faecalis* iz mesa najpogostejša kombinacija genov *ace-efaA-gelE*, pri izolatih iz mleka in mlečnih izdelkov sta bili najpogostejši kombinaciji *ace-efaA-esp-gelE* in *ace-asa1-efaA-gelE*, pri školjkah pa *efaA-gelE*. To je pomemben izsledok, saj sta gena *efaA* in *gelE* povezana s poslabšanjem endokarditisa pri ljudeh (Lowe in sod., 1995; Sedgley in sod., 2005). Polega tega je bila prisotnost gena *ace* pogosto potrjena pri izolatih vrste *E. faecalis* iz kliničnih vzorcev in živil živalskega izvora v prodaji (Aslam in sod., 2012; Creti in sod., 2004; Jahan in sod., 2014; Medeiros in sod., 2014). Temu pritrjujejo tudi rezultati naše raziskave, saj je bil gen *ace* pri izolatih iz kliničnih vzorcev ljudi in živali ter iz vseh vzorcev mesa, mleka in mlečnih izdelkov zastopan v visokem deležu (69,1–84,7 %), pri izolatih iz školjk sicer v nekoliko nižjem (42,9 %), medtem ko smo gen *ace* našli le pri nekaj humanih kliničnih izolatih vrste *E. faecium* (13,3 %).

Podobno, sočasno izražanje genov za citolizin (*cylA*) in agregacijsko snov (*asa1*) vpliva na povečano patogenost izolatov vrste *E. faecalis* (Shankar in sod., 2004). V naši raziskavi smo potrdili prisotnost obeh genov (*cylA* in *asa1*) hkrati le pri manjšem deležu izolatov vrste *E. faecalis* iz mesa (5,1 % v piščančjem mesu, 4,4 % v svinjini in 7,8 % v govedini), prav tako pa pri izolatih iz mleka in mlečnih izdelkov (14,6 %) ter školjk (14,3 %). Predhodne objave poročajo, da je bila pojavnost gena *asa1*, ne glede na kombinacijo z drugimi geni, pri izolatih

vrste *E. faecalis* iz živil visoka (Aslam in sod., 2012; Eaton in Gasson, 2001; Franz in sod., 2001; Jahan in sod., 2014). V naši raziskavi smo gen *asa1* ugotovili pri več kot polovici izolatov iz mleka in mlečnih izdelkov (56,3 %) ter piščančjega mesa (54,2 %), pri 42,6 % izolatov iz svinjine ter četrtini izolatov vrste *E. faecalis* iz govedine in školjk (obakrat 25,0 %). Prav tako smo prisotnost gena *cylA* potrdili v manjšem deležu izolatov vrste *E. faecalis* iz vseh vrst mesa (4,4–7,8 %), pri izolatih iz mleka in mlečnih izdelkov ter školjk je bil delež nekoliko višji (14,3–14,6 %), njegova pojavnost pa je bila značilno pogostejša pri kliničnih izolatih ljudi (45,1 %) in živali (30,4 %). O prisotnosti tega gena pri manjšem številu izolatov iz fermentiranih suhih klobas, govedine, svinjine ter drugih živil živalskega izvora poročajo tudi nekatere druge raziskave (Aslam in sod., 2012; Jahan in sod., 2014; Medeiros in sod., 2014).

Gen, ki kodira endokraditisni antigen (*efaA*), je bil najpogosteje ugotovljen gen tako pri vseh kliničnih izolatih vrste *E. faecalis* kot tudi pri nekliničnih izolatih pri vseh skupinah vzorcev (94,2–100,0 %). To je v skladu z raziskavo, v kateri so avtorji postavili hipotezo, da je gen *efaA* pomemben za obstanek enterokokov v okolju, ne le v tkivih človeškega organizma (Gomes in sod., 2008). Po drugi strani pa smo gen *efaA* našli le pri nekaj humanih kliničnih izolatih vrste *E. faecium* (13,3 %) ter pri nobenem izolatu iste vrste iz ostalih vzorcev, kar je v nasprotju z raziskavo, v kateri poročajo o 63% *efaA*-pozitivnih izolatih vrste *E. faecium* iz živil živalskega izvora (Valenzuela in sod., 2009). Podobno je bila prisotnost gena *gelE*, ki kodira želatinazo, pogosto ugotovljena pri izolatih vrste *E. faecalis* iz kliničnih vzorcev, živil živalskega izvora in okolja (64,1–100,0 %). Pri izolatih vrste *E. faecium* pa je bil gen *gelE* ugotovljen samo v majhnem deležu (6,7 %) pri humanih kliničnih izolatih, pri ostalih izolatih vrste *E. faecium* pa ga nismo ugotovili. Naše ugotovitve se skladajo s preteklimi poročili o visokem deležu izolatov vrste *E. faecalis* in nizkem deležu izolatov vrste *E. faecium* iz živil živalskega izvora, ki vsebujejo gen *gelE* (Aslam in sod., 2012; Jahan in sod., 2014; Klibi in sod., 2013; Medeiros in sod., 2014).

Na osnovi dobljenih rezultatov smo delno potrdili četrto hipotezo, saj so bili izmed sedmih preiskovanih genov samo štirje (*asa1*, *cylA*, *esp* in *hyl*) statistično značilno ( $p < 0,001$ ) bolj zastopani pri kliničnih izolatih enterokokov kot pri komenzalnih enterokokih. Poleg tega pa smo tako pri enterokokih iz kliničnih vzorcev kot tudi pri enterokokih iz drugih skupin odkrili veliko število različnih virulenčnih tipov, kar dokazuje veliko raznolikost virulenčnih dejavnikov tudi pri komenzalnih enterokokih.

### 5.3 FILMOTVORNOST

V doktorski nalogi smo ugotavljali sposobnost tvorbe biofilma pri 92 izbranih izolatih enterokokov. Večino izolatov (57,6 %) smo uvrstili v skupino močnih tvorcev biofilma (S), med katerimi so bili le izolati vrst *E. faecalis* in *E. faecium*. Sledili so jim srednje močni tvorci biofilma (M; 33,7 %) in šibki tvorci biofilma (W; 8,7 %). Potrdili smo že znano statistično značilno povezavo med prisotnostjo genov *ace* in *esp* in povečano filmotvornostjo, medtem ko za gen *asa1* tovrstne povezave nismo ugotovili, kar je v nasprotju s predhodnimi raziskavami

(Tendolkar in sod., 2004; Chuang-Smith in sod., 2010; Cui in sod., 2020; Soares in sod., 2014). Vendar pa smo pri primerjavi izolatov, ki so bili nosilci kombinacije vseh treh genov (*ace*, *asal* in *esp*) in izolatov brez njih, ugotovili močno značilno povezavo s filmotvornostjo. S tem smo delno potrdili peto hipotezo, da bodo izolati z geni, ki so udeleženi pri tvorbi biofilma (*ace*, *asal* in *esp*), to lastnost izrazili tudi fenotipsko. Pri izolatih s kombinacijo vseh treh genov ter za gena *ace* in *esp* smo namreč ugotovili močno značilno povezavo s filmotvornostjo, vendar tovrstne povezave nismo ugotovili za gen *asal*. Ker značilnih razlik v filmotvornosti med izolati kliničnega izvora in komenzalnimi izolati (neodvisno od genetskega ozadja) nismo ugotovili ( $p = 0,4638$ ), se zdi v kontekstu filmotvornosti bolj kot njihov vir izolacije pomembno genetsko ozadje seva oz. nabor genov, povezanih s filmotvornostjo. Našo ugotovitev potrjujejo tudi druge raziskave, pri katerih prav tako niso ugotovili večje sposobnosti tvorbe biofilma pri kliničnih izolatih vrste *E. faecalis* v primerjavi z nekliničnimi (Johansson in Rasmussen, 2013; Soares in sod., 2014). Johansson in Rasmussen (2013) v raziskavi o izolatih vrste *E. faecalis* iz kliničnih vzorcev ljudi s potrjenim infekcijskim endokarditisom ter izolatih iste vrste iz fecesa zdravih ljudi poročata o večji filmotvornosti pri enterokokih normalne črevesne mikrobiote kot pa pri izolatih, povezanih z endokarditisom. Soares in sod. (2014) predvidevajo, da so pri invazivnih izolatih enterokokov bolj kot sama aderenza pomembnejše druge virulenčne determinante, npr. razgradnja kolagena in drugih beljakovin, ki vpliva na večjo invazivnost ter omogoča širjenje enterokokov v tkivu gostitelja. Izpostaviti velja, da v tej raziskavi nismo ugotovili nefilmotvornih izolatov (N); če prisotnost gena *asal* bolj vpliva na samo prisotnost filmotvornosti kot pa na razlike v ravni (že obstoječe) filmotvornosti, je to lahko razlog, da značilnih razlik med filmotvornimi skupinami W, M in S nismo ugotovili. Podobno so odsotnost značilne povezave med prisotnostjo gena *asal* in različno ravni filmotvornosti (W, M oz. S) opisali tudi avtorji Zheng in sod. (2017). Ker je za izražanje filmotvornosti poleg same prisotnosti genov pomembna tudi raven njihovega izražanja (Zheng in sod., 2017), bi bilo v prihodnje raziskave filmotvornosti enterokokov potrebno vključiti tudi ugotavljanje izražanja preiskovanih genov.

## 6 ZAKLJUČKI

V različnih kliničnih vzorcih živali, mesu piščancev, prašičev in goveda, v mleku in mlečnih izdelkih, školjkah, fecesu rejnih živali ter okoljskih vzorcih s farm in klavnic smo ugotovili 16 različnih vrst enterokokov, kar potrjuje, da zasedajo številne ekološke niše. V vseh skupinah vzorcev sta bili najpogosteje izolirani vrsti *E. faecalis* in *E. faecium*, razen pri kliničnih vzorcih piščancev, kjer je prevladovala vrsta *E. cecorum*, in pri okoljskih vzorcih s prašičje farne, kjer je prevladovala vrsta *E. hirae*.

Proti antibiotikom so najbolj odporni enterokoki iz kliničnih vzorcev ljudi in živali, mesa piščancev in s perutninske klavnice, najmanj odporni pa so enterokoki iz govejega mesa.

Večkratno odporni enterokoki najpogosteje pripadajo vrstam *E. faecium* in *E. faecalis*, drugim le izjemoma. Klinični vzorci ljudi in živali ter vzorci iz okolja prehranske verige so pomemben vir večkratno odpornih enterokokov, kakor tudi meso piščancev. Ugotovitev večkratno odpornih izolatov v školjkah klapavicah kaže na njihovo prisotnost v naravnem okolju.

Proti vankomicinu odporni enterokoki vrste *E. faecium* so prisotni tudi pri domačih ljubljjenčkih, rejnih živalih in v proizvodnem okolju. Smiselno bi bilo genotipizirati izolate iz navedenih virov, da bi ugotovili, ali sodijo v klonalni kompleks CC17, ki je povezan z bolnišničnimi okužbami in visoko patogenostjo pri ljudeh. Prav tako bi bilo smotno opraviti genetsko primerjavo proti vankomicinu odpornih enterokokov iz ljudi in živali.

Zaradi zoonotskega pomena VRE in pojavljanja visoko patogenih enterokokov pri domačih ljubljjenčkih bi bilo smiselno vzpostaviti sistem spremljanja odpornosti indikatorskih enterokokov pri ljubiteljskih živalih.

Enterokoki iz živali in živil živalskega izvora imajo načeloma dobro ohranjeno občutljivost za kritično pomembne antibiotike, namenjene za zdravljenje okužb pri ljudeh. Ker pa se tudi pri živalih in živilih že pojavljajo enterokoki s pridobljeno odpornostjo proti navedenim antibiotikom, bi bilo smiselno s tipizacijo raziskati njihov izvor.

Veliko število virulenčnih tipov pri enterokokih nakazuje na njihov virulenčni potencial, zlasti pri vrsti *E. faecalis*. Prisotnost več genov za virulenčne dejavnike hkrati pri izolatih iz živali in živil predstavlja pomemben rezervoar virulentnih enterokokov za ljudi.

Enterokoki vrste *E. faecium* so bolj odporni proti antibiotikom, medtem ko so enterokoki vrste *E. faecalis* nosilci večjega števila virulenčnih dejavnikov in močnejši tvorci biofilmov. Tvorba biofilma lahko v medicini predstavlja težavo zaradi okužb sečil, kontaminacije katetrov in implantatov, v živilski industriji pa pomeni nevarnost stalne kontaminacije živil ter manjšo učinkovitost razkuževanja površin.



Živila živalskega izvora, zlasti meso perutnine, lahko predstavljajo vir odpornih enterokokov za potrošnika. Prisotnost večkratno odpornih enterokokov v surovem mleku in školjkah pomeni tveganje za zdravje ljudi, če ta živila uživamo surova ali termično slabo obdelana.

Enterokoki pri rejnih živalih in v živilih živalskega izvora so dober pokazatelj, kako močan je selekcijski pritisk zaradi uporabe določenega antibiotika ter kakšno odpornost lahko posledično pričakujemo pri patogenih bakterijah. Zato je priporočljiv nadzor nad odpornostjo enterokokov v živilih živalskega izvora, še zlasti, če se jih uživa surova ali brez zadostne termične obdelave.

## 7 POVZETEK

Enterokoki so del normalne črevesne mikrobiote, vendar lahko povzročajo različne okužbe pri ljudeh in živalih, proti vankomicinu odporne enterokoke pa uvrščamo tudi med pogoste povzročitelje bolnišničnih okužb. Trenutno poznamo več kot 60 vrst enterokokov, med katerimi sta klinično najpomembnejši vrsti *E. faecalis* in *E. faecium*, v veterinarski medicini pa tudi vrsti *E. cecorum* in *E. hirae*. Pri razvoju okužbe sodelujejo različni virulenčni dejavniki, ki omogočajo enterokokom pritrnitev na gostiteljske celice, kolonizacijo sluznice črevesja ter širjenje v druge organe. Enterokoki so že naravno odporni proti številnim skupinam protimikrobnih zdravil, hkrati pa lahko pridobijo sekundarno odpornost tudi proti vsem trenutno znanim antibiotikom.

Namen naše raziskave je bil pridobiti podatke o odpornosti in virulenčnih dejavnikih pri enterokokih, izoliranih iz vzorcev rejnih in ljubiteljskih živali ter živil živalskega izvora na slovenskem tržišču, ter jih primerjati z enterokoki, izoliranih iz kliničnih vzorcev ljudi.

V prvem sklopu naloge smo pridobili izolate enterokokov iz kliničnih vzorcev ljudi in živali, vzorcev perutnine (meso in feces piščancev, vzorci iz perutninske klavnice), vzorcev prašičev (meso in feces prašičev, vzorci s prašičje farme tik pred zakolom živali ter iz klavnice), vzorcev prežvekovalcev (meso govedi ter mleko in mlečni izdelki) ter školjk klapavic. Skupaj smo analizirali 854 enterokokov, ki so pripadali šestnajstim vrstam. Več kot polovica vseh izolatov je pripadala vrsti *E. faecalis*, četrtnina vrsti *E. faecium*, druge vrste (*E. hirae*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. italicus*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. avium*, *E. canitestini*, *E. canis*, *E. devriesei* in *E. thailandicus*) pa so bile zastopane v manj kot 10 % deležu.

V drugem sklopu naloge smo z mikrodilucijsko metodo določanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) ugotavljali odpornost enterokokov proti 12 antibiotikom iz devetih različnih skupin. Med vsemi 854 testiranimi enterokoki smo največji delež odpornosti ugotovili proti tetraciklinu (43,3 %), eritromicinu (25,4 %) in ciprofloksacinu (10 %), pri ostalih antibiotikih pa je bil delež odpornih izolatov pod 10 %. Največji delež odpornosti smo ugotovili v skupini enterokokov iz kliničnih vzorcev ljudi (88,1 %) in živali (74,5 %), mesa piščancev (75,3 %) in perutninske klavnice (72,7 %), najmanj odpornih enterokokov pa smo izolirali iz govejega mesa (24,4 %). V skupini večkratno odpornih enterokokov (VOB) smo največji delež ugotovili pri kliničnih vzorcih ljudi (73,3 % pri vrsti *E. faecium* in 29,6 % pri vrsti *E. faecalis*) in živali (80 % pri vrsti *E. faecium* in 21,7 % pri vrsti *E. faecalis*). Visok delež VOB pa smo ugotovili tudi v vzorcih vzdolž prehranske verige: na perutninski klavnici (33,3 % pri vrsti *E. faecium* in 26,7 % pri vrsti *E. faecalis*) in na prašičji farmi (71,4 % pri vrsti *E. faecium*). Najnižji delež VOB je bil v skupini vzorcev rdečega mesa (meso prašičev in govedi), medtem ko pri izolatih *E. faecium* iz mesa prašičev in govedi, mleka in mlečnih izdelkov, školjk ter pri izolatih vrste *E. faecalis* na prašičji farmi in klavnici VOB nismo ugotovili. Ugotovili smo tudi 10 proti vankomicinu odpornih (VRE) izolatov *E. faecium* (devet iz vzorcev perutnine, en iz

hemokulture psa), pri katerih smo s testom PCR dokazali gen *vanA*. Glede na visoke vrednosti MIK za gentamicin smo v skupino HLAR uvrstili 59 enterokokov iz kliničnih vzorcev ljudi in živali, mesa in fecesa piščancev, mesa prašičev in govedi ter školjk. Glede na posamezne vrste enterokokov smo največ odpornih izolatov ugotovili pri vrstah *E. faecalis* in *E. faecium*, pri vrstah *E. canis*, *E. devriesei* in *E. mundtii* pa odpornih izolatov sploh nismo odkrili.

V tretjem sklopu naloge smo z metodo PCR ugotavljali prisotnost sedmih genov za virulenčne dejavnike (*ace*, *asal*, *cylA*, *efaA*, *esp*, *gelE* in *hyl*) pri vseh 854 izolatih. Gene za iskane virulenčne dejavnike smo ugotovili le pri štirih vrstah: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* in *E. mundtii*. Pri izolatih vrst *E. faecalis* in *E. faecium* smo odkrili vseh sedem iskanih genov, medtem ko smo pri izolatih vrste *E. hirae* ugotovili le gene *ace*, *asal* in *efaA*, pri vrsti *E. mundtii* pa gene *ace*, *efaA* in *gelE*. Največ genov smo ugotovili pri izolatih vrste *E. faecalis*, od tega najpogosteje *efaA* (98,2 %), *gelE* (82,1 %) in *ace* (76 %). Izolati vrste *E. faecium* so bili najpogosteje nosilci genov *esp* (10,7 %) in *hyl* (7,9 %). Skupaj smo pri vseh testiranih enterokokih določili 28 različnih virulenčnih tipov. Največjo raznolikost smo ugotovili pri izolatih vrste *E. faecalis*, kjer smo pri izolatih iz svinjine ugotovili 15 različnih virulenčnih tipov, pri humanih kliničnih izolatih 14, pri izolatih iz kliničnih vzorcev živali ter vzorcev mleka in mlečnih izdelkov pa 13 različnih virulenčnih tipov. Najmanj virulenčnih tipov (dva) smo ugotovili pri izolatih vrste *E. faecalis* iz prašičje farme in klavnice. Pri izolatih vrste *E. faecium* smo ugotovili precej manj virulenčnih tipov: šest pri humanih kliničnih izolatih, dva pri izolatih iz kliničnih vzorcev živali ter en virulenčni tip pri školjkah. Pri vrsti *E. hirae* smo ugotovili dva virulenčna tipa, pri vrsti *E. mundtii* pa enega.

V četrtem sklopu naloge smo na osnovi predhodno ugotovljenih genov za površinske adhezine (*ace*, *asal* in *esp*) izbrali 92 izolatov, pri katerih smo ugotavljali sposobnost tvorbe biofilma na mikrotitrskih ploščicah. V skupino močnih tvorcev biofilma smo uvrstili 57,6 % izbranih enterokokov, med katerimi so bili le izolati vrst *E. faecalis* in *E. faecium*. Skupino srednje močnih tvorcev biofilma je sestavljalo 33,7 % izolatov vseh štirih testiranih vrst. V skupino šibkih tvorcev biofilma pa smo uvrstili 8,7 % izolatov vrst *E. faecalis*, *E. faecium* in *E. hirae*. Pri izolatih s kombinacijo vseh treh genov smo ugotovili močno značilno povezavo s filmotvornostjo, vendar pa pri primerjavi posameznih genov te povezave nismo ugotovili za gen *asal*.

Pridobljene informacije o odpornosti enterokokov in virulenčnih dejavnikih pri ljubiteljskih in rejnih živalih ter v živilih živalskega izvora na slovenskem tržišču predstavljajo pomemben doprinos k oceni tveganja za prenos odpornih enterokokov ter virulenčnih determinant iz živali na ljudi, bodisi preko prehranske verige ali pa preko ljubiteljskih živali. Doktorska naloga predstavlja prvo večjo raziskavo na nacionalni in mednarodni ravni, ki zajema celostno obdelavo velikega števila komenzalnih enterokokov, pomemben segment pa predstavlja tudi ugotavljanje odpornosti enterokokov ter virulenčnih determinant v školjkah klapavicah. Podatki o odpornosti proti antibiotikom pri enterokokih iz kliničnih vzorcev živali predstavljajo prvi korak k pripravi smernic za zdravljenje enterokoknih okužb pri živalih na nacionalni in

tudi na mednarodni ravni ter oblikovanju evropskega standarda VETCAST, ki bo predpisoval klinične mejne vrednosti pri bakterijskih povzročiteljih okužb živali, vključno z enterokoknimi okužbami.

## 8 SUMMARY

Enterococci constitute a part of the normal intestinal microbiota, but can cause a variety of infections in humans and animals; moreover, vancomycin-resistant enterococci are among the common causes of nosocomial infections. More than 60 *Enterococcus* species have been described up to date, with *E. faecalis* and *E. faecium* being the clinically most important species. In veterinary medicine, *E. cecorum* and *E. hirae* are also clinically important. Various virulence factors are involved in the pathogenesis of enterococcal infections, allowing enterococci to attach to the host cells, colonize the intestinal mucosa and spread to other organs. Enterococci are intrinsically resistant to many groups of antimicrobial drugs, but can also acquire secondary resistance to all the currently known antimicrobials.

The aim of this study was to obtain data on antimicrobial resistance and virulence factors in *Enterococcus* isolates originating from farm and pet animals and food of animal origin on the Slovenian market and to compare them with isolates obtained from human clinical samples.

In the first part of the study, we obtained *Enterococcus* isolates originating from human and animal clinical samples, poultry samples (broiler meat and faeces, samples from poultry slaughterhouse), pig samples (meat and faeces of pigs, samples from a pig farm immediately before slaughter and from the slaughterhouse), ruminant samples (beef, milk and milk products) and mussels. A total of 854 *Enterococcus* isolates belonging to sixteen species were analyzed. More than half of all isolates belonged to *E. faecalis* and a quarter to *E. faecium*, whereas other species (*E. hirae*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. italicus*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. avium*, *E. canitestini*, *E. canis*, *E. devriesei* and *E. thailandicus*) accounted for less than 10 %.

In the second part of the study, minimum inhibitory concentrations to 12 antimicrobials from nine different groups were determined using a broth microdilution method. Among all 854 *Enterococcus* isolates, the highest resistance rates were observed for tetracycline (43.3 %), erythromycin (25.4 %) and ciprofloxacin (10 %), whereas for other antimicrobials, the proportion of resistant isolates was below 10 %. The highest resistance rate was observed among isolates of human clinical (88.1 %) and animal clinical origin (74.5 %), broiler meat (75.3 %) and poultry slaughterhouse (72.7 %). The lowest resistance rate was observed among isolates originating from beef (24.4 %). The highest rate of multiple drug-resistant (MDR) enterococci was observed among isolates of human clinical (73.3 % in *E. faecium* and 29.6 % in *E. faecalis*) and animal clinical origin (80 % in *E. faecium* and 21.7 % in *E. faecalis*). A high resistance rate was also observed in isolates obtained across the food chain: poultry slaughterhouse (33.3 % for *E. faecium* and 26.7 % for *E. faecalis*) and at the pig farm (71.4 % for *E. faecium*). The lowest rate of MDR was observed among the isolates from red meat (pork and beef), whereas no MDR isolates were observed among *E. faecium* isolates from pork and beef, milk and dairy products, mussels and among *E. faecalis* isolates from pig farm and slaughterhouse. We also found 10 vancomycin-resistant isolates of *E. faecium* (nine from

poultry samples, one from dog blood culture), in which the *vanA* gene was detected by PCR. According to the high MIC values for gentamicin, 59 *Enterococcus* isolates from human and animal clinical samples, meat and chicken faeces, pork and beef and mussels were included in the HLAR group. With regard to individual *Enterococcus* species, the highest resistance rates were observed among *E. faecalis* and *E. faecium* isolates, whereas no resistant isolates were observed among *E. canis*, *E. devriesei* and *E. mundtii* isolates.

In the third part of the study, PCR was used to determine the prevalence of seven virulence genes (*ace*, *asaI*, *cylA*, *efaA*, *esp*, *gelE* and *hyl*) among the 854 *Enterococcus* isolates. Virulence genes were identified in only four species, namely *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* and *E. mundtii*. In *E. faecalis* and *E. faecium*, all seven genes were detected, whereas only *ace*, *asaI* and *efaA* genes were present in *E. hirae* and in *E. mundtii* species genes *ace*, *efaA* and *gelE*. Most genes were found in *E. faecalis* isolates, with the highest prevalence observed for *efaA* (98.2 %), *gelE* (82.1 %) and *ace* (76 %). The prevalence of *esp* (10.7 %) and *hyl* (7.9 %) was highest among the *E. faecium* isolates. A total of 28 different virulence types were identified among all the tested *Enterococcus* isolates. The greatest diversity was found among *E. faecalis* isolates, for which 15 different virulence types were found among pork isolates, 14 among human clinical isolates and 13 among animal clinical isolates and also milk and dairy products isolates. Only two virulence types were found among *E. faecalis* isolates from pig farm and slaughterhouse. A lower number of different virulence types was observed among *E. faecium* isolates: six in human clinical isolates, two in isolates from animal clinical samples and one virulence type in isolates from mussels. Two virulence types were found among *E. hirae* and one in *E. mundtii* isolates.

In the fourth part of the study, we selected 92 isolates on the basis of prevalence of the previously assessed surface adhesin genes (*ace*, *asaI* and *esp*) to determine their biofilm forming ability on microtiter plates. A total of 57.6 % isolates had strong biofilm forming ability, among which all belonged to *E. faecalis* and *E. faecium*. A total of 33.7 % of isolates had moderate biofilm forming ability and belonged to all four tested species. The remaining 8.7 % isolates had weak biofilm forming ability and belonged to *E. faecalis*, *E. faecium* and *E. hirae*. In isolates that harboured all three surface adhesin genes, a strong significant association with biofilm forming ability was observed, but at the level of individual genes, no significant association was observed for *asaI*.

The collected results on the prevalence of antimicrobial resistance and virulence genes among *Enterococcus* isolates from pet and farm animals as well as food of animal origin on the Slovenian market represents an important contribution to the risk assessment for the transmission of resistant and virulent enterococci from animals to humans, either through the food chain or pets. This study represents the first comprehensive research at the national and international level, which includes the analysis of a large number of commensal enterococci, and an important aspect is the determination of antimicrobial resistance and virulence genes in mussels. Antimicrobial resistance among *Enterococcus* isolates of animal clinical origin

represent a first step towards the development of guidelines for the treatment of enterococcal infections in animals at national and international level and the development of a European VETCAST standard determining the clinical cut-off values for bacterial pathogens, including enterococci.

## 9 ZAHVALE

Iskreno se zahvaljujem mentoricama, izr. prof. dr. Ireni Zdovc in viš. znan. sod. dr. Mateji Pate, za njun čas, temeljit pregled doktorske naloge in njune konstruktivne komentarje.

Hvala tudi vsem članom komisije, prof. dr. Katji Seme, prof. dr. Andreju Kirbišu in znan. svet. dr. Matjažu Ocepku, za ažurnost pri pregledu naloge in korektne pripombe, kar je pripomoglo k izboljšanju moje doktorske disertacije

Hvala vsem sodelavkam in sodelavcem IMP, ki so kakorkoli pomagali pri mojem delu, tudi z nadomeščanjem v laboratoriju, na vajah ali zgolj z besedami podpore. Posebna zahvala gre Maji Lepen, Olgi Kosar in Špeli Gruden za tehnično pomoč pri izvedbi gore MIKov ter »molekularni« ekipi sodelavcev, dr. Darji Kušar, dr. Jani Avberšek in dr. Bojanu Papiću, ki so mi nesebično priskočili na pomoč. Jani najlepša hvala za vpeljavo molekularnih metod, Bojanu iskrena hvala za statistične izračune pri biofilmih in resnično posebna zahvala Darji za oazo in dobro energijo pisarne 77 ter vso pomoč pri izdelavi naloge.

Hvala tudi dr. Stanki Vadnjal, dr. Urški Henigman in Mariji Zekić iz Inštituta za varno hrano Veterinarske fakultete za pomoč pri zbiranju vzorcev školjk in mleka iz mlekomatov.

Zahvaljujem se tudi dr. Heleni Ribič in dr. Urški Dermota iz Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano v Kranju za zbirko enterokokov iz kliničnih vzorcev ljudi ter dr. Petri Mohar-Lorbeg in dr. Bojani Bogovič Matijašič iz Inštituta za mlekarstvo in probiotike Biotehniške fakultete za izolate iz vzorcev mleka in mlečnih izdelkov.

Iskreno se zahvaljujem mag. Brigiti Grecs-Smole za natančen in hiter pregled citirane literature.

Posebno iskrena zahvala še dr. Petri Mohar-Lorbeg za pomoč pri prvih korakih v svet biofilma.

Hvala tudi dr. Tanji Knific za pomoč pri statistični obdelavi (skoraj neobvladljive količine) vseh podatkov.

Hvala Maji in Špeli, da jadrata z mano v morju življenja.

Brez mojih, Ažbeta, Boruta, Mateje in Frančeka, ne bi bila to, kar sem. Hvala vam! Verjamem pa, da tam nekje še kdo bdi nad mano.

In čeprav nikoli ne bo prebral te zahvale, se za mehkobo njegovega kožuščka, protistresno terapijo in zvesto podporo v samotnih nočnih urah pisanja tega dela zahvaljujem našemu Marliju.



## 10 LITERATURA

Aarestrup FM, Butaye P, Witte W. Nonhuman reservoirs of enterococci. In: Gilmore MS, Clewell DB, Courvalin P, Dunny GM, Murraj BE, Rice LB, eds. The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antimicrobial resistance. Washington : ASM Press, 2002: 55– 99.

Abriouel H, Ben Omar N, Molinos AO et. al. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil and clinical samples. Int J Food Microbiol 2008; 123 (1/2): 38–49. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.067 (11. marec 2021)

Ahmed MO, Baptiste KE. Vancomycin-resistant enterococci: a review of antimicrobial resistant mechanisms and perspectives of human and animal health. Microb Drug Resist 2018; 24 (5): 590–606. doi:10.1089/mdr.2017.0147 (1. marec 2021)

Ammerlaan HS, Harbarth S, Buiting AG, et al. Secular trends in nosocomial bloodstream infections: antibiotic-resistant bacteria increase the total burden of infection. Clin Infect Dis 2013; 56: 798–805. doi: 10.1093/cid/cis1006 (11. marec 2021)

Anderson AC, Jonas D, Huber I, et al. *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. Front Microbiol 2016; 6: e1534. doi:10.3389/fmicb.2015.01534 (4. marec 2021)

Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. Nat Rev Microbiol 2012; 10: 266–78. doi: 10.1038/nrmicro2761 (15. okt. 2020)

Arias CA, Panesso D, McGrath DM, et al. Genetic basis for in vivo daptomycin resistance in enterococci. N Engl J Med 2011; 365 (10): 892–900. doi: 10.1056/NEJMoa1011138 (27. febr. 2020)

Aslam M, Diarra MS, Checkley S, Bohaychuk V, Masson L. Characterisation of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. isolated from retail meat in Alberta, Canada. Int J Food Microbiol 2012; 156: 222–30. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.026 (10. marec 2021)

Aslangul E, Massias L, Meulemans A, et al. Acquired gentamicin resistance by permeability impairment in enterococcus faecalis. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50 (10): 3615–21. doi: 10.1128/AAC.00390-06 (2. marec 2021)

Baccouri O, Boukerb AM, Ben Farhat L, et al. Probiotic potential and safety evaluation of *Enterococcus faecalis* OB14 and OB15, isolated from traditional Tunisian Testouri cheese

and Rigouta, using physiological and genomic analysis. *Front Microbiol* 2019; 10: e881 (15 str.) doi: 10.3389/fmicb.2019.00881 (28. feb. 2021)

Barbosa J, Gibbs PA, Teixeira P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. *Food Control* 2010; 21 (5): 651–6. doi: 10.1016/j.foodcont.2009.10.002 (4. marec 2021)

Barlow RS, McMillan KE, Duffy LL, Fegan N, Jordan D, Mellor GE. Antimicrobial resistance status of *Enterococcus* from Australian cattle populations at slaughter. *PLoS One* 2017; 12: e0177728 (13 str.) doi: 10.1371/journal.pone.0177728 (3. marec 2021)

Ben Braïek O, Morandi S, Cremonesi P, Smaoui S, Hani K, Ghrairi T. Safety, potential biotechnological and probiotic properties of bacteriocinogenic *Enterococcus lactis* strain isolated from raw shrimps. *Microb Pathog* 2018; 117: 109–17. doi: 10.1016/j.micpath.2018.03.005 (16. nov. 2020)

Ben Yahia H, Chairrat S, Hamdi N, et al. Antimicrobial resistance and genetic lineages of faecal enterococci of wild birds: emergence of *vanA* and *vanB* harbouring *Enterococcus faecalis*. *Int J Antimicrob Agents* 2018; 52 (6): 936–41. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.05.005 (13. marec 2021)

Ben Said L, Hamdaoui M, Klibi A, Ben Slama K, Torres C, Klibi N. Diversity of species and antibiotic resistance in enterococci isolated from seafood in Tunisia. *Ann Microb* 2017; 67: 135–41. doi: 10.1007/s13213-016-1246-y (7. marec 2021)

Bi R, Qin T, Fan W, Ma P, Gu B. The emerging problem of linezolid-resistant enterococci. *J Glob Antimicrob Resist* 2018; 13: 11–9. doi: 10.1016/j.jgar.2017.10.018 (24. jan. 2021)

Billington EO, Phag SH, Gregson DB, et al. Incidence, risk factors and outcomes for *Enterococcus* spp. blood stream infections: a population-based study. *Int J Infect Dis* 2014; 26: 76–82. doi: 10.1016/j.ijid.2014.02.012 (11. marec 2021)

Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1614–9. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03311.x (27. nov. 2020)

Bortolaia V, Espinosa-Gongora C, Guardabassi L. Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* on poultry meat. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22: 130–40. doi: 10.1016/j.cmi.2015.12.003 (3. marec 2021)

Boss R, Overesch G, Baumgartner A. Antimicrobial resistance of *Echerichia coli*, enterococci, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* from raw fish and seafood imported into Switzerland. *J Food Prot* 2016; 79 (7): 1240–6. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-15-463 (11. marec 2021)

Brložnik M, Golob M, Zdovc I. Enterokokni cistitis pri psu: primer neučinkovitosti antibiotikov in vivo. In: XXII. simpozij o aktualnih boleznih malih živali: zbornik referatov. Lipica : Slovensko združenje veterinarjev za male živali, 2009: 123–5.

Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13 (4): 686–707. doi: 10.1128/cmr.13.4.686-707.2000 (28. feb. 2021)

Ch'ng JH, Chong KKL, Lam LN, Wong JJ, Kline KA. Biofilm-associated infection by enterococci. *Nat Rev Microbiol* 2019; 17 (2): 82–94. doi: 10.1038/s41579-018-0128-7 (27. jan. 2021)

Chuang-Smith ON, Wells CL, Henry-Stanley MJ, Dunny GM. Acceleration of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by aggregation substance expression in an ex vivo model of cardiac valve colonization. *PloS One* 2010; 5 (12): e15798 (11 str.). doi: 10.1371/journal.pone.0015798 (11. marec 2021)

Church DL. Processing, isolation, detection, and interpretation of aerobic bacteriology cultures. In: Leber AL, ed. *Clinical microbiology procedures handbook: aerobic bacteria*. 4th ed. Vol. 1. Washington : ASM Press, 2016: echapter 3.3 3.3.1.1–3.3.2.15. doi: 10.1128/9781555818814.ch3.3

Cleveland J, Montville T, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* 2001; 71: 1–20. doi: 10.1016/s0168-1605(01)00560-8 (29. jan. 2021)

Creti R, Imperi M, Bertuccini, et al. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different source. *J Med Microbiol* 2004; 53: 13–20. doi: 10.1099/jmm.0.05353-0 (13. marec 2021)

Cui P, Feng L, Zhang L, et al. Antimicrobial resistance, virulence genes and biofilm formation capacity among *Enterococcus* species from yaks in Aba Tibetan Autonomous Prefecture, China. *Front Microbiol* 2020; 11: e1250 (9 str.). doi: 10.3389/fmicb.2020.01250 (11. marec 2021)

Cuong NV, Padungtod P, Thwaites G, Carrique-Mas JJ. Antimicrobial usage in animal production: a review of the literature with a focus on low- and middle-income countries. *Antibiotics* 2018; 7 (3): 75. doi: 10.3390/antibiotics7030075 (7. marec 2021)

Damborg P, Top J, Hendrickx AP, Dawson S, Willems RJ, Guardabassi L. Dogs are a reservoir of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* lineages associated with human. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 2360–5. doi: 10.1128/AEM.02035-08 (3. marec 2021)

Damborg P, Sørensen AH, Guardabassi L. Monitoring of antimicrobial resistance in healthy dogs: first report of canine ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* clonal complex 17. *Vet Microbiol* 2008; 132 (1/2): 190–6. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.04.026 (12. marec 2021)

de Jong A, Simjee S, Rose M, et al. Antimicrobial resistance monitoring in commensal enterococci from healthy cattle, pigs and chickens across Europe during 2004–14 (EASSA study). *J Antimicrob Chemother* 2019; 74: 921–30. doi: 10.1093/jac/dky537 (10. marec 2021)

de Lastours V, Maugy E, Mathy, et al. Ecological impact of ciprofloxacin on commensal enterococci in healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72 (6): 1574–80. doi:10.1093/jac/dkx043 (1. marec 2021)

Delaunay E, Abat C, Rolain JM. *Enterococcus cecorum* human infection, France. *New Microbes New Infect* 2015; 7: 50–1. doi: 10.1016/j.nmni.2015.06.004 (2. marec 2021)

de Herdt P, Defoort P, van Steelant J, et al. *Enterococcus cecorum* osteomyelitis and arthritis in broiler chickens. *Vlaams Diergen Tijds* 2008; 78: 44–48.

de Kraker ME, Jarlier V, Monen JC, Heuer OE, van de Sande N, Grundmann H. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe; trends from the European antimicrobial resistance surveillance system. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19: 860–8. doi: 10.1111/1469-0691.12028 (11. marec 2021)

Diarra MS, Rempel H, Champagne J, Masson L, Pritchard J, Topp E. Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. and characterization of isolates from broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 8033–43. doi: 10.1128/AEM.01545-10 (11. marec 2021)

Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67 (4): 1628–35. doi: 10.1128/AEM.67.4.1628-1635.2001 (5. okt. 2020)

ECDC. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) – Annual epidemiological report for 2019 [online]. Stockholm : European Centre for Disease Prevention and Control, 2020: 28. str. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2019.pdf> (6. marec 2021).

EFSA, European Food Safety Authority and ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA J* 2015; 13(2): e4036 (178 str.). doi:10.2903/j.efsa.2015.4036 (6. marec 2021)

EFSA, European Food Safety Authority. Scientific report. Analysis of the baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008 part B: factors associated with MRSA contamination of holdings. *EFSA J* 2010; 8 (6): e1597 (67 str.). doi: 10.2903/j.efsa.2010.1597 (11. marec 2021)

EFSA, European Food Safety Authority. Scientific opinion. Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition. EFSA panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP). *EFSA J* 2012a; 10 (5): e2682 (10 str.). doi: 10.2903/j.efsa.2012.2682 (2. feb. 2021)

EFSA, European Food Safety Authority. Technical specification on the harmonised monitoring and reporting of antimicrobial resistance in *Salmonella*, *Campylobacter* and indicator *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. bacteria transmitted through food. *EFSA J* 2012b; 10 (6): e2742 (64 str.). doi: 10.2903/j.efsa.2012.2742 (12. marec 2021)

ESVAC, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018. EMA, European Medicines Agency, 2020: 104 str. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2018-trends-2010-2018-tenth-esvac-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2018-trends-2010-2018-tenth-esvac-report_en.pdf) (8. marec 2021)

EURL-AMR, Priporočila Evropskega referenčnega laboratorija za ugotavljanje odpornosti proti protimikrobnim zdravilom [https://www.eurl-ar.eu/CustomerData/Files/Folders/23-eqas/497\\_eurl-ar-eqas-ec-ent-st-protocol-2019.pdf](https://www.eurl-ar.eu/CustomerData/Files/Folders/23-eqas/497_eurl-ar-eqas-ec-ent-st-protocol-2019.pdf) (27. okt. 2020)

EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Break points tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0. (112 str.) <http://www.eucast.org>. (1. jan. 2020)

Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 2006; 106: 1–24. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026 (15. nov. 2020)

Franciosi E, Settanni L, Cavazza A, Poznanski E. Presence of enterococci in raw cow's milk and “Puzzone di Moena” cheese. *J Food Process Preserv* 2009; 33: 204–17. doi: 10.1111/j.1745-4549.2008.00262.x (25. jan. 2021)

Franz CMAP, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NMK, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel WH. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67 (9): 4385–9. doi: 10.1128/AEM.67.9.4385-4389.2001 (12. marec 2021)

Franz CMAP, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. Enterococci in foods: a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol* 2003; 88: 105–22. doi:10.1016/S0168-1605(03)00174-0 (15. nov. 2020)

Franz CMAP, van Belkum MJ, Holzapfel WH, Abriouel H, Galvez A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev* 2007; 31: 293–310. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00064.x (15. nov. 2020)

Franz CMAP, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Gálvez A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int J Food Microbiol* 2011; 151 (2): 125–40. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014 (1. dec. 2020)

Furuya EY, Lowy FD. Antimicrobial-resistant bacteria in the community bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4: 36–45. doi: 10.1038/nrmicro1325 (28. feb. 2021)

Gaglio R, Couto N, Marques C, et al. Evaluation of antimicrobial resistance and virulence of enterococci from equipment surfaces, raw materials and traditional cheeses. *Int J Food Microbiol* 2016; 236: 107–14. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.020 (27. feb. 2021)

Galloway-Peña JR, Nallapareddy SR, Arias CA, Eliopoulos GM, Murray BE. Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. *J Infect Dis* 2009; 200: 1566–73. doi: 10.1086/644790 (27. feb. 2021)

García-Solache M, Rice JB. The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. *Clin Microbiol Rev* 2019; 32: e00058–18 (28 str.). doi: 10.1128/CMR.00058-18 (28. feb. 2021)

Gelsomino R, Vancanneyt M, Condon S, Swings J, Cogan TM. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *Int J Food Microbiol* 2001; 71: 177–88. doi: 10.1016/s0168-1605(01)00620-1 (12. dec. 2020)

Gelsomino R, Vancanneyt M, Cogan TM, Condon S, Swings J. Source of enterococci in a farmhouse raw-milk chesse. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 3660–5. doi: 10.1128/aem.68.7.3560-3565.2002 (9. marec 2021)

Germ J, Seme K. Enterokoki. In: Ihan A, Müller Premru M, Seme K, Matos T, eds. Medicinska bakteriologija z mikologijo in parazitologijo. Ljubljana : Medicinska fakulteta, 2020: 131–3.

Gilmore MS, Coburn PS, Nallapareddy SR, Murray BE. Enterococcal virulence. In: Gilmore MS, ed. The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antimicrobial resistance. Washington : ASM Press; 2002; 301–54.

Giraffa G. Enterococci from foods. FEMS Microbiol Rev 2002; 26 (2): 163–71. doi: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00608.x (12. dec. 2020)

Golob M, Mićunović J, Avberšek J, Zdovc I. Antimicrobial susceptibility patterns of *Enterococcus cecorum* and *Enterococcus hirae* isolates from broilers. In: XI Simpozij Peradarski dani 2015 s međunarodnim sudjelovanjem: zbornik. Šibenik : Hrvatski veterinarski institut, Centar za peradarstvo, 2015: 102–6.

Golob M, Pate M, Kušar D, et al. Antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from humans and retail meat. Biomed Res Int 2019; 2019: e2815279 (12 str.) doi: 10.1155/2019/2815279 (7. marec 2021)

Golob M, Pate M, Zdovc I. Enterokoki: vse pogostejši povzročitelji težko ozdravljivih okužb pri živalih. Vestn Vet Zb Slov 2018a; 13: 22–3.

Golob M, Pavlin D, Zdovc I. Enterokokna sepsa pri psu. Slov Vet Res 2011; 48 (suppl. 13): 71–4.

Golob M, Zdovc I, Pate M. Odpornost indikatorskih bakterij v školjkah iz slovenskega morja. eNBOZ 2018b; 7: 12–8. [https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/enboz\\_julij-avgust\\_0.pdf](https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/enboz_julij-avgust_0.pdf) (7. marec 2021)

Gomes BC, Esteves CT, Palazzo ICV, et al. Prevalence and characterisation of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. Food Microbiol 2008; 25 (5): 668–75. doi: 10.1016/j.fm.2008.03.008 (13. marec 2021)

Grmek Košnik I, Šolar F, Zdovc I, Golob M, Dermota U. Klinični pomen bakterije *Enterococcus cecorum* z opisom primera. eNBoz 2015; 5 (8): 14–6. [http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/enboz\\_sept\\_2015\\_0.pdf](http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/enboz_sept_2015_0.pdf) (2. marec 2021)

Guzman Prieto AM, van Schaik W, Rogers MRC, et. Al. Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones? Front Microbiol 2016; 7: e788 (15 str.) doi: 10.3389/fmicb.2016.00788 (13. jan. 2021)

Hall JL, Holmes MA, Baines SJ. Prevalence and antimicrobial resistance of canine urinary tract pathogens. *Vet Rec* 2013; 173 (22): 549. doi: 10.1136/vr.101482 (10. marec 2021)

Hammerum AM. Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clin Microbiol Inf* 2012; 18 (7): 619–25. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03829.x (29. okt. 2020)

Hammerum AM, Lester CH, Heuer OE. Antimicrobial-resistant enterococci in animals and meat: a human health hazard? *Foodborne Pathog Dis* 2010; 7 (10): 1137–46. doi: 10.1089/fpd.2010.0552 (29. okt. 2020)

Hasan KA, Ali SA, Rehman M, Bin-Asif H, Zahid S. The unravelled *Enterococcus faecalis* zoonotic superbugs: emerging multiple resistant and virulent lineages isolated from poultry environment. *Zoonoses Public Health* 2018; 65: 921–35. doi: 10.1111/zph.12512 (13. marec 2021)

Hayes JR, English LL, Carter PJ, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69 (12): 7153–60. doi: 10.1128/AEM.69.12.7153-7160.2003 (9. marec 2021)

Heikens E, Singh KV, Jacques-Palaz KD, et al. Contribution of the enterococcal surface protein Esp to pathogenesis of *Enterococcus faecium* endocarditis. *Microbes Infect* 2011; 13: 1185–90. doi: 10.1016/j.micinf.2011.08.006 (6. jan. 2021)

Henigman U, Biasizzo M, Vadnjal S, et al. Molecular characterization of noroviruses detected in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from harvesting areas in Slovenia. *New Microbiol* 2015; 38 (2): 225–33.

Heuer OE, Pedersen K, Jensen LB, Madsen M, Olsen JE. Persistence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in broiler houses after the avoparcin ban. *Microb Drug Resist* 2020; 8: 355–61. doi: 10.1089/10766290260469624 (11. marec 2021)

Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence* 2012; 3(5): 421–33. doi: 10.4161/viru.21282 (25. okt. 2019)

Evropska komisija. Izvedbeni sklep Komisije z dne 12. novembra 2013 o spremljanju in poročanju odpornosti zoonotskih in komenzalnih bakterij proti protimikrobnim snovem (2013/652 EU). *Ur List EU* 2013; L 303: 26–39. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/83e1934f-4d39-11e3-ae03-01aa75ed71a1/language-sl/format-PDFA1A> (14. nov. 2013)

Evropska komisija. Izvedbeni sklep Komisije (EU) 2020/1729 z dne 17. novembra 2020 o spremljanju in poročanju odpornosti zoonotskih in komenzalnih bakterij proti protimikrobnim



snovem ter o razveljavitvi Izvedbenega sklepa 2013/652/EU. Ur List EU 2020; L 387: 8–21. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020D1729&from=EN> (10. marec 2021)

Iseppi R, Messi P, Anacarso I, et al. Antimicrobial resistance and virulence traits in *Enterococcus* strains isolated from dogs and cats. *New Microbiol* 2015; 38 (3): 369–78.

Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Davis JA, Barrett JB, Frye JG. Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from dogs and cats in the United States. *J Appl Microbiol* 2009; 107: 1269–78. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04310.x (3. marec 2021)

Jahan M, Holley RA. Incidence of virulence factors in enterococci from raw meat and biofilm forming capacity at 25 °C and 37 °C. *Int J Food Microbiol* 2014; 170: 65–9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.002 (10. marec 2021)

Jahan M, Krause DO, Holley RA. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species from meat and fermented meat products isolated by a PCR-based rapid screening method. *Int J Food Microbiol* 2012; 163: 89–5. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.017 (10. marec 2021)

Jaouani I, Abbassi MS, Ribeiro SC, et al. Safety and technological properties of bacteriocinogenic enterococci isolates from Tunisia. *J App Microbiol* 2015; 119: 1089–100. doi:10.1111/jam.12916 (26. nov. 2020)

Jung A, Chen LR, Mitsu Suyemoto M, Barnes HJ, Borst LB. A review of *Enterococcus cecorum* infection in poultry. *Avian Dis* 2018; 62(3): 261–71. doi: 10.1637/11825-030618-Review.1 (1. marec 2021)

Kak V, Chow J. Acquired antibiotic resistance in enterococci. In: Gilmore MS, ed. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology and antimicrobial resistance*. Washington : ASM Press, 2002: 355–83.

Klare I, Badstübner D, Konstabel C, Böhme G, Claus H, Witte W. Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry. *Microb Drug Resist* 1999; 5: 45–52. doi: 10.1089/mdr.1999.5.45 (26. jan. 2021)

Klare I, Konstabel C, Badstübner D, Werner G, Witte W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol* 2003; 88 (2/3): 269–90. doi: 10.1016/s0168-1605(03)00190-9 (2. marec 2021)

Klein G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and gastro-intestinal tract. *Int J Food Microbiol* 2003; 88 (2/3): 123–31. doi: 10.1016/s0168-1605(03)00175-2 (10. marec 2021)

Klibi N, Said LB, Jouini A, et al. Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in enterococci from meat in Tunisia. *Meat Sci* 2013; 93 (3): 675–80. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.11.020 (17. jan. 2021)

Kotnik V. Antibiotiki in kemoterapevtiki. In: Gubina M, Ihan A, eds. *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Ljubljana : Medicinski razgledi, 2002: 427–38.

Kubašová I, Stropfová V, Lauková A. Safety assesment of commensal enterococci from dogs. *Folia Microbiol* 2017; 62: 491–8. doi: 10.1007/s12223-017-0521-z (13. marec 2021)

Laverde Gomez JA, van Schaik W, Freitas AR, et al. A multiresistance megaplasmid pLG1 bearing a *hyl<sub>Efm</sub>* genomic island in hospital *Enterococcus faecium* isolates. *Int J Med Microbiol* 2011; 301 (2): 165–75. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.08.015 (13. marec 2021)

Leavis HL, Bonten MJM, Willems RJL. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9 (5): 454–60. doi: 10.1016/j.mib.2006.07.001 (11.marec 2021)

Lebreton F, van Schaik W, McGuire AM, et al. Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. *mBio* 2013; 4(4): e00534–13. doi: 10.1128/mBio.00534-13 (20. feb. 2021)

Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. (update 24. feb. 2014). In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, eds. *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. [Online] Boston : Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014: 1–42.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/> (3. marec 2021)

Ledina T, Golob M, Djordjević J, Magas V, Colović S, Bulajić S. MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of Serbian artisanal cheeses microbiota. *J Consumer Prot Food Saf* 2018; 13 (3): 309–14. doi: 10.1007/s00003-018-1164-y (27. nov. 2019)

Liu Y, Wang Y, Wu C, et al. First report of the multidrug resistance gene *cfr* in *Enterococcus faecalis* of animal origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 1650–4. doi: 10.1128/AAC.06091-11 (28. febr. 2021)

Lowe AM, Lambert PA, Smith AW. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endokarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect Immun* 1995; 63 (2): 703–6. doi: 10.1128/IAI.63.2.703-706.1995 (4. marec 2021)

Genus *Enterococcus*. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. LPSN, 2021. <https://lpsn.dsmz.de/genus/enterococcus> (27. jan. 2021)

Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB. Family IV. Enterococcaceae fam. Nov. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, et al., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Vol. 3: The Firmicutes. New York : Springer, 2009: 594–623.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 268–81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x (25. feb. 2021)

Maietti L, Bonvini B, Huys G, Giraffa G. Incidence of antibiotic resistance and virulence determinants among *Enterococcus italicus* isolates from dairy products. *Syst Appl Microbiol* 2007; 30 (6): 509–17. doi: 10.1016/j.syapm.2007.05.002 (7. marec 2021)

Manson JM, Keis S, Smith JMB, Cook GM. Characterization of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VREF) isolate from a dog with mastitis: further evidence of a clonal lineage of VREF in New Zealand. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (7): 3331–3. doi: 10.1128/JCM.41.7.3331-3333.2003 (7. marec 2021)

Mannu L, Paba A, Daga E, et al. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int J Food Microbiol* 2003; 88 (2/3): 291–304. doi: 10.1016/s0168-1605(03)00191-0 (12. marec 2021)

Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. *Clinical veterinary microbiology*. 2nd ed. Edinburgh : Mosby Elsevier, 2013a: 59–63.

Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. *Clinical veterinary microbiology*. 2nd ed. Edinburgh : Mosby Elsevier, 2013b: 121–34.

Martín-Platero AM, Valdivia E, Maqueda M, Martínez-Bueno M. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *Int J Food Microbiol* 2009; 132: 24–32. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.01 (8. okt. 2018)

Martins Perin L, Miranda RO, Dimitrov Todorov S, Gombossy de Melo Franco BD, nero LA. Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk. *Int J Food Microbiol* 2014; 185: 121–6. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.001 (13. marec 2021)

McAuley CM, Britz ML, Gobius KS, Craven HM. Prevalence, seasonality and growth of enterococci in raw and pasteurized milk in Victoria, Australia. *J Dairy Sci* 2015; 98: 8348–58. doi: 10.3168/jds.2015-9335 (9. marec 2021)

Medeiros AW, Pereira RI, Oliveira DV, et al. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. *Braz J Microbiol* 2014; 45 (1): 327–32. doi: 10.1590/S1517-83822014005000031 (12. marec 2021)

Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; 12(10): 1221–36. doi: 10.1586/14787210.2014.956092 (3. marec 2021)

Mohar Lorbeg P. Fenotipska in genotipska raznolikost enterokokov iz tradicionalnih slovenskih sirov. Ljubljana : Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko 2008. Doktorska disertacija.

Montealegre MC, Roh JH, Rae M, et al. Differential penicillin-binding protein 5 (PBP5) levels in the *Enterococcus faecium* clades with different levels of ampicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 61: e02034–16. doi: 10.1128/AAC.02034–16 (3. marec 2021)

Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Microbiol Rev* 1990; 3(1): 46–65. doi: 10.1128/cmr.3.1.46 (14. jan. 2021)

Müller Premru M, Beović B, Cvitković Špik V. Mikrobiološke preiskave v diagnostiki sepse. *Zdrav vestn* 2013; 82: 445–51.

Müller Premru M, Pirš M. Antibiotiki in kemoterapevtiki ter mehanizmi odpornosti bakterij proti antibiotikom. In: Ihan A, Müller Premru M, Seme K, Matos T, eds. *Medicinska bakteriologija z mikologijo in parazitologijo*. Ljubljana : Medicinska fakulteta, 2020: 96–113.

Müller T, Ulrich A, Ott EM, Müller M. Identification of plant-associated enterococci. *J Appl Microbiol* 2001; 91 (2): 268–78. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01373.x (12. jan. 2021)

Nasaj M, Mousaavi SM, Hosseini SM, Arabestani MR. Prevalence of virulence factors and vancomycin-resistant genes among *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* isolated from clinical specimens. *Iran J Public Health* 2016; 45 (6): 806–13.

Novais C, Freitas AR, Silveira E, et al. Spread of multidrug-resistant *Enterococcus* to animals and humans: an underestimated role for the pig environment. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 2746–54. doi: 10.1093/jac/dkt289 (27. feb. 2021)

Nowakiewicz A, Ziołkowska G, Zięba P, Trościańczyk A, Banach T, Kowalski C. Modified 16S-23S rRNA intergenic region restriction endonuclease analysis for species identification of *Enterococcus* strains isolated from pigs, compared with identification using classical methods and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Med Microbiol* 2015; 64: 217–23. doi: 10.1099/jmm.0.000008 (27. feb. 2021)

Palmer KL, Kos VN, Gilmore MS. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2010; 13 (5): 632–9. doi: 10.1016/j.mib.2010.08.004 (3. feb. 2021).

Pang KW, Coorevits L, van Acker J, Pauwels W. *Enterococcus cecorum* sepsis in a patient with liver cirrhosis, successfully treated with ceftriaxone. *Acta Clin Belg* 2016; 71(5): 347–8. doi: 10.1080/17843286.2016.1147674. (2. marec 2021)

Peters J, Mac K, Wichmann-Schauer H, Klein G, Ellerbroek L. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *Int J Food Microbiol* 2003; 88 (2/3): 311–4. doi: 10.1016/s0168-1605(03)00193-4 (10. marec 2021)

Pillay S, Zishiri OT, Adeleke MA. Prevalence of virulence genes in *Enterococcus* species isolated from companion animals and livestock. *Onderstepoort J Vet Res* 2018; 85 (1): 1–8. doi: 10.4102/ojvr.v85i1.1583 (13. marec 2021)

Poeta P, Costa D, Rodrigues J, Torres C. Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 131–7. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.018 (3. marec 2021)

Pomba C, Rantala M, Greko C et al. Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72 (4): 957–68. doi: 10.1093/jac/dkw481 (5. marec 2021)

Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martinez JL, Torres C. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 967–71. doi: 10.1128/AAC.44.4.967-971.2000 (26. feb. 2021)

R Core Team. R: a language and environment for statistical computing, Vienna : R Foundation for statistical computing, 2019. <https://www.R-project.org/> (21.feb.2021)

Reis JA, Paula AT, Casarotti SN, Penna ALB. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Eng Rev* 2021; 4 (2): 124–40. doi: 0.1007/s12393-012-9051-2 (26. nov. 2020)

Ribič H, Grmek-Košnik I, Kramar Z, Rus I. Naše izkušnje s proti vankomicinom odpornim enterokokom v Splošni bolnišnici Jesenice. *Zdrav Vestn* 2007; 76: 701–7.

Rice LB, Carias L, Rudin S, et al. A potential virulence gene, *hyl<sub>Efm</sub>*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J Infect Dis* 2003; 187 (3): 508–12. doi: 10.1086/367711 (4. marec 2021)

Rozdzinski E, Marre R, Susa M, Wirth R, Muscholl-Silberhorn A. Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Microb Pathog* 2001; 30 (4): 211–20. doi: 10.1006/mpat.2000.0429 (5. jan. 2021)

Rule AM, Evans SL, Silbergeld EK. Food animal transport: a potential source of community exposures to health hazards from industrial farming (CAFOs). *J Infect Public Health* 2008; 1 (1): 33–9. doi: 10.1016/j.jiph.2008.08.001 (11. marec 2021)

Schleifer KH, Kilpper-Bälz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 1984; 34: 31–4. doi:10.1099/00207713-34-1-31 (29. okt. 2020)

Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFG, et al. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 816–22. doi: 10.1007/s100960000390 (6. marec 2021)

Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, et al. Virulence, phenotype and genotype characteristic of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20 (1): 10–9. doi: 10.1111/j.1399-302X.2004.00180.x (14. feb. 2021)

Selleck EM, Van Tyne D, Gilmore MS. Pathogenicity of enterococci. *Microbiol Spectr* 2019; 7 (4): 38 str. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018 (7. jan. 2021)

Seme K. Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. In: Gubina M, Ihan A, eds. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Ljubljana : Medicinski razgledi, 2002: 439–46.

Shankar N, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindhal G, Gilmore MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strain are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 1999; 67 (1): 193–200. doi: 10.1128/IAI.67.1.193-200.1999 (25. jan. 2021)

Shankar N, Coburn P, Pilla C, Haas W, Gilmore M. Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int J Med Microbiol* 2004; 239 (7/8): 609–18. doi: 10.1078/1438-4221-00301 (27. feb. 2020)

Shankar N, Lockatell CV, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS, Johnson DE. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* 2001; 69 (7): 4336–72. doi: 10.1128/IAI.69.7.4366-4372.2001 (25. jan. 2021)

Simjee S, White DG, McDermott PF, et al. Characterization of Tn1546 in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from canine urinary tract infections: evidence of gene exchange between human and animal enterococci. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4659–65. doi: 10.1128/jcm.40.12.4659-4665.2002 (12. marec 2021)

Sinaghal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol* 2015; 6: e791. (16 str.). doi: 10.3389/fmicb.2015.00791 (27. nov. 2020)

Soares-Santos V, Barreto AS, Semedo-Lemsaddek. Characterization of enterococci from food and food-related settings. *J Food Prot* 2015; 78 (7): 1320–6. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-419 (10. marec 2021)

Soares RO, Fedi AC, Reiter KC, Caierão J, d'Azevedo PA. Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. *Virulence* 2014; 5 (5): 634–7. doi: 10.4161/viru.28998 (5. marec 2021)

Sočan M, Frelih T, Klavs I, Grilc E, Grgič Vitek M, Učakar V. Epidemiološko spremljanje nalezljivih boleznih v Sloveniji v letu 2018 [online]. Ljubljana : Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2019: 152 str.  
[https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/epidemiolosko\\_spremljanje\\_nalezljivih\\_bolezni\\_v\\_sloveniji\\_v\\_letu\\_2018.pdf](https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/epidemiolosko_spremljanje_nalezljivih_bolezni_v_sloveniji_v_letu_2018.pdf) (6. marec 2021)

Sočan M, Kraigher A, Klavs I, et al. Epidemiološko spremljanje nalezljivih boleznih v Sloveniji v letu 2017 [online]. Ljubljana : Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2018: 158 str.  
[https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/epidemiolosko\\_spremljanje\\_nb\\_v\\_sloveniji\\_2017\\_november2018\\_1.pdf](https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/epidemiolosko_spremljanje_nb_v_sloveniji_2017_november2018_1.pdf) (6. marec 2021)

Sorsen TL, Blom M, Monnet DL, Frimodt-Moller N, Poulsen RL, Espersen F. Transient intestinal carriage after ingestion of antibiotic-resistant *Enterococcus faecium* from chicken and pork. *N Engl J Med* 2001; 345 (16): 1161–6. doi: 10.1056/NEJMoa010692 (11. marec 2021)

Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000; 40: 175–9. doi: 10.1016/s0167-7012(00)00122-6 (15. sept. 2020)

Stepanović S, Vuković D, Hola V, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007; 115: 891–9. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_630.x (15. sept. 2020)

Stępien-Pyśniak D, Hauschild T, Róžański P, Marek A. MALDI-TOF mass spectrometry as a useful tool for identification of *Enterococcus* spp. from wild birds and differentiation of closely related species. *J Microbiol Biotechnol* 2017; 27 (6): 1128–37. doi: 10.4014/jmb.1612.12036 (27. feb. 2021)

Stewart GC. *Streptococcus* and *Enterococcus*. In: McVey DS, Kennedy M, Chengappa MM, eds. *Veterinary microbiology*. 3rd ed. Ames : Wiley-Blackwell, 2013: 199–202.

Strateva T, Atanasova D, Savov E, Petrova G, Mitov I. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. *Braz J Infect Dis* 2016; 20 (2): 127–33. doi: 10.1016/j.bjid.2015.11.011 (12. marec 2021)

Štrumbelj I, Pirš M, Berce I, et al. Pregled občutljivosti za antibiotike: Slovenija 2017 [online]. Ljubljana : Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ), 2018: 40 str. [http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz/dokumenti/skoupz\\_porocilo\\_2017\\_CIP.pdf](http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz/dokumenti/skoupz_porocilo_2017_CIP.pdf) (6. marec 2021)

Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 2004; 72 (10): 6032–9. doi: 10.1128/IAI.72.10.6032 (11. marec 2021)

Tenover L, McDonald LC. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18 (4): 300–5. doi: 10.1097/01.qco.0000171923.62699.0c (2. marec 2021)

Toledo-Arana A, Valle J, Solan C, et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67 (10): 4538–45. doi: 10.1128/aem.67.10.4538-4545.2001 (5. jan. 2021)



Torres C, Alonso CA, Ruiz-Ripa L, León-Sampedro R, del Campo R, Coque T. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiol Spectr* 2018; 6 (4): 41 str. doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0032-2018\_(14. jan. 2021)

Triglav T, Pirš M, Tomažič J, et al. Izbruha proti vankomicinu odpornega *Enterococcus faecium* v letu 2012. *Med Razgl* 2013; 52 (6): 223–32.

Tsikrikonis G, Maniatis AN, Labrou M, et al. Differences in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococci isolates of humans and animal origin. *Microbiol Pathog* 2012; 52 (6): 336–43. doi: 10.1016/j.micpath.2012.03.003 (12. marec 2021)

Tyson GH, Nyirabahizi E, Crarey E et al. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail meats in the United States, 2002 to 2014. *Appl Environ Microbiol* 2017; 84: e01902–17. doi: 10.1128/AEM.01902–17 (2. marec 2021)

Tyson GH, Sabo JL, Hoffmann M, et al. Novel linezolid plasmid in *Enterococcus* from food animals in the USA. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73: 3254–8. doi: 10.1093/jac/dky369 (9. marec 2021)

Uredba komisije (ES) št. 1441/2007 z dne 5. decembra 2007 o spremembi Uredbe (ES) št. 2073/2005 o mikrobioloških merilih za živila. *Ur List EU* 2007; L322: 12–29.

Valenzuela AS, Omar NB, Abriouel, et al. Virulence factors, antibiotic resistance and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control* 2009; 20: 381–5. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.06.004 (13. marec 2021)

Valenzuela AS, Omar NB, Abriouel, et al. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food Chem Toxicol* 2008; 46 (8): 2648–52. doi: 10.1016/j.fct.2008.04.021 (13. marec 2021)

Vankerckhoven V, Autgaerden TV, Vael C, et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp* and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (10): 4473–9. doi: 10.1128/JCM.42.10.4473–4479.2004 (13. marec 2020)

Wang S, Guo Y, Ly J, et al. Characteristic of *Enterococcus faecium* clinical isolates with quinupristin/dalfopristin resistance in China. *BMC Microbiol* 2016; 16 (1): 246. doi: 10.1186/s12866-016-0863-8 (11. marec 2021)

Weese JS. Antimicrobial resistance in companion animals. *Anim Health Res Rev* 2008; 9 (2): 169–76. doi: 10.1017/S1466252308001485 (12. marec 2021)

Werner G, Coque TM, Franz CM, et al. Antibiotic resistant enterococci-tales of drug resistance gene trafficker. *Int J Med Microbiol* 2013; 303: 360–79. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.03.001 (28. febr. 2021)

Werner G, Coque TM, Hammerum AM, et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill* 2008; 13 (47): e19046. (11 str.) <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.13.47.19046-en> (7. marec 2021)

Werner G, Fleige C, Ewert V, Laverde-Gomez JA, Klare I, Witte W. High-lever ciprofloksacin resistance among hospital-adapted *Enterococcus faecium* (CC17). *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35: 119–25. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.10.012 (1. marec 2021)

WHO. Critically important antimicrobials for human medicine. 5th rev. ed., 2016 [online]. Geneva : World Health Organisation World Health Organisation, 2017a. <https://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-fifth/en/> (3. marec 2021)

WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics [online]. Geneva : World Health Organisation, 2017b. [https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf?ua=1](https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1) (10. marec 2021)

Vu J, Carvalho J. Enterococcus: review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. *Front Biol* 2011; 6 (5): 357–66. doi: 10.1007/s11515-011-1167-x (26. nov. 2020)

Zheng JX, Wu Y, Lin ZW, et al. Characteristic of and virulence factors associated with biofilm formation in clinical *Enterococcus faecalis* isolates in China. *Front Microbiol* 2017; 8: e2338 (9 str.) doi: 10.3389/fmicb.2017.02338

Zhong Z, Zhang W, Song Y, et al. Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*. *Microbiol Res* 2017; 196: 95–105. doi: 10.1016/j.micres.2016.12.009 (3. marec 2021)

11 PRILOGE

**Priloga 1:** Seznam 92 enterokokov za fenotipsko testiranje filmotvornosti.

**Supplementary data 1:** List of 92 enterococcal isolates for phenotypic testing of biofilm formation.

ID	OZNAKA	VRSTA	VRSTA	IZVOR	VZOREC	virulenčni dejavniki	igeE	hly	asa1	esp	qjA	efa	ace
							213 bp (+K F4 IM270)	276 bp (+KEK11.6)	375 bp (+K F4 IM270)	510 bp (+K F4 IM270)	688 (+K F4 IM270)	688 bp (+K EK 11.3)	1008 bp (+KEK11.3)
1	35-685	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	človek	urin		-	-	-	-	-	-	-
2	35-2151	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	človek	hemokultura		-	-	-	-	-	-	-
3	25-107	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	človek	hemokultura		-	-	-	+	-	-	-
4	25-529	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	človek	hemokultura		+	-	+	+	-	-	-
5	25-984	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	človek	hemokultura		+	-	+	+	+	+	+
6	25-120	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	človek	hemokultura		-	-	+	+	+	+	+
7	25-661	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	človek	hemokultura		+	-	+	+	+	+	+
8	35-821	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	človek	urin		+	-	+	+	+	+	+
9	5-621	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	človek	vagina		-	-	+	+	+	+	+
10	5-583	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	človek	vagina		+	-	+	+	+	+	+
11	35-1031	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	človek	urin		+	-	+	+	+	+	+
12	35-1096	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	človek	urin		+	-	+	+	+	+	+
13	35-1678	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	človek	urin		-	-	-	+	-	-	-
14	35-1666	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	človek	urin		-	-	-	+	-	-	-
15	35-1720	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	človek	urin		+	-	+	+	+	+	+
16	35-1705	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	človek	urin		+	-	+	+	+	+	+
17	35-1299	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	človek	urin		+	-	+	+	+	+	+
18	35-1361	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	človek	urin		-	-	-	+	-	-	-
19	35-1469	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	človek	urin		-	-	-	+	-	-	-
20	35-1683	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	človek	urin		+	-	+	+	+	+	+
21	35-1675	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	človek	urin		+	-	+	+	+	+	+
22	VF 13785/17	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	pes	rana		-	-	-	-	-	-	-
23	VF 10186/16	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	pes	punktat trebušne votline		-	-	-	-	-	-	-
24	M - murko 8/I	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	krava	mleko		-	-	-	-	-	-	-
25	VF 14761/20	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	maček	rana		-	-	-	-	-	-	-
26	VF 30732-17	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	pes	urin		-	-	+	+	+	+	+
27	VF 11713-18	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	pes	urin		+	-	+	+	+	+	+
28	VF 2682-17	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	pes	urin		-	-	+	+	+	+	+
29	VF 7447-19	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	pes	urin		-	-	+	+	+	+	+
30	VF 13175/19	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	pes	urin		+	-	+	+	+	+	+
31	IPSLUV PP 574-19	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	pes	organi (pljuča)		-	-	+	+	+	+	+
32	M-180/17	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	krava	mleko		+	-	+	+	+	+	+
33	B -2077/08	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	pes	urin		-	-	+	+	+	+	+
34	VF 17083/17	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	pes	urin		+	-	+	+	+	+	+
35	VF 17031/17	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	pes	rana		-	-	+	+	+	+	+
36	VF 7225/20	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	maček	urin		+	-	+	+	+	+	+
37	VF 30088/16	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	maček	punktat trebušne votline		-	-	-	+	-	-	-
38	VF 49320/19	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	pes	sluhovod		-	-	-	+	-	-	-
39	KŽK 5/IV2	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	krava	mleko		-	-	+	+	+	+	+
40	VF 15355/20	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	pes	urin		-	-	+	-	-	-	-
41	VF 21243-17	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	pes	urin		-	-	+	+	+	+	+
42	VF 9574-19	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	pes	sluhovod		+	-	+	+	+	+	+
43	B 3208/08	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	pes	urin		-	-	+	-	-	-	-
44	VF 8669/VW0	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	klavnica PI	parinik (voda pred začetkom klanja)		+	-	+	-	+	+	+
45	VF 8669/A4	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	klavnica PI	farma A - trupi po hlajenju (za prodajo)		+	-	+	-	+	+	+
46	VF 8669/A1	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	klavnica PI	farma A - zakol, skubljenje		+	-	+	-	+	+	+
47	VF 8669/površina	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	klavnica PI	površina klavnice		+	-	+	-	+	+	+
48	VF 8669/W2	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	klavnica PI	skubilnik (začetek, prvi del skubilnika)		+	-	+	-	+	+	+
49	VF 8669/W3	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	klavnica PI	skubilnik (drugi del skubilnika)		+	-	+	-	+	+	+
50	VF 29282- 5	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	klavnica PU	umazana bazenska voda		+	-	-	-	+	+	+
51	VF 29282- 6	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	klavnica PU	bris noža po evisceraciji (2x)		+	-	-	-	+	+	+
52	VF 29282- 7	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	klavnica PU	bris noža veterinarja (2x)		+	-	-	-	+	+	+
53	VF 29282- 9	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	klavnica PU	brisi trupov pred hlajenjem A (6x)		+	-	-	-	+	+	+
54	VF 29282- 10	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	klavnica PU	brisi trupov pred hlajenjem B (6x)		+	-	-	-	+	+	+
55	VF 29282- 11	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	klavnica PU	brisi trupov pred hlajenjem C (6x)		+	-	-	-	+	+	+
56	10704	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	piščanci	meso		-	-	+	-	+	+	+
57	11326	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	piščanci	meso		+	-	+	-	+	+	+
58	9037	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	piščanci	meso		+	-	+	-	+	+	+
59	8100	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	piščanci	meso		+	-	+	-	+	+	+
60	6793	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	piščanci	meso		-	-	+	-	+	+	+
61	VF-17/17025	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	prašič	meso		-	-	+	-	+	+	+
62	VF-17/16938	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	prašič	meso		-	-	+	+	+	+	+
63	VF-17/24581	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	prašič	meso		-	-	+	-	+	+	+
64	VF-17/25309	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	prašič	meso		-	-	+	-	+	+	+
65	VF-17/30349	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	prašič	meso		-	-	+	-	+	+	+
66	VF-17/35893	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	prašič	meso		-	-	+	-	+	+	+
67	VF-17/35895	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	prašič	meso		-	-	+	-	+	+	+
68	VF-17/ 6938	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	prašič	feces		+	-	-	+	-	+	+
69	VF-17/ 3213	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	prašič	meso		-	-	+	-	+	+	+
70	VF-17/ 2716	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	prašič	meso		-	-	+	-	+	+	+
71	VF-17/ 9395	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	govedo	meso		-	-	+	+	+	+	+
72	VF-17/29417	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	govedo	meso		-	-	+	+	+	+	+
73	VF-17/30419	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	govedo	meso		-	-	+	+	+	+	+
74	VF-17/ 3212	<i>Enterococcus</i>	<i>mundtii</i>	prašič	meso		+	-	+	-	+	+	+
75	VF-17/ 3211	<i>Enterococcus</i>	<i>mundtii</i>	govedo	meso		+	-	+	-	+	+	+
76	VF-17/ 3211	<i>Enterococcus</i>	<i>hirae</i>	govedo	meso		-	-	+	-	+	+	+
77	VF-17/ 2710	<i>Enterococcus</i>	<i>hirae</i>	govedo	meso		-	-	+	-	+	+	+
78	189	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	školjke	školjke		-	-	+	+	+	+	+
79	99	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	školjke	školjke		+	-	+	+	+	+	+
80	101	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	školjke	školjke		+	-	+	+	+	+	+
81	38122	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	piščanci	feces		-	-	+	-	+	+	+
82	VF-17/24446	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	prašič	feces		+	-	+	-	+	+	+
83	VF-17/21442	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	prašič	feces		-	-	+	-	+	+	+
84	VF-17/14909	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	prašič	feces		+	-	+	-	+	+	+
85	1655/15	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	krava	mleko		-	-	+	-	+	+	+
86	IM 1300	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	krava	sirnila		-	-	+	-	+	+	+
87	IM 1311	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	koza	pinjenec		-	-	+	-	+	+	+
88	1979/15 a	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	krava	mleko		-	-	+	-	+	+	+
89	1979/15 b	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	krava	mleko		-	-	+	-	+	+	+
90	TK 7/10	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	krava	sir		+	-	+	-	+	+	+
91	1980/15 b	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	krava	mleko		+	-	+	-	+	+	+
92	1980/15 a	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	krava	mleko		+	-	+	-	+	+	+





**Priloga 4:** Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst *E. cecorum* in *E. hirae* iz kliničnih vzorcev živali (n = 30).

**Supplementary data 4:** Distribution of MICs and proportion of resistant *E. cecorum* and *E. hirae* isolates from animal clinical samples (n = 30).

<i>E. cecorum</i> (n = 25)		0.016	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
ampicilin (AMP)	0					22		2	1											≤0,5 - 2
ciprofloksacin (CIP)	8			2		2	4	6	9		1	1								≤0,12 - 16
daptomicin (DAP)	0				22		1	2												≤0,25 - 1
eritromicin (ERY)	20						20									5				≤1 - >128
gentamicin (GEN)	0									25										≤8
kloramfenikol (CHL)	0								25											≤4
kvinupristin/dalfopristin (SYN)						2		15	4	4										≤0,5 - 4
linezolid (LZD)	0					6		14	5											≤0,5 - 2
teikoplanin (TEI)	0				25															≤0,5
tetraciklin (TET)	84						4					4	16	1						≤1 - 64
tigeciklin (TGC)	0	3		10	11	1														≤0,03 - 0,25
vankomicin (VAN)	0						25													≤1

<i>E. hirae</i> (n = 5)		0.016	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
ampicilin (AMP)	0					3		1	1											≤0,5 - 2
ciprofloksacin (CIP)	20					2	1		1				1							0,25 - >16
daptomicin (DAP)	0						1		3	1										0,5 - 4
eritromicin (ERY)	20						4									1				≤1 - >128
gentamicin (GEN)	0									5										≤8
kloramfenikol (CHL)	0								5											≤4
kvinupristin/dalfopristin (SYN)									1	4										2 - 4
linezolid (LZD)	0							3	2											1 - 2
teikoplanin (TEI)	0				5															≤0,5
tetraciklin (TET)	20						4							1						≤1 - 64
tigeciklin (TGC)	0			2	3															0,06 - 0,12
vankomicin (VAN)	0						5													≤1

Legenda: belo polje - območje testiranja; pokončna ojačana črta - epidemiološka mejna vrednost (ECOFF), na osnovi katere smo določili, ali je izolat odporen (R). Zadnji stolpec v tabeli (območje MIK) predstavlja razpon vrednosti MIK, ki smo jih ugotovili za enterokoke pri posameznem antibiotiku.

**Priloga 5:** Distribucija MIK in delež odpornih izolatov drugih vrst enterokokov iz kliničnih vzorcev živali (n = 5).

**Supplementary data 5:** Distribution of MICs and proportion of resistant isolates of other enterococcal species from animal clinical samples (n = 5).

drugi enterokoki (n = 5)		0.016	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048		
ampicilin (AMP)	0					1		2	2												≤0,5 - 2
ciprofloksacin (CIP)	20					1		1	2			1									0,25 - 16
daptomicin (DAP)	0			2				1	1	1											≤0,25 - 4
eritromicin (ERY)	20						3			1	1										≤1 - 8
gentamicin (GEN)	0									5											≤8
kloramfenikol (CHL)	0								4		1										≤4 - 8
kvinupristin/dalfopristin (SYN)	0								3	2											2 - 4
linezolid (LZD)	0					1		1	3												≤0,5 - 2
teikoplanin (TEI)	0					3		2													≤0,5 - 1
tetraciklin (TET)	40						3							2							≤1 - 64
tigeciklin (TGC)	0	1	2	2																	≤0,03 - 0,12
vankomicin (VAN)	40						3				2										≤1 - 8

Legenda: belo polje - območje testiranja; pokončna ojačana črta - epidemiološka mejna vrednost (ECOFF), na osnovi katere smo določili, ali je izolat odporen (R). Zadnji stolpec v tabeli (območje MIK) predstavlja razpon vrednosti MIK, ki smo jih ugotovili za enterokoke pri posameznem antibiotiku.

Drugi enterokoki: *E. canis* (n = 1), *E. canitestini* (n = 2) in *E. gallinarum* (n = 2). Izolati vrste *E. gallinarum* so primarno odporni proti vankomicinu.

**Priloga 6:** Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz piščančjega mesa (n = 78).

**Supplementary data 6:** Distribution of MICs and proportion of resistant *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from broiler meat (n = 78).

Protimikrobna zdravila <i>E. faecalis</i> (n = 59)	delež odpornosti (%)	MIK (µg/ml)																	območje MIK		
		0,02	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		2048	
ampicilin (AMP)	1,7				11		38	7	2					1						≤0,5 - >64	
ciprofloksacin (CIP)	5,1				6	5	39	6			1	2								0,25 - >16	
daptomicin (DAP)	0			1		5	16	35	2											≤0,25 - 4	
eritromicin (ERY)	49,2					18		9	3		3				26					≤1 - >128	
gentamicin (GEN)	3,4								31		26								2	≤8 - >1024	
kloramfenikol (CHL)	5,1							18		37	1		3							≤4 - 64	
linezolid (LZD)	0				3		19	37												≤0,5 - 2	
teikoplanin (TEI)	0				59															≤0,5	
tetraciklin (TET)	61					23					1	5	10	20						≤1 - 128	
tigeciklin (TGC)	0		12	27	17	3														0,06 - 0,5	
vankomicin (VAN)	0					28		29	2											≤1 - 4	
<i>E. faecium</i> (n = 19)		0,016	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048		
ampicilin (AMP)	26,3				2		4	6	2		3		1	1							≤0,5 - >64
ciprofloksacin (CIP)	10,5					4	6	2	5			1	1								0,5 - >16
daptomicin (DAP)	0			1		1	3	9	5												≤0,25 - 4
eritromicin (ERY)	52,6					1		3	5		1	2				7					≤1 - >128
gentamicin (GEN)	0								15		4										≤8 - 16
kloramfenikol (CHL)	0							7		10	1	1									≤4 - 32
kvinupristin/dalfopristin (SYN)	15,8						2	1	13		1	2									1 - 16
linezolid (LZD)	0						4	15													1 - 2
teikoplanin (TEI)	15,8				16									2	1						≤0,5 - >64
tetraciklin (TET)	26,3					14								1	4						≤1 - 128
tigeciklin (TGC)	0	1	2	16																	≤0,03 - 0,12
vankomicin (VAN)	15,8					13		2	1							3					≤1 - >128

Legenda: belo polje - območje testiranja; pokončna ojačana črta - epidemiološka mejna vrednost (ECOFF), na osnovi katere smo določili, ali je izolat odporen (R). Zadnji stolpec v tabeli (območje MIK) predstavlja razpon vrednosti MIK, ki smo jih ugotovili za enterokoke pri posameznem antibiotiku.



**Priloga 7:** Distribucija MIK in delež odpornih ostalih vrst enterokokov iz piščančjega mesa (n = 3).

**Supplementary data 7:** Distribution of MICs and proportion of resistant other enterococcal species from broiler meat (n = 3).

drugi enterokoki (n = 3)		0.016	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048					
<b>ampicilin (AMP)</b>	<b>0</b>																			1				
<b>ciprofloksacin (CIP)</b>	<b>33,3</b>																			1	0,5 - >16			
<b>daptomicin (DAP)</b>	<b>0</b>																			1	≤0,25 - 2			
<b>eritromicin (ERY)</b>	<b>0</b>																			2	1	≤1 - 4		
<b>gentamicin (GEN)</b>	<b>0</b>																					3	≤8	
<b>kloramfenikol (CHL)</b>	<b>0</b>																					3	≤4	
<b>kvinupristin/dalfopristin (SYN)</b>																				1	2	2 - 4		
<b>linezolid (LZD)</b>	<b>0</b>																					3	1	
<b>teikoplanin (TEI)</b>	<b>0</b>																					3	≤0,5	
<b>tetraciklin (TET)</b>	<b>66,7</b>																					1	1	≤1 - 32
<b>tigeciklin (TGC)</b>	<b>0</b>																					1	2	0,06 - 0,12
<b>vankomicin (VAN)</b>	<b>0</b>																					2	1	≤1 - 4

Legenda: belo polje - območje testiranja; pokončna ojačana črta - epidemiološka mejna vrednost (ECOFF), na osnovi katere smo določili, ali je izolat odporen (R). Zadnji stolpec v tabeli (območje MIK) predstavlja razpon vrednosti MIK, ki smo jih ugotovili za enterokoške pri posameznem antibiotiku.

Drugi enterokoki: *E. gallinarum* (n = 1), *E. gilvus* (n = 1) in *E. hirae* (n = 1). Izolati vrste *E. gallinarum* so primarno odporni proti vankomicinu.

**Priloga 8:** Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz piščančjega fecesa (n = 76).

**Supplementary data 8:** Distribution of MICs and proportion of resistant *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from broiler feces (n = 76).

Protimikrobna zdravila <i>E. faecalis</i> (n = 42)	delež odpornosti (%)	MIK (µg/ml)																	območje MIK	
		0,02	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		2048
<b>ampicilin (AMP)</b>	<b>2,4</b>				8		29	4						1						≤0,5 - >64
<b>ciprofloksacin (CIP)</b>	<b>7,1</b>				2	6	26	4	1		1	2								0,25 - >16
<b>daptomicin (DAP)</b>	<b>0</b>						6	13	22	1										0,5 - 4
<b>eritromicin (ERY)</b>	<b>33,3</b>						16		8	4	1				13					≤1 - >128
<b>gentamicin (GEN)</b>	<b>2,4</b>									28		13							1	≤8 - >1024
<b>kloramfenikol (CHL)</b>	<b>0</b>									21		21								≤4 - 8
<b>linezolid (LZD)</b>	<b>0</b>					1		17	24											≤0,5 - 2
<b>teikoplanin (TEI)</b>	<b>0</b>				42															≤0,5
<b>tetraciklin (TET)</b>	<b>54,8</b>						18			1		2	1	13	7					≤1 - 128
<b>tigeciklin (TGC)</b>	<b>0</b>		8	23	11															0,06 - 0,25
<b>vankomicin (VAN)</b>	<b>0</b>						22			18	2									≤1 - 4

<i>E. faecium</i> (n = 34)	delež odpornosti (%)	MIK (µg/ml)																	območje MIK	
		0,016	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		2048
<b>ampicilin (AMP)</b>	<b>29,4</b>					3		7	11	3	4	1	1	2	2					≤0,5 - >64
<b>ciprofloksacin (CIP)</b>	<b>0</b>					1	3	6	11	13										0,25 - 4
<b>daptomicin (DAP)</b>	<b>0</b>				2		1	2	20	9										≤0,25 - 4
<b>eritromicin (ERY)</b>	<b>47,1</b>						9		3	6	5	1			10					≤1 - >128
<b>gentamicin (GEN)</b>	<b>8,8</b>									25		5	1						3	≤8 - >1024
<b>kloramfenikol (CHL)</b>	<b>0</b>									28		6								≤4 - 8
<b>kvinupristin/dalfopristin (SYN)</b>	<b>5,9</b>					8		1	5	18	2									≤0,5 - 8
<b>linezolid (LZD)</b>	<b>0</b>					1		8	25											≤0,5 - 2
<b>teikoplanin (TEI)</b>	<b>11,8</b>					29			2					2	2					≤0,5 - >64
<b>tetraciklin (TET)</b>	<b>50</b>						17				1		2	3	11					≤1 - 128
<b>tigeciklin (TGC)</b>	<b>5,9</b>	2		7	21	2	2													≤0,03 - 0,5
<b>vankomicin (VAN)</b>	<b>11,8</b>						29			1						4				≤1 - >128

Legenda: belo polje - območje testiranja; pokončna ojačana črta - epidemiološka mejna vrednost (ECOFF), na osnovi katere smo določili, ali je izolat odporen (R).  
Zadnji stolpec v tabeli (območje MIK) predstavlja razpon vrednosti MIK, ki smo jih ugotovili za enterokoke pri posameznem antibiotiku.

**Priloga 9:** Distribucija MIK in delež odpornih ostalih vrst enterokokov iz piščančjega fecesa (n = 8).

**Supplementary data 9:** Distribution of MICs and proportion of resistant isolates of other enterococcal species from broiler feces (n = 8).

drugi enterokoki (n = 8)		0.016	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
ampicilin (AMP)	0				4			2	1	1										≤0,5 - 4
ciprofloksacin (CIP)	12,5				1	1		2	2	1			1							0,25 - >16
daptomicin (DAP)	0			1				5	1	1										≤0,25 - 4
eritromicin (ERY)	50						4									4				≤1 - >128
gentamicin (GEN)	0									8										≤8
kloramfenikol (CHL)	0								6		2									≤4 - 8
kvinupristin/dalfopristin (SYN)	0					1			1	4	2									≤0,5 - 8
linezolid (LZD)	0					1		4	3											≤0,5 - 2
teikoplanin (TEI)	0				8															≤0,5
tetraciklin (TET)	50						4								4					≤1 - 128
tigeciklin (TGC)	0		1	6	1															0,06 - 0,25
vankomicin (VAN)	0						6		2											≤1 - 2

Legenda: belo polje - območje testiranja; pokončna ojačana črta - epidemiološka mejna vrednost (ECOFF), na osnovi katere smo določili, ali je izolat odporen (R). Zadnji stolpec v tabeli (območje MIK) predstavlja razpon vrednosti MIK, ki smo jih ugotovili za enterokoke pri posameznem antibiotiku.

Drugi enterokoki: *E. casseliflavus* (n = 1), *E. durans* (n = 2), *E. gallinarum* (n = 1) in *E. hirae* (n = 4). Izolati vrst *E. casseliflavus* in *E. gallinarum* so primarno odporni proti vankomicinu.

**Priloga 10:** Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz perutninske klavnice (n = 21).

**Supplementary data 10:** Distribution of MICs and proportion of resistant *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from poultry slaughterhouse (n = 21).

Protimikrobna zdravila <i>E. faecalis</i> (n = 15)	delež odpornosti (%)	MIK (µg/ml)																	območje MIK		
		0,02	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		2048	
ampicilin (AMP)	0					1		9	5												≤0,5 - 2
ciprofloksacin (CIP)	33,3							10			1	4									1 - >16
daptomicin (DAP)	0							2	5	8											0,5 - 2
eritromicin (ERY)	33,3							5		2	3				1						≤1 - >128
gentamicin (GEN)	0									6		9									≤8 - 16
kloramfenikol (CHL)	0									5		10									≤4 - 8
linezolid (LZD)	0							4	11												1 - 2
teikoplanin (TEI)	0					15															≤0,5
tetraciklin (TET)	66,7							5				2	5	3							≤1 - 128
tigeciklin (TGC)	0		1	12	2																0,06 - 0,25
vankomicin (VAN)	0							8		7											≤1 - 2
<i>E. faecium</i> (n = 6)		0,016	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048		
ampicilin (AMP)	33,3							1	2	1				1	1						1 - >64
ciprofloksacin (CIP)	0			1						5											≤0,12 - 4
daptomicin (DAP)	0								5	1											2 - 4
eritromicin (ERY)	50						1		2						3						≤1 - >128
gentamicin (GEN)	0									6											≤8
kloramfenikol (CHL)	0								4		2										≤4 - 8
kvinupristin/dalfopristin (SYN)	0							1	3	2											≤0,5 - 4
linezolid (LZD)	0					1		1	4												≤0,5 - 2
teikoplanin (TEI)	33,3					4									2						≤0,5 - >64
tetraciklin (TET)	83,3						1				2	1		1	1						≤1 - 128
tigeciklin (TGC)	0		3	2	1																0,06 - 0,25
vankomicin (VAN)	33,3						4									2					≤1 - >128

Legenda: belo polje - območje testiranja; pokončna ojačana črta - epidemiološka mejna vrednost (ECOFF), na osnovi katere smo določili, ali je izolat odporen (R). Zadnji stolpec v tabeli (območje MIK) predstavlja razpon vrednosti MIK, ki smo jih ugotovili za enterokoške pri posameznem antibiotiku.

**Priloga 11:** Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrste *E. avium* iz perutninske klavnice (n = 1).

**Supplementary data 11:** Distribution of MICs and proportion of resistant *E. avium* from poultry slaughterhouse (n = 1).

<i>E. avium</i> (n = 1)		0.016	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048		
ampicilin (AMP)	0	█							1												2
ciprofloksacin (CIP)	0	█				1								█							0,5
daptomicin (DAP)	0	█					1							█							0,5
eritromicin (ERY)	0	█						1													≤1
gentamicin (GEN)	0	█								1										≤8	
kloramfenikol (CHL)	0	█									1									≤4	
kvinupristin/dalfopristin (SYN)	0	█										1								4	
linezolid (LZD)	0	█						1													1
teikoplanin (TEI)	0	█					1														≤0,5
tetraciklin (TET)	0	█							1												≤1
tigeciklin (TGC)	0	1	█																		≤0,03
vankomicin (VAN)	0	█							1												≤1

Legenda: belo polje - območje testiranja; pokončna ojačana črta - epidemiološka mejna vrednost (ECOFF), na osnovi katere smo določili, ali je izolat odporen (R). Zadnji stolpec v tabeli (območje MIK) predstavlja razpon vrednosti MIK, ki smo jih ugotovili za enterokoške pri posameznem antibiotiku.

**Priloga 12:** Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz svinjine (n = 78).

**Supplementary data 12:** Distribution of MICs and proportion of resistant *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from pork (n = 78).

Protimikrobna zdravila <i>E. faecalis</i> (n = 68)	delež odpornosti (%)	MIK (µg/ml)																	območje MIK	
		0,02	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		2048
ampicilin (AMP)	0					13		47	8											≤0,5 - 2
ciprofloksacin (CIP)	1,5					1	12	44	10		1									0,25 - 8
daptomicin (DAP)	0				2		8	35	22	1										≤0,25 - 4
eritromicin (ERY)	2,9							32		29	5				2					≤1 - >128
gentamicin (GEN)	1,5									50		17							1	≤8 - >1024
kloramfenikol (CHL)	0								44		24									≤4 - 8
linezolid (LZD)	0					4		20	44											≤0,5 - 2
teikoplanin (TEI)	0					68														≤0,5
tetraciklin (TET)	36,8						43					2	13	9	1					≤1 - 128
tigeciklin (TGC)	1,5	3		14	34	10	6													≤0,03 - >4
vankomicin (VAN)	0						45			22	1									≤1 - 4

<i>E. faecium</i> (n = 10)	delež odpornosti (%)	MIK (µg/ml)																	območje MIK	
		0,016	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		2048
ampicilin (AMP)	0					5		3	1	1										≤0,5 - 4
ciprofloksacin (CIP)	10			2		1		2	1	3	1									≤0,12 - 8
daptomicin (DAP)	0				1		2		4	3										≤1 - 4
eritromicin (ERY)	0						4		5	1										≤1 - 4
gentamicin (GEN)	0									10										≤8
kloramfenikol (CHL)	0								10											≤4
kvinupristin/dalfopristin (SYN)	0					2			2	6										≤0,5 - 4
linezolid (LZD)	0							3	7											1 - 2
teikoplanin (TEI)	0					10														≤0,5
tetraciklin (TET)	0						10													≤1
tigeciklin (TGC)	0	1		3	5	1														≤0,03 - 0,25
vankomicin (VAN)	0						8			1	1									≤1 - 4

Legenda: belo polje - območje testiranja; pokončna ojačana črta - epidemiološka mejna vrednost (ECOFF), na osnovi katere smo določili, ali je izolat odporen (R). Zadnji stolpec v tabeli (območje MIK) predstavlja razpon vrednosti MIK, ki smo jih ugotovili za enterokoške pri posameznem antibiotiku.

**Priloga 13:** Distribucija MIK in delež odpornih ostalih vrst enterokokov iz svinjine (n = 7).

**Supplementary data 13:** Distribution of MICs and proportion of resistant isolates of other enterococcal species from pork (n = 7).

drugi enterokoki (n = 7)		0.016	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
ampicilin (AMP)	0					4		3												≤0,5 - 1
ciprofloksacin (CIP)	0					2	4	1												0,25 - 1
daptomicin (DAP)	0			1		1	4	1												≤0,25 - 2
eritromicin (ERY)	0						3		3	1										≤1 - 4
gentamicin (GEN)	0									7										≤8
kloramfenikol (CHL)	0								5		3									≤4 - 8
kvinupristin/dalfopristin (SYN)	0								1	5		1								2 - 16
linezolid (LZD)	0							2	5											1 - 2
teikoplanin (TEI)	0					7														≤0,5
tetraciklin (TET)	42,9						4					1			2					≤1 - 128
tigeciklin (TGC)	14,3	1		3	1	1	1													≤0,03 - 0,5
vankomicin (VAN)	0						5		1	1										≤1 - 4

Legenda: belo polje - območje testiranja; pokončna ojačana črta - epidemiološka mejna vrednost (ECOFF), na osnovi katere smo določili, ali je izolat odporen (R). Zadnji stolpec v tabeli (območje MIK) predstavlja razpon vrednosti MIK, ki smo jih ugotovili za enterokoke pri posameznem antibiotiku.

Drugi enterokoki: *E. casseliflavus* (n = 2), *E. durans* (n = 2), *E. gilvus* (n = 1), *E. hirae* (n = 1) in *E. mundtii* (n = 1). Izolati vrste *E. casseliflavus* so primarno odporni proti vankomicinu.

**Priloga 14:** Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz prašičjega fecesa (n = 57).

**Supplementary data 14:** Distribution of MICs and proportion of resistant *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from pig feces (n = 57).

Protimikrobna zdravila <i>E. faecalis</i> (n = 38)	delež odpornosti (%)	MIK (µg/ml)																	območje MIK			
		0,02	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		2048		
ampicilin (AMP)	0					10		20	8												≤0,5 - 2	
ciprofloksacin (CIP)	0					1	2	29	4	2											0,25 - 4	
daptomicin (DAP)	0				1		1	13	20	3											≤0,25 - 4	
eritromicin (ERY)	15,8							18	9	5		1			5						≤1 - >128	
gentamicin (GEN)	0									18											≤8 - 16	
kloramfenikol (CHL)	2,6								20		17			1							≤4 - 128	
linezolid (LZD)	0							13	25												1 - 2	
teikoplanin (TEI)	0					38															≤0,5	
tetraciklin (TET)	47,4							20					6	12							≤1 - 128	
tigeciklin (TGC)	0			6	19	10	3														0,06 - 0,5	
vankomicin (VAN)	0							23		15											≤1 - 2	
<i>E. faecium</i> (n = 19)			0,016	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048		
ampicilin (AMP)	5,3					4		8	6			1										≤0,5 - 8
ciprofloksacin (CIP)	10,5							7	4	1	5	2										0,5 - 8
daptomicin (DAP)	0				1			1	2	6	9											≤0,25 - 4
eritromicin (ERY)	10,5							4		6	7	1				1						≤1 - >128
gentamicin (GEN)	5,3										17		1		1							≤8 - 64
kloramfenikol (CHL)	5,3									16		2			1							≤4 - 64
kvinupristin/dalfopristin (SYN)	5,3					6			2	3	7	1										≤0,5 - 8
linezolid (LZD)	0								2	16												1 - 4
teikoplanin (TEI)	0					19																≤0,5
tetraciklin (TET)	15,8							16							1	2						≤1 - 128
tigeciklin (TGC)	5,3	3		4	11		1															≤0,03 - 0,5
vankomicin (VAN)	0							16		3												≤1 - 2

Legenda: belo polje - območje testiranja; pokončna ojačana črta - epidemiološka mejna vrednost (ECOFF), na osnovi katere smo določili, ali je izolat odporen (R).  
Zadnji stolpec v tabeli (območje MIK) predstavlja razpon vrednosti MIK, ki smo jih ugotovili za enterokoške pri posameznem antibiotiku.



**Priloga 15:** Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrste *E. hirae* ter ostalih vrst enterokokov iz prašičjega fecesa (n = 37).

**Supplementary data 15:** Distribution of MICs and proportion of resistant *E. hirae* and other enterococcal species from pig feces (n = 37).

<i>E. hirae</i> (n = 28)		0.016	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
ampicilin (AMP)	0					19		7	2											≤0,5 - 2
ciprofloksacin (CIP)	0			1		13	14													≤0,12 - 0,5
daptomicin (DAP)	0							6	16	6										1 - 4
eritromicin (ERY)	0						28													≤1
gentamicin (GEN)	0									22		6								≤8 - 16
kloramfenikol (CHL)	0								28											≤4
kvinupristin/dalfopristin (SYN)								6	16	6										1 - 4
linezolid (LZD)	0							7	21											1 - 2
teikoplanin (TEI)	0					28														≤0,5
tetraciklin (TET)	28,6						20							3	4	1				≤1 - 128
tigeciklin (TGC)	0	8		6	12	2														≤0,03 - 0,25
vankomicin (VAN)	0						28													≤1

drugi enterokoki (n = 9)		0.016	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
ampicilin (AMP)	11,1					3		5					1							≤0,5 - 32
ciprofloksacin (CIP)	0					2	3	4												0,25 - 1
daptomicin (DAP)	0						2	2	3	2										0,5 - 4
eritromicin (ERY)	22,2						6		1							2				≤1 - >128
gentamicin (GEN)	0									9										≤8
kloramfenikol (CHL)	0								9											≤4
kvinupristin/dalfopristin (SYN)									3	6										2 - 4
linezolid (LZD)	0							6	3											1 - 2
teikoplanin (TEI)	0					9														≤0,5
tetraciklin (TET)	22,2						7						1		1					≤1 - 128
tigeciklin (TGC)	0	1		5	2	1														≤0,03 - 0,25
vankomicin (VAN)	33,3						6				3									≤1 - 8

Legenda: belo polje - območje testiranja; pokončna ojačana črta - epidemiološka mejna vrednost (ECOFF), na osnovi katere smo določili, ali je izolat odporen (R).

Zadnji stolpec v tabeli (območje MIK) predstavlja razpon vrednosti MIK, ki smo jih ugotovili za enterokoke pri posameznem antibiotiku.

Drugi enterokoki: *E. avium* (n = 1), *E. durans* (n = 4), *E. gallinarum* (n = 3) in *E. mundtii* (n = 1). Izolati vrste *E. gallinarum* so primarno odporni proti vankomicinu.

**Priloga 16:** Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz prašičje farme in klavnice (n = 15).

**Supplementary data 16:** Distribution of MICs and proportion of resistant *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from pig farm and slaughterhouse (n = 15).

Protimikrobna zdravila	delež odpornosti (%)	MIK (µg/ml)																	območje MIK
		0,02	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	
<b><i>E. faecalis</i> (n = 8)</b>																			
ampicilin (AMP)	0							7	1										
ciprofloksacin (CIP)	0					3	3	2											
daptomicin (DAP)	0						1	1	5	1									
eritromicin (ERY)	0						3		1	4									
gentamicin (GEN)	0									5									
kloramfenikol (CHL)	0									4		4							
linezolid (LZD)	0					1				7									
teikoplanin (TEI)	0					8													
tetraciklin (TET)	0						8												
tigeciklin (TGC)	0			2	4	2													
vankomicin (VAN)	0						6			2									
<b><i>E. faecium</i> (n = 7)</b>																			
ampicilin (AMP)	85,7								1		6								
ciprofloksacin (CIP)	14,3							3	3	1									
daptomicin (DAP)	0						4		1	2									
eritromicin (ERY)	71,4									2						5			
gentamicin (GEN)	0									6		1							
kloramfenikol (CHL)	0									7									
quinupristin/dalfopristin (SYN)	57,1									3	4								
linezolid (LZD)	0							5	2										
teikoplanin (TEI)	0					7													
tetraciklin (TET)	100												6	1					
tigeciklin (TGC)	0			4	3														
vankomicin (VAN)	0						6			1									

Legenda: belo polje - območje testiranja; pokončna ojačana črta - epidemiološka mejna vrednost (ECOFF), na osnovi katere smo določili, ali je izolat odporen (R).  
Zadnji stolpec v tabeli (območje MIK) predstavlja razpon vrednosti MIK, ki smo jih ugotovili za enterokoke pri posameznem antibiotiku.

**Priloga 17:** Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrste *E. hirae* iz prašičje farme in klavnice (n = 12).

**Supplementary data 17:** Distribution of MICs and proportion of resistant *E. hirae* isolates from pig farm and slaughterhouse (n = 12).

<i>E. hirae</i> (n = 12)		0.016	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
<b>ampicilin (AMP)</b>	<b>0</b>				4			1	5	2										≤0,5 - 4
<b>ciprofloksacin (CIP)</b>	<b>0</b>		1		8	3														≤0,12 - 0,5
<b>daptomicin (DAP)</b>	<b>16,7</b>								7	3	2									≤0,25 - 8
<b>eritromicin (ERY)</b>	<b>25</b>						8		1							3				≤1 - >128
<b>gentamicin (GEN)</b>	<b>0</b>									12										≤8
<b>kloramfenikol (CHL)</b>	<b>0</b>								12											≤4
<b>quinupristin/dalfopristin (SYN)</b>					2					9	1									≤0,5 - 8
<b>linezolid (LZD)</b>	<b>0</b>							2	10											1 - 2
<b>teikoplanin (TEI)</b>	<b>0</b>				12															≤0,5
<b>tetraciklin (TET)</b>	<b>83,3</b>						2					1	1	4	4					≤1 - 128
<b>tigeciklin (TGC)</b>	<b>0</b>		4	7	1															0,06 - 0,25
<b>vankomicin (VAN)</b>	<b>0</b>						12													≤1

Legenda: belo polje - območje testiranja; pokončna ojačana črta - epidemiološka mejna vrednost (ECOFF), na osnovi katere smo določili, ali je izolat odporen (R). Zadnji stolpec v tabeli (območje MIK) predstavlja razpon vrednosti MIK, ki smo jih ugotovili za enterokoške pri posameznem antibiotiku.

**Priloga 18:** Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz govedine (n = 75).

**Supplementary data 18:** Distribution of MICs and proportion of resistant *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from beef (n = 75).

Protimikrobna zdravila	delež odpornosti (%)	MIK (µg/ml)																	območje MIK		
		0,02	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		2048	
<b><i>E. faecalis</i> (n = 64)</b>																					
ampicilin (AMP)	0					18		38	14	1											≤0,5 - 4
ciprofloksacin (CIP)	0			1		13	40	10													≤0,12 - 2
daptomicin (DAP)	0				3		10	29	21	1											≤0,25 - 4
eritromicin (ERY)	3,1						21		31	10		1			1						≤1 - >128
gentamicin (GEN)	1,6									41		19	3						1		≤8 - >1024
kloramfenikol (CHL)	0								35		29										≤4 - 8
linezolid (LZD)	1,6					2		11	50			1									≤0,5 - 32
teikoplanin (TEI)	0					64															≤0,5
tetraciklin (TET)	25						47		1					11	5						≤1 - 128
tigeciklin (TGC)	0	6		13	26	12	7														≤0,03 - 0,5
vankomicin (VAN)	0						43		21												≤1 - 2
<b><i>E. faecium</i> (n = 11)</b>																					
ampicilin (AMP)	0					3		6	2												≤0,5 - 2
ciprofloksacin (CIP)	0							3	5	3											1 - 4
daptomicin (DAP)	0							2	4	5											1 - 4
eritromicin (ERY)	9,1						1		7	2					1						≤1 - >128
gentamicin (GEN)	0									10		1									≤8 - 16
kloramfenikol (CHL)	0								5		5	1									≤4 - 32
kvinupristin/dalfopristin (SYN)	9,1				4			4		2	1										≤0,5 - 8
linezolid (LZD)	0							2	9												1 - 2
teikoplanin (TEI)	0					11															≤0,5
tetraciklin (TET)	9,1						10								1						≤1 - >128
tigeciklin (TGC)	0	3		2	3																≤0,03 - 0,12
vankomicin (VAN)	0						11														≤1

Legenda: belo polje - območje testiranja; pokončna ojačana črta - epidemiološka mejna vrednost (ECOFF), na osnovi katere smo določili, ali je izolat odporen (R). Zadnji stolpec v tabeli (območje MIK) predstavlja razpon vrednosti MIK, ki smo jih ugotovili za enterokoške pri posameznem antibiotiku.

**Priloga 19:** Distribucija MIK in delež odpornih ostalih vrst enterokokov iz govedine (n = 11).

**Supplementary data 19:** Distribution of MICs and proportion of resistant isolates of other enterococcal species from beef (n = 11).

drugi enterokoki (n = 11)		0.016	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048		
ampicilin (AMP)	0					4		6	1												≤0,5 - 2
ciprofloksacin (CIP)	0					2	5	4													0,25 - 1
daptomicin (DAP)	0				1		3	5	2												≤0,25 - 2
eritromicin (ERY)	0						9		2												≤1 - 2
gentamicin (GEN)	0									10		1									≤4 - 16
kloramfenikol (CHL)	0								9		2										≤4 - 8
kvinupristin/dalfopristin (SYN)	0								4	5		2									2 - 16
linezolid (LZD)	0							4	7												1 - 2
teikoplanin (TEI)	0					11															≤0,5
tetraciklin (TET)	0						11														≤1
tigeciklin (TGC)	9,1	3		5	2		1														≤0,03 - 0,5
vankomicin (VAN)	0						9		1	1											≤1 - 4

Legenda: belo polje - območje testiranja; pokončna ojačana črta - epidemiološka mejna vrednost (ECOFF), na osnovi katere smo določili, ali je izolat odporen (R). Zadnji stolpec v tabeli (območje MIK) predstavlja razpon vrednosti MIK, ki smo jih ugotovili za enterokoške pri posameznem antibiotiku.

Drugi enterokoki: *E. casseliflavus* (n = 2), *E. devriesei* (n = 1), *E. durans* (n = 1), *E. hirae* (n = 6) in *E. mundtii* (n = 1). Izolati vrste *E. casseliflavus* so primarno odporni proti vankomicinu.



**Priloga 21:** Distribucija MIK in delež odpornih ostalih vrst enterokokov iz mleka in mlečnih izdelkov ( $n = 21$ ).

**Supplementary data 21:** Distribution of MICs and proportion of resistant isolates of other enterococcal species from milk and dairy products ( $n = 21$ ).

drugi enterokoki ( $n = 21$ )		0.016	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048			
<b>ampicilin (AMP)</b>	<b>9,5</b>					9		6	4			2									≤0,5 - 16	
<b>ciprofloksacin (CIP)</b>	<b>0</b>					8	5	6	2													0,25 - 2
<b>daptomicin (DAP)</b>	<b>0</b>				10		7	3	1													≤0,25 - 2
<b>eritromicin (ERY)</b>	<b>0</b>						12		6	3												≤1 - 4
<b>gentamicin (GEN)</b>	<b>0</b>									21												≤8
<b>kloramfenikol (CHL)</b>	<b>0</b>								17		4											≤4 - 8
<b>kvinupristin/dalfopristin (SYN)</b>						12		1	1	7												≤0,5 - 4
<b>linezolid (LZD)</b>	<b>0</b>					1		11	9													≤0,5 - 2
<b>teikoplanin (TEI)</b>	<b>0</b>					19		2														≤0,5 - 1
<b>tetraciklin (TET)</b>	<b>9,5</b>							19														≤1 - 64
<b>tigeciklin (TGC)</b>	<b>0</b>	2		4	15								1	1								≤0,03 - 0,12
<b>vankomicin (VAN)</b>	<b>0</b>						15		4	2												≤1 - 4

Legenda: belo polje - območje testiranja; pokončna ojačana črta - epidemiološka mejna vrednost (ECOFF), na osnovi katere smo določili, ali je izolat odporen (R). Zadnji stolpec v tabeli (območje MIK) predstavlja razpon vrednosti MIK, ki smo jih ugotovili za enterokoške pri posameznem antibiotiku.

Drugi enterokoki: *E. casseliflavus* ( $n = 6$ ), *E. durans* ( $n = 7$ ), *E. gilvus* ( $n = 2$ ), *E. italicus* ( $n = 3$ ) in *E. malodoratus* ( $n = 3$ ). Izolati vrste *E. casseliflavus* so primarno odporni proti vankomicinu.

**Priloga 22:** Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrst *E. faecalis* in *E. faecium* iz školjk klapavic (n = 64).

**Supplementary data 22:** Distribution of MICs and proportion of resistant *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from mussels (n = 64).

Protimikrobna zdravila <i>E. faecalis</i> (n = 28)	delež odpornosti (%)	MIK (µg/ml)																	območje MIK		
		0,02	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		2048	
ampicilin (AMP)	0					1		9	18												≤0,5 - 2
ciprofloksacin (CIP)	3,6						2	23	2		1										0,5 - 8
daptomicin (DAP)	0							17	8	3											1 - 4
eritromicin (ERY)	21,4							20	2						6						≤1 - >128
gentamicin (GEN)	17,9									17		6							5		≤8 - >1024
kloramfenikol (CHL)	17,9								3		20		5								≤4 - 64
linezolid (LZD)	0									28											2
teikoplanin (TEI)	0					28															≤0,5
tetraciklin (TET)	35,7						18						6	4							≤1 - 128
tigeciklin (TGC)	0			13	12	3															0,12 - 0,5
vankomicin (VAN)	0						19			5	4										≤1 - 4
<i>E. faecium</i> (n = 36)		0,016	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048		
ampicilin (AMP)	2,8					7		14	13	1	1										≤0,5 - 8
ciprofloksacin (CIP)	11,1					1	3	15	5	8	4										0,25 - 8
daptomicin (DAP)	0						1		11	19	5										0,5 - 8
eritromicin (ERY)	5,6						12		13	9	2										≤1 - 8
gentamicin (GEN)	0									29		6	1								≤8 - 32
kloramfenikol (CHL)	0								20		15		1								≤4 - 32
kvinupristin/dalfopristin (SYN)	0					3		7	2	24											≤0,5 - 4
linezolid (LZD)	0									33	3										2 - 4
teikoplanin (TEI)	0					36															≤0,5
tetraciklin (TET)	16,7						30						1	1	3	1					≤1 - 128
tigeciklin (TGC)	0			17	13	6															0,06 - 0,25
vankomicin (VAN)	0						32			1	3										≤1 - 4

Legenda: belo polje - območje testiranja; pokončna ojačana črta - epidemiološka mejna vrednost (ECOFF), na osnovi katere smo določili, ali je izolat odporen (R).  
Zadnji stolpec v tabeli (območje MIK) predstavlja razpon vrednosti MIK, ki smo jih ugotovili za enterokoke pri posameznem antibiotiku.



**Priloga 23:** Distribucija MIK in delež odpornih izolatov vrste *E. hirae* ter ostalih vrst enterokokov iz školjk klapavic (n = 18).

**Supplementary data 23:** Distribution of MICs and proportion of resistant *E. hirae* and other enterococcal species from mussels (n = 18).

drugi enterokoki (n = 18)		0.016	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
<b>ampicilin (AMP)</b>	<b>0</b>				10		6	2												≤0,5 - 2
<b>ciprofloksacin (CIP)</b>	<b>0</b>				6	8	4													0,25 - 1
<b>daptomicin (DAP)</b>	<b>16,7</b>			1			6	4	4		3									≤0,25 - 8
<b>eritromicin (ERY)</b>	<b>0</b>					15		3												≤1 - 2
<b>gentamicin (GEN)</b>	<b>0</b>								10			6	2							≤8 - 32
<b>kloramfenikol (CHL)</b>	<b>0</b>							17			1									≤4 - 8
<b>kvinupristin/dalfopristin (SYN)</b>							1	4	13											1 - 4
<b>linezolid (LZD)</b>	<b>0</b>						3	15												1 - 2
<b>teikoplanin (TEI)</b>	<b>0</b>				18															≤0,5
<b>tetraciklin (TET)</b>	<b>16,7</b>					15								2	1					≤1 - 128
<b>tigeciklin (TGC)</b>	<b>0</b>	4	7	6	1															≤0,03 - 0,25
<b>vankomicin (VAN)</b>	<b>0</b>					15			3											≤1 - 4

Legenda: belo polje - območje testiranja; pokončna ojačana črta - epidemiološka mejna vrednost (ECOFF), na osnovi katere smo določili, ali je izolat odporen (R).

Zadnji stolpec v tabeli (območje MIK) predstavlja razpon vrednosti MIK, ki smo jih ugotovili za enterokoške pri posameznem antibiotiku.

Drugi enterokoki: *E. casseliflavus* (n = 3), *E. hirae* (n = 14) in *E. thailandicus* (n = 1). Izolati vrste *E. casseliflavus* so primarno odporni proti vankomicinu.

