

# Wykorzystanie metody PCR-RFLP do wykrywania i różnicowania shigatoksycznych szczepów *Escherichia coli* na podstawie analizy genów *slt*

PAWEŁ NAWROTEK

Katedra Immunologii i Mikrobiologii Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt AR, ul. Doktora Judyma 24, 71-466 Szczecin

Nawrotek P.

**Applying the PCR-RFLP method for detection and isolation of shigatoxic *Escherichia coli* through the analysis of *slt* genes**

Summary

From the clinical and epidemiological standpoint, shigatoxic strains of *Escherichia coli* (STEC; EHEC; VTEC) constitute a group of intestinal bacteria pathogenic to both humans and animals. Due to their biological characteristics, increasing threats of epidemic outbreak, as well as heavy diagnostic problems in relation to these bacterial pathogens, their identification and isolation have been carried out with PCR-RFLP. The method was directed at the identification and analysis of *slt* genes (*stx*; *vtx*), the basic markers of their virulence, which determine the synthesis of dangerous verocytotoxins (SLT; Stx; VT). The aim of this study was to create a diagnostic system primarily based on PCR-RFLP which would allow a quick and sensitive identification of pathogenic strains of STEC *slt* (+) in a range of material (clinical and pathological samples collected from human or animal bodies, or from animal-source food), as well as *slt* gene classification. This enabled the diagnosis of *E. coli* rods towards their verocytotoxicity. Effectiveness and usefulness of the proposed research procedure was confirmed in both laboratory and clinical field studies. Basing on the obtained results it has been demonstrated that this group of micropathogens is present in the environment of West Pomerania in Poland, thus the possibility exists that the farm animals (mostly cattle) of the local herds may be carriers of STEC *slt* (+) strains.

**Keywords:** STEC, *slt* genes, detection, diagnostic methods, PCR-RFLP

Shigatoksyczne szczepy *Escherichia coli* (STEC), określane też jako enterokrwotoczne (EHEC) lub verocytotoksyczne *E. coli* (VTEC), stanowią bardzo istotną, z klinicznego i epidemiologicznego punktu widzenia, grupę chorobotwórczych pałeczek jelitowych ludzi i zwierząt (4, 9, 13). Od 1982 r. wiąże się je z wywoływaniem bardzo groźnych syndromów chorobowych człowieka. Najczęściej występującym szczepem wśród enterokrwotocznych pałeczek *E. coli* jest serotyp O157 : H7 (4, 15). U zwierząt drobnoustroje STEC (VTEC), głównie reprezentujące serogrupy O138, O139 i O141, stanowią czynnik etiologiczny choroby obrzękowej świń; inne serotypy są odpowiedzialne za sporadyczne przypadki choroby biegunkowej cieląt (3, 13, 14). Głównymi źródłami zakażenia człowieka są zanieczyszczone surowce albo poddane niewystarczającej obróbce termicznej produkty spożywcze pochodzenia zwierzęcego, głównie: mielone mięso, mleko i produkty mleczne (5, 10). Rezerwuarem natomiast są zwierzęta, w tym przede wszystkim bydło domowe, zwłaszcza osobniki ras mięsnych (2, 12, 22).

Wspólną cechą tych drobnoustrojów jest wytwarzanie cytotoksyn odpowiedzialnych za z reguły ciężki przebieg zakażenia pałeczkami EHEC (toksemia), które określono jako verocytotoksyny (verotoksyny – VT), toksyny shiga-podobne (SLT), albo też toksyny shiga *E. coli* (Stx). Toksyny SLT strukturalnie tworzą typowe holotoksyny (AB<sub>5</sub>) i występują w różnych odmianach, wśród których

zasadnicze, to: SLTI, SLTII i SLTIIe (11). Wymienione odmiany charakteryzują się podobnym patomechanizmem działania, a w przypadku innych wariantów SLT (dominujących zwłaszcza w obrębie toksyn SLTII) znaczącą homologią na poziomie nukleotydowym (4, 11, 13). Z uwagi na ten fakt, wykrywanie charakterystycznych polimorfizmów DNA w obrębie kodujących ją genów *slt*, umożliwić może bardziej dokładną analizę poszczególnych wariantów SLT, a dodatkowo także śledzenie procesów związanych ze zmiennością genetyczną verotoksycznych szczepów *E. coli*, w tym właśnie zakresie (16). Zmienność ta związana jest z obecnością różnych genów *slt*, z których *slt-I* i *slt-II* są genami fagowymi determinującymi wytwarzanie różnych odmian toksyn SLTI i SLTII, natomiast *slt-IIe* jako geny chromosomalne zwierzęcych szczepów VTEC – kodują toksynę SLTIIe (8, 20, 21). Wnikliwa analiza wymienionych czynników zjadliwości wydaje się wskazana chociażby z uwagi na konieczność opracowania adekwatnej diagnostyki SLT pozytywnych szczepów bakteryjnych (17, 18). Dobrym rozwiązaniem wydaje się zastosowanie do tego celu metody PCR-RFLP umożliwiającej analizę specyficznych polimorfizmów długości fragmentów restrykcyjnych uzyskiwanych produktów PCR.

Celem przeprowadzonych badań było przygotowanie systemu diagnostycznego opartego na metodzie PCR-RFLP, umożliwiającego wysoce specyficzną i szybką identyfikację patogennych szczepów STEC *slt* (+) w róż-

norodnym materiale, a także typowanie genów *slt*, pozwalające na diagnozowanie wymienionych pałeczek *E. coli* w zakresie ich verotoksyczności.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na próbkach kału pochodzącego od ludzi, głównie dzieci (poniżej 10 r. ż.) z objawami krwawej biegunki, szczególnie o przebiegu bezgorączkowym oraz kału i wymazów kałowych pobranych od chorych i zdrowych zwierząt. Badano także materiał pobierany sekcyjnie od padłych zwierząt – wycinki narządów wewnętrznych (jelita cienkiego, jelita grubego, żołądka, węzłów chłonnych krezkowych, wątroby, śledziony, nerek, mięśnia sercowego i płuc), a także żywność pochodzenia zwierzęcego (mięso, mleko oraz wędliny, głównie surowe typu metka tatarska). Ogółem przebadano 525 próbek.

Materiał badań stanowiło ponadto, 60 szczepów pałeczek *E. coli*, w tym 2 sorbiotolo-ujemne serotypy: A-1 O157 : H7 i O157 : H7 (345/96) pochodzące z kolekcji Państwowego Zakładu Higieny (PZH) w Warszawie, 5 serotypów: A2/O157 : H19 (1495), E68II/O141 : K85 (725), G1253/O147 (1372), G205/O8 : K87, K88ac (1565) i sorbitolo-ujemny szczep *E. coli* O157 : H7 (1644) z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego (PIW) w Puławach, 3 serotypy: A2/O157 : H-, Abbotstown/O149 : K91, K88ac i E68I/O141 : K85, K88ab z Centralnego Laboratorium Weterynaryjnego Weybridge (CVL – Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey KT15 3 NB, U.K.) oraz 2 serotypy: E68I/O141 : K85, K88ab/97 i G1253/O147 : K89, K88ac/96 z Katedry Immunologii i Mikrobiologii (KIM) AR w Szczecinie. Część szczepów *E. coli* o nie ustalonym typie serologicznym uzyskano też z Wojewódzkiego Zespołu Szpitala Klinicznego (WZSK) i Terenowej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej (TSSE) w Szczecinie. Pozostałe szczepy *E. coli* wyosobniono w latach 1996-2000 w Katedrze Immunologii i Mikrobiologii, a źródło ich izolacji stanowił głównie materiał patologiczny pobierany sekcyjnie (wycinki narządów wewnętrznych różnych gatunków zwierząt) oraz materiał kliniczny (próbki kału pochodzące z przypadków biegunki ludzi i zwierząt), jak również produkty spożywcze pochodzenia zwierzęcego. Ogółem przebadano 60 szczepów *E. coli*.

Pięć wzorcowych szczepów *E. coli slt* (+): E68I/O141 : K85, K88ab – CVL, E68II/O141 : K85 (725) – PIW, A-1 O157 : H7 – PZH, O157 : H7 (345/96) – PZH i O157 : H7 (1644) – PIW, wykorzystano jako wzorce diagnostyczne (próbki dodatnie w zakresie genów *slt-I*, *slt-II* i *slt-IIe*) dla zaproponowanego schematu badawczego.

Badania prowadzone były przy użyciu metod PCR i RFLP połączonych z tradycyjną analizą mikrobiologiczną, zgodnie z przygotowanym schematem badawczym, który realizowano w układzie z wstępnym namnażaniem bakterii obecnych w badanym materiale (6 h/37°C), prowadzonym w selektywnym (dla szczepów EHEC) bulionie mTSB z nowobiocyną (Merck).

Reprezentatywne próbki materiału (w przypadku surowców i produktów spożywczych – mięso i wędliny oraz mleko, pobierane zgodnie z PN-83/A-82054 i PN-93/A-86034/03), rozcieńczano i poddawano wstępnemu namnażaniu przez 6 h/37°C w selektywnym bulionie mTSB z nowobiocyną, w proporcjach zgodnych z wymienionymi normami, tzn. 10 g (10 ml)/90 ml bulionu lub w przypadku innych

próbek (wycinki narządów wew., kał, wymazy kałowe) ok. 1 g/9 ml bulionu. Po 6 h inkubacji, z uzyskanego końcowego rozcieńczenia w stosunku 1 : 10, pobierano 1 ml w celu izolacji DNA obecnych w materiale drobnoustrojów, a następnie przeprowadzenia reakcji PCR i analizy produktów amplifikacji. Pojedyncze (1-5 j.t.k.) kolonie bakteryjne w czystej hodowli pobierano z podłoża stałego, zawieszano w 10 ml bulionu i inkubowano (6 h/37°C), a następnie pobierano 1 ml hodowli bakteryjnej do procesu izolacji i oczyszczania DNA.

Izolacja i oczyszczanie bakteryjnego DNA. DNA izolowano w oparciu o protokół izolacji i oczyszczania chromosomalnego DNA bakterii Gram-ujemnych oraz komponenty, firmy EPICENTRE Technologies.

W celu identyfikacji bakteryjnego DNA w wyizolowanym materiale, przeprowadzano reakcję PCR ze starterami (primerami) flankującymi regiony genomu shigatoksycznych szczepów *Escherichia coli*, zdefiniowane jako *slt-IA*, *slt-IIA* i *slt-IIeA*, determinujące syntezę podjednostki A verotoksyn typu 1 i 2 oraz „zwierzęcego” wariantu toksyny typu 2. Reakcję PCR przygotowano w oparciu o dane Hilla (6), natomiast startery wyselekcjonowano na podstawie badań Karcha i wsp. (7) oraz Briana i wsp. (1). Sekwencje nukleotydowe starterów zastosowanych w reakcji PCR oraz przewidywaną wielkość produktów amplifikacji, podano w tab. 1.

Amplifikację bakteryjnego DNA wykonano zgodnie z wcześniej wystandardyzowanymi warunkami reakcji PCR. Reakcję przeprowadzono w końcowej objętości 20 µl, w mieszaninie reakcyjnej zawierającej następujące składniki: wodę dejonizowaną – 11,45 µl, 10-krotnie x stężony bufor do Taq polimerazy – 2 µl, 25 mM MgCl<sub>2</sub> do stężenia końcowego 2 mM – 1,6 µl, 2,5 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) do stężenia końcowego 0,2 mM każdego z deoksynukleotydów (dNTP) – 1,6 µl, parę starterów A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub> – specyficznych dla *slt-IA* w stężeniu 0,02 nM (na starter) – po 1 µl (na każdy starter) lub parę starterów B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> – specyficznych dla *slt-IIA* i dodatkowo dla *slt-IIeA* w stężeniu 0,02 nM (na starter), albo parę starterów C<sub>1</sub> i C<sub>2</sub> – specyficznych zarówno dla *slt-IIA* i *slt-IIeA*, jak i *slt-IA* (złożona PCR) w stężeniu 0,02 nM (na starter) oraz Taq polimerazę – 0,35 µl (1,75 U). Wszystkie składniki reakcji PCR przygotowane zostały w oparciu o komponenty firmy EPICENTRE Technologies oraz Integrated DNA Technologies, Inc. Do każdej mieszaniny reakcyjnej (19 µl), dodawano 1 µl roztworu,

Tab. 1. Pary starterów (primerów) użytych do amplifikacji genów *slt-IA*, *slt-IIA* i *slt-IIeA*, zlokalizowanych w chromosomalnym DNA szczepów STEC (wg 1, 7)

Startery	Region amplifikowany	Sekwencja 5' → 3'	Długość produktu
A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	<i>slt-IA</i>	5' AAATCGCCATTCTGGTACTACTTCT 3' 5' TGCCATTCTGGCAACTCGCGATGCA 3'	370 pz
B <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	<i>slt-IIA</i> , <i>slt-IIeA</i>	5' CAGTCGTCACCTACTGGTTTCATCA 3' 5' GGATATTCTCCCACTCTGACACC 3'	283 pz
C <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	<i>slt-IA</i>  <i>slt-IIA</i> , <i>slt-IIeA</i>	5' TTTACGATAGACTTTTCGAC 3' 5' CACATATAAATTATTCGCTC 3' 5' TTTACGATAGACTTTTCGAC 3' 5' CACATATAAATTATTCGCTC 3'	224 pz  227 pz



zawierającego wcześniej wyizolowany i oczyszczony DNA bakteryjny. Amplifikację wykonywano w termocyklerze Omn-E Hybaid, firmy Hybaid Limited. Próbkę poddawano wstępnej denaturacji przez 3 min. w temp. 95°C (w przypadku pary starterów  $C_1$  i  $C_2$  – przez 2 min.), a następnie wykonywano 35 cykli amplifikacji (w przypadku  $C_1$  i  $C_2$  – 30 cykli amplifikacji). Na każdy cykl składały się: denaturacja – 30 sek. w 93°C, przyłączenie starterów – 45 sek. w 60°C (w przypadku starterów  $C_1$  i  $C_2$  – w 43°C) oraz synteza komplementarnego DNA (wydłużenie łańcucha DNA) – 30 sek. w 72°C. W ostatnim 35 (30 dla  $C_1$  i  $C_2$ ) cyklu wydłużano etap syntezy komplementarnego DNA do 2 min. w temp. 72°C.

Analiza produktów amplifikacji. Produkty PCR analizowano poprzez elektroforezę w 2% żelu agarozowym, wybarwionym 1% wodnym roztworem bromku etydyny (2  $\mu$ l/30 ml żelu). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w temp. 22-25°C, przy stałym napięciu (70 V; 5 V/1 cm żelu), przez 45 min. w buforze 1 $\times$ TAE.

W celu wykrycia wśród większych grup (stad) osobników zwierzęcych (przede wszystkim bydła) nosiciela szczepu STEC *s/t* (+), zastosowano typowanie molekularne próbek – początkowo zbiorczych, a następnie pojedynczych – przy użyciu PCR. Najpierw wstępnie namnażano bakterie obecne w badanych pojedynczych próbkach (np. kału lub wymazów kałowych) w mTSB z nowobiocyną, a następnie tworzone z uzyskanych hodowli bakteryjnych mieszaniny (próbki zbiorcze), składające się z określonych pojedynczych próbek, po 1 ml każda. Wykrycie obecności genów *s/t* w danej próbce zbiorczej umożliwiało następnie zidentyfikowanie nosiciela STEC, na podstawie kolejnych oznaczeń przeprowadzonych z próbkami, z których wcześniej utworzono próbkę zbiorczą, drogą stopniowej eliminacji próbek negatywnych.

Dodatkową analizę produktów PCR, polegającą na potwierdzeniu specyficzności (lub wykazaniu ewentualnych różnic w sekwencji nukleotydu) zamplifikowanych fragmentów genów *s/t*-IA, *s/t*-IIA i *s/t*-IIeA, przeprowadzano w oparciu o metodę analizy restrykcyjnej (RFLP) przy użyciu enzymów firmy MBI Fermentas. Do zamplifikowanej próby PCR (10  $\mu$ l) dodawano 1  $\mu$ l dziesięciokrotnie stężonego buforu dostarczonego wraz z odpowiednią endonukleazą oraz 0,5  $\mu$ l (5 U) odpowiedniego enzymu. W celu enzymatycznego trawienia zamplifikowanych genów *s/t* zastosowano trzy restryktazy: PvuII, Bst1107I (SnaI) oraz AluI wraz z odpowiednimi buforami  $G^-$ ,  $O^+$  i  $Y^-$ /TANGO (MBI Fermentas). Próby poddawano inkubacji w cieplarni (1-3 h/37°C). Strawione produkty PCR analizowano poprzez elektroforezę w 3% żelu agarozowym, wybarwionym 1% wodnym roztworem bromku etydyny (2  $\mu$ l/30 ml żelu). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w temp. 22-25°C, przy stałym napięciu (70 V; 5 V/1 cm żelu), przez 1 h w buforze 1 $\times$ TAE.

Warunki metody PCR-RFLP, dobrano i zoptymalizowano na podstawie danych piśmiennictwa (6), jak również symulacji komputerowych, pozwalających na wyszukanie miejsc rozpoznawanych przez określenie restryktazy, w obrębie zamplifikowanego regionu *s/t*. Wykorzystano w tym celu specjalistyczne programy komputerowe, takie jak: Primer Premier 4 (BioMol Technology) oraz dostępne w internecie, pod adresami: [www.genome.wi.mit.edu/primer3](http://www.genome.wi.mit.edu/primer3) oraz [www.neb.com/rebase](http://www.neb.com/rebase).

## Wyniki i omówienie

Przygotowano system badawczy, którego zasadnicze składowe stanowiły: polimerazowa reakcja łańcuchowa (PCR), rozszerzona dodatkowo o analizę specyficznych polimorfizmów długości fragmentów restrykcyjnych produktów PCR (PCR-RFLP) zamplifikowanych genów *s/t*-IA, *s/t*-IIA i *s/t*-IIeA.

Wykonując amplifikację specyficznych regionów genomu shigatoksycznych szczepów *E. coli* zdefiniowanych jako *s/t*-IA, *s/t*-IIA i *s/t*-IIeA, kodujących podjednostkę A toksyn SLT, otrzymano charakterystyczne produkty PCR o wielkości 370 pz, 283 pz, 227 pz i 224 pz, identyfikujące verotoksyczne pałeczki STEC (EHEC) obecne zarówno w badanym materiale, jak i pochodzące z czystych hodowli. Badania laboratoryjne przeprowadzane z trzema wzorcowymi szczepami *E. coli* O157 : H7, o potwierdzonej verotoksyczności (PZH i PIW) oraz dwoma wzorcowymi „zwierzęcymi” szczepami STEC : E68I/O141 : K85, K88ab (CVL) i E68II/O141 : K85 (PIW), pozwoliły osiągnąć odpowiednio zoptymalizowany, wystandaryzowany i powtarzalny, a także czasoszczędny proces badawczy przydatny w diagnostyce tej grupy patogenów bakteryjnych. Uzyskane wyniki wykorzystano do opracowania wzorców diagnostycznych w zakresie fagowych genów *s/t*-I i *s/t*-II oraz chromosomalnych genów *s/t*-IIe, umożliwiających kontrolę poprawności wykonywanych oznaczeń PCR.

W toku przeprowadzonych badań monitoringowych w kierunku występowania w środowisku Pomorza Zachodniego (województwa zachodniopomorskiego) shigatoksycznych szczepów *E. coli*, zwłaszcza należących do zoonotycznych serotypów (głównie O157 : H7), przebadano łącznie 525 próbek pochodzących od ludzi, zwierząt oraz z surowców i produktów żywności pochodzenia zwierzęcego. Spośród wszystkich próbek przeanalizowanych przy użyciu PCR, tylko w przypadku pięciu udało się oznaczyć obecność genów *s/t*. W dwóch próbkach pochodzących od prosięcia i cielęcia, z których wyizolowano w czystej hodowli szczepy STEC, wykryto „zwierzęcy” typ genu *s/t*-IIe (*s/t*-IIeA) oraz „ludzki” fagowy typ genu *s/t*-I (*s/t*-IA). Natomiast w trzech próbkach surowego mięsa wieprzowego, zidentyfikowano region DNA zdefiniowany jako *s/t*-IIeA, charakterystyczny dla szczepów STEC chorobotwórczych dla zwierząt. Zbyt niska koncentracja bakterii w badanym mięsie uniemożliwiła jednak ich wykrycie drogą posiewu, a tym samym przeprowadzenie dalszej analizy mikrobiologicznej. Wyniki oznaczeń pozostałych próbek okazały się ujemne.

Spośród 60 różnych szczepów *E. coli* o ustalonym lub nieokreślonym typie serologicznym, przebadanych przy użyciu techniki PCR i/lub PCR-RFLP, osiem włączając 3 wzorcowe szczepy O157 : H7 (PZH i PIW), 2 wzorcowe „zwierzęce” szczepy STEC : E68I/O141 : K85, K88ab (CVL), E68II/O141 : K85 (725) (PIW), 1 „zwierzęcy” szczep *E. coli* G1253/O147 : K89, K88ac/96 (pochodzący z kolekcji KIM) oraz 2 wyizolowane z materiału zwierzęcego (*E. coli* NS<sub>O157</sub> 12/96 i NS<sub>O157</sub> 26/99), wykazywały verotoksynogenność, czyli genetycznie uwa-

runkowaną właściwość syntetyzowania verotoksyny SLTI, SLTII lub SLTIIIe.

Podczas grupowego oznaczania (typowania molekularnego w kierunku genów *slt* próbek kału i wymazów kałowych pobranych łącznie od 192 krów i cieląt pochodzących z dwóch wielkotowarowych gospodarstw rolnych, zlokalizowanych na terenie województwa zachodniopomorskiego), wykryto w jednej próbce zbiorczej pochodzącej od 52 cieląt, obecność fragmentu bakteryjnego DNA zdefiniowanego jako *slt*-IA o wielkości 370 pz, charakterystycznego dla SLTI pozytywnych szczepów EHEC. Zidentyfikowano w ten sposób grupę (stado) 52 cieląt, w której znajdował się nosiciel szczepu STEC *slt*(+). Po określeniu przynależności wyizolowanego szczepu do gatunku *E. coli*, ustalono również, iż nie należy on do serogrupy O157 (NS<sub>O157</sub>). Wykryty szczep *slt*-I (+) określono jako *E. coli*NS<sub>O157</sub> 26/99, gdzie 26 oznacza numer kolejny izolatu, a 99 – rok izolacji.

Metoda PCR (w zaproponowanym systemie) okazała się testem uniwersalnym pozwalającym wykrywać bakterie STEC należące do różnych serotypów, na podstawie tylko jednego czynnika zjadliwości. Dodatkowo umożliwiała szybką identyfikację próbek zawierających bakterie STEC, występujące w mieszanej hodowli, pomijając jednocześnie konieczność uprzedniego rozizolowywania poszczególnych kolonii bakteryjnych, co jest niezbędne w przypadku tradycyjnej analizy mikrobiologicznej. Przedstawiona procedura diagnostyczna, jest zgodna z aktualnym podejściem metodycznym uwzględniającym w wykrywaniu, różnicowaniu i charakteryzowaniu szczepów STEC (zwłaszcza serogrupy O157), obok tradycyjnych metod fenotypowych, także PCR i jej liczne odmiany (16, 17, 18).

Łączne użycie metod PCR i RFLP (PCR-RFLP) umożliwiło analizę specyficznych polimorfizmów długości fragmentów restrykcyjnych uzyskiwanych produktów PCR. Metoda ta okazała się przydatna do potwierdzania specyficzności uzyskiwanych produktów PCR, a także typowania poszczególnych genów *slt*. Na podstawie znanych sekwencji nukleotydowych genów *slt* zamplifikowanych przy użyciu odpowiedniej pary starterów, zlokalizowano miejsca rozpoznawane przez swoiste dla nich endonukleazy restrykcyjne oraz ustalono wielkości (długości par zasad) fragmentów restrykcyjnych uzyskiwanych w wyniku ich trawienia (tab. 2). Powstałe w ten sposób wzory restrykcyjne (profile trawienne RFLP) analizowanych genów *slt*, pozwoliły na dokładniejszą charakterystykę szczepów STEC w zakresie ich verotoksyczności oraz umożliwiły różnicowanie pomiędzy

określonymi typami (wariantami) genów *slt*. Spośród kilkudziesięciu enzymów restrykcyjnych, wyselekcjonowano trzy najbardziej przydatne pod kątem analizy wybranych fragmentów genów *slt*-IA, *slt*-IIA i *slt*-IIeA, tzn. PvuII, BstI107I (SnaI) i AluI. Uzyskiwanie różnych polimorfizmów długości fragmentów restrykcyjnych w zakresie genów *slt*, umożliwiło różnicowanie (na poziomie molekularnym) – verotoksyn wytwarzanych przez szczepy patogenne dla ludzi lub zwierząt, a ponadto, wykrywanie polimorfizmów DNA pojawiających się w obrębie genów *slt*.

Różne profile restrykcyjne genów *slt*-IIA i *slt*-IIeA, uzyskiwane dzięki zastosowaniu jednej restryktazy (BstI107I), pozwoliły na różnicowanie pałeczek STEC *slt*-II (+), na podstawie rodzaju wytwarzanej verotoksyny, a tym samym określenie tzw. „ludzkiego” (wytwarzanie SLTII i/lub SLTI) oraz „zwierzęcego” (SLTIIe) typu chorobotwórczości. Zbiorcze zestawienie wyników reakcji PCR-RFLP przeprowadzonej z DNA shigatoksyknych szczepów *E. coli*, przedstawia ryc. 2.

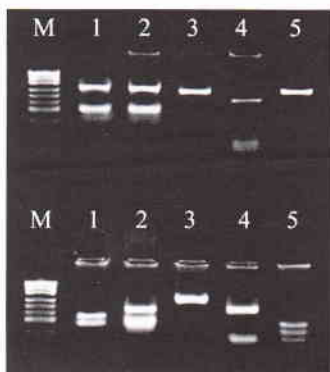
Przy użyciu PCR-RFLP ustalono, że w sekwencji nukleotydowej genu *slt*-IA o wielkości 224 pz (zamplifikowanego parą starterów C<sub>1</sub> i C<sub>2</sub>), wykrytego w przypadku szczepu *E. coli*NS<sub>O157</sub> 26/99 istnieje polimorfizm DNA, różniący go od genu *slt*-IA obecnego w genomie wzorcowego szczepu *E. coli*O157 : H7 (PZH). Wykryty polimorfizm dotyczył sekwencji 5'→GTATAC←3' (rozpoznananej przez enzym BstI107I), która różni się od sekwencji nukleotydowej obecnej w normalnym genie *slt*-IA dwiema parami zasad, tzn. w pierwszej parze – tymina (T) wymieniona została z adeniną (A), natomiast w drugiej – adenina (A) wymieniona została z cytozyną (C), zmieniając tym samym sekwencję 5'→GTTTAA←3' na 5'→GTATAC←3' we fragmencie genu *slt*-IA (ryc. 1). Z uwagi na tę różnicę oraz w celu odróżnienia wykrytego genu od normalnego *slt*-IA, określono go jako *slt*-IvA. Fragment tego genu o wielkości 224 pz poddany działaniu restryktazy BstI107I (SnaI) został pocięty (w miejscu wykrytego polimorfizmu DNA) na dwa mniejsze fragmenty po: 180 i 44 pz (tab. 2, ryc. 2), których wielkość odpowiadała długości fragmentów wyliczonych na podstawie sekwencji nukleotydowej produktu PCR (ryc. 1). Analogicznie fragment genu *slt*-IA (wzorcowego szczepu O157 : H7) o wielkości 224 pz poddany działaniu tego samego enzymu nie został pocięty, w odróżnieniu od *slt*-IvA (ryc. 2). Dodatkowo zastosowanie w analizie restrykcyjnej genu *slt*-IvA enzymu AluI, nie przyczyniło się do wykrycia innych polimorfizmów w obrębie analizowanego fragmentu (ryc. 2). Wykryty po-

156→atatgaaataalatttttagtgactacttttttttttatttttttcatttttcatttttgcagttaattgtgttgccgaagga TTCACGATAGACTTTTTTCGAC tgc aaagacgtatgttagattcgctgaatgcttactctgcaaataggactcactt acagacttttcatcaggaggtagctcttactagattgatagtgccacaggggataattgttttcagt(gtagtgcagagggatagatccagagaaagggc GGTATACT aatetacggcttatttgt GAACGAAAATAATT TATATGTG acaggattttgtaacaggacaataatgttttttattccttctgtcgtattttcactgttacccttccaggtacaacacgcygtatcattctctggtgacaglagctataccacgttaccagctgttgcaggatcagctgtagcgggtagt cagat AAATCGCCATTTCGTTGACTACTTCT tatectgattatgctgcatagtggaacctcactgacgcagctctggtgcaagagcagtgatttaccggtttgtactgtga CAGCTG aagcttaccgttttgc aaataac agaggggttctgtaacaactcggatgatcactggtggcgttttattgtatgtaactgctgaagaatgttgatcttaccattgaaactgggaaggttgagtgtctcctcctgactatcaggaacagactctttcgttaggaagaatttttgaagcattaatgcaattctggaagcctggcalttaactaactgaattgcatca TGCATCGCGAGTTGCCAGAATGGCA tctgatgatttcttctatgtgctccgcagatggaagatgctgggattacgcacaalaaatattgtg gattcactcctctggggcgaattctgtagccagaactalra←1103

**Ryc. 1. Odcinek genu *slt*-IvA kodujący podjednostkę A verotoksyny SLTI (wg 19; zmodyfikowany) oraz startery (do PCR) i enzymy restrykcyjne (do PCR-RFLP), rozpoznające w jego obrębie specyficzne sekwencje nukleotydowe (wg 1, 7)**

Objaśnienia: AAATCGCCATTTCGTTGACTACTTCT – starter A<sub>1</sub> (5'→*slt*-IA) 370 pz; TGCATCGCGAGTTGCCAGAATGGCA – starter A<sub>2</sub> (3'→*slt*-IA) 370 pz; TTCACGATAGACTTTTTTCGAC – starter C<sub>1</sub> (5'→*slt*-IA) 224 pz; GAACGAAAATAATTATATGTG – starter C<sub>2</sub> (3'→*slt*-IA) 224 pz; CAGCTG – enzym restrykcyjny PvuII; GTAICTAC – enzym restrykcyjny BstI107I (SnaI)





**Ryc. 2. Zbiorcze zestawienie wyników reakcji PCR-RFLP przeprowadzonej z DNA shigatoksycznych szczepów *E. coli*, uzyskane po rozdziale elektroforetycznym w 3% żelu agarozowym i wybarwieniu bromkiem etydyny**

Objaśnienia: Ścieżki (góra): M – standard mas DNA (501-67 pz); 1 – gen *slt-IA* (370 pz) zamplifikowany z DNA wzorcowego szczepu O157: H7 (PZH), pocięty restryktazą *Pvu*-II; 2 – gen *slt-IvA* (370 pz) zamplifikowany z DNA shigatoksycznego szczepu *E. coli* NS<sub>0157</sub> 26 / 99, pocięty restryktazą *Pvu*-II; 3 – gen *slt-IIA* (283 pz) zamplifikowany z DNA wzorcowego szczepu O157: H7 (PIW), pocięty restryktazą *Bst*I 1071 (*Sna*I); 4 – gen *slt-IvA* (224 pz) zamplifikowany z DNA wzorcowego „zwierzęcego” szczepu E681 / O141: K85, K88ab, pocięty restryktazą *Alu*I; 5 – gen *slt-IIeA* (283 pz) zamplifikowany z DNA wzorcowego „zwierzęcego” szczepu E681 / O141: K85, K88ab, pocięty restryktazą *Alu*I; 2 – gen *slt-IIA* (283 pz) zamplifikowany z DNA wzorcowego szczepu O157: H7 (PIW), pocięty restryktazą *Bst*I 1071 (*Sna*I); 3 – gen *slt-IIeA* (283 pz) zamplifikowany z DNA wzorcowego „zwierzęcego” szczepu E681 / O141: K85, K88ab, trawiony restryktazą *Bst*I 1071 (*Sna*I), ale nie pocięty; 4 – gen *slt-IIA* (227 pz) zamplifikowany z DNA wzorcowego szczepu O157: H7 (PIW), pocięty restryktazą *Bst*I 1071 (*Sna*I); 5 – gen *slt-IIeA* (227 pz) zamplifikowany z DNA „zwierzęcego” szczepu E681 / O141: K85, K88ab, pocięty restryktazą *Bst*I 1071 (*Sna*I). Profile restrykcyjne (długości pz) genów *slt* poddanych analizie PCR-RFLP przedstawiono w tabeli 2.

**Tab. 2. Fragmenty DNA (pz) uzyskiwane w wyniku trawienia enzymatycznego produktów PCR, zamplifikowanych przy użyciu odpowiedniej pary starterów (ryc. 2)**

Para starterów	Amplifikowany region genów <i>slt</i>	Wielkość produktu PCR (pz)	Fragmenty DNA (pz) uzyskiwane w wyniku pocięcia produktu PCR odpowiednią endonukleazą:		
			<i>Pvu</i> II	<i>Bst</i> I 1071 ( <i>Sna</i> I)	<i>Alu</i> I
A <sub>1</sub> i A <sub>2</sub>	<i>slt-IA</i>	370	262, 108		
	<i>slt-IvA</i>	370	262, 108		
B <sub>1</sub> i B <sub>2</sub>	<i>slt-IIA</i>	283		178, 105	
	<i>slt-IIeA</i>	283			
C <sub>1</sub> i C <sub>2</sub>	<i>slt-IA</i>	224			
	<i>slt-IvA</i>	224		180, 44	
	<i>slt-IIA</i>	227		174, 53	
	<i>slt-IIeA</i>	227		103, 72, 52	129, 98

limirfizm DNA nie wpływał na fenotypowy efekt, czyli produkt toksyny SLTI.

Ustalono ponadto, że zastosowanie enzymu *Bst*I 1071 (*Sna*I) do analizy restrykcyjnej produktów PCR uzyskiwanych w układzie złożonym (*slt-IA*/*slt-IIA*/*slt-IIeA*) wykonywanym przy użyciu pary starterów C<sub>1</sub> i C<sub>2</sub>, umożliwiających zamplifikowanie fragmentów genów *slt-IA* (*slt-IvA*) o wielkości 224 pz oraz *slt-IIA* i *slt-IIeA* o wielkości 227 pz, które są nie do odróżnienia podczas rozdzielania elektroforetycznego z uwagi na zbliżenie masy cząsteczkowej, pozwala uzyskać różne profile restrykcyjne tych genów, a tym samym przyczynia się do dodatkowego typowania genów *slt* podczas jednego badania (ryc. 2).

Zastosowanie metody PCR-RFLP umożliwiło znaczne skrócenie diagnostyki mikrobiologicznej ukierunkowanej na wykrywanie w środowisku oraz różnicowanie pałeczek STEC (EHEC). W zaproponowanym systemie diagnostycznym, przewidującym wstępne namnażanie bakterii (6 h/37°C), łączny czas badania PCR wynosił

ok. 10 h, a dodatkowa analiza RFLP wydłużała go o kolejne 3 h. Natomiast w wypadku pominięcia wstępnego namnażania czas przeprowadzenia jednostkowego oznaczenia metodą PCR-RFLP ulegał skróceniu o 6 h.

## Wnioski

1. Metoda PCR powinna znaleźć szerokie zastosowanie w rutynowej diagnostyce różnych serotypów werotoksycznych pałeczek STEC. Dlatego też można ją polecić do realizacji w laboratoriach, zajmujących się badaniem żywności pochodzenia zwierzęcego, szczególnie w diagnostyce patogenów, które w bardzo niewielkiej ilości zanieczyszczają badany materiał.

2. Metoda PCR-RFLP umożliwia określenie „ludzkiego” bądź „zwierzęcego” pochodzenia i charakteru chorobotwórczości szczepów STEC. Wykryty tą metodą polimorfizm sekwencji nukleotydowej w obrębie genu *slt-IvA* wskazuje na obecność wśród genów *slt-I* innych wariantów, występujących do tej pory przede wszystkim w obrębie genów *slt-II*.

## Piśmiennictwo

- Brian M. J., Frosolono M., Murray B. E., Miranda A., Lopez E. L., Gomez H. F., Clearly T. G.: Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic uremic syndrome, *J. Clin. Microbiol.* 1992, 30, 1801-1806.
- Cobbold R., Desmarchelier P.: A longitudinal study of Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds, *Vet. Microbiol.* 2000, 71, 125-137.
- Comick N. A., Matisse I., Samuel J. E., Bosworth B. T., Moon H. W.: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: temporal and quantitative relationships among colonization, toxin production and systemic disease, *J. Infect. Dis.* 2000, 181, 242-251.
- Furowicz A. J., Czernomyśły-Furowicz D.: Vero-cytotoksyczne serotypy *E. coli*, jako przyczyna zoonotycznych zakażeń człowieka. *Przegl. Epidemiol.* 1996, 50, 341-352.
- Grimm L. M., Goldoft M., Kobayashi J., Lewis J. H., Alfi D., Perdicchizzi A. M., Tarr P. I., Ongerth J. E., Moseley S. L., Samadpour M.: Molecular epidemiology of a fast-food restaurant associated outbreak of *Escherichia coli* O157 : H7 in Washington State, *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 2155-2158.
- Hill W. E.: The polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1996, 36, 123-173.
- Karch H., Meyer T.: Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction, *J. Clin. Microbiol.* 1989, 27, 2751-2757.
- Konopka M.: Enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* O157 : H7 – chorobotwórczość, diagnostyka i epidemiologia zakażeń. *Nowa Med.* 1997, 4, 10-16.
- Kwiatkowska K., Różańska H.: *Escherichia coli*, serotyp O157 : H7 – czynnik etiologiczny zatrucia pokarmowych u ludzi. *Medycyna Wet.* 1996, 52, 29-32.
- Made D., Stark R.: Occurrence of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* in raw milk detected by polymerase chain reaction, *Dt. Tierärztl. Wschr.* 1996, 103, 511-512.
- Mainil J.: Shiga/verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Vet. Res.* 1999, 30, 235-257.
- Matthews K. R., Murdough P. A., Bramley A. J.: Invasion of bovine epithelial cells by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 : H7, *J. Appl. Microbiol.* 1997, 82, 197-203.
- Osek J.: Znaczenie werotoksyny *Escherichia coli* w patogenie świni. *Medycyna Wet.* 1995, 51, 327-330.
- Osek J.: Mechanizmy działania enterotoksyn *Escherichia coli*. *Medycyna Wet.* 1997, 53, 4-7.
- Osek J.: *Escherichia coli* O157 – groźny patogen o szerokiej chorobotwórczości. *Medycyna Wet.* 1999, 55, 215-221.
- Osek J.: Genotypowa charakterystyka szczepów *Escherichia coli* O157 izolowanych w Polsce. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 255-257.
- Osek J.: Genotypowa identyfikacja i różnicowanie shigatoksycznych szczepów *Escherichia coli* przy użyciu multiplex PCR. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 323-326.
- Osek J.: Aktualne metody diagnostyki szczepów *Escherichia coli* O157. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 783-787.
- Paton A. W., Beutin L., Paton J. C.: Heterogeneity of the amino-acid sequences of *Escherichia coli* Shiga-like toxin type-I operons. *Gene* 1995, 153, 71-74.
- Pirard D., Muyldermans G., Moriau L., Stevens D., Lauwers W.: Identification of new verocytotoxin type 2 variant B subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 3317-3322.
- Thomas A., Smith H. R., Rowe B.: Use of digoxigenin-labelled oligonucleotide DNA probes for VT2 and VT2 human variant genes to differentiate Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* strains of serogroup O157, *J. Clin. Microbiol.* 1993, 31, 1700-1703.
- Wilson J. B., McEwen S. A., Clarke R. C., Leslie K. E., Wilson R. A., Waltner-Toews D., Gyles C. L.: Distribution and characteristics of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle. *Epidemiol. Infect.* 1992, 108, 423-439.

Adres autora: dr inż. Paweł Nawrotek, ul. Doktora Judyma 24, 71-466 Szczecin; e-mail: P.Nawrotek@biot.ar.szczecin.pl