

Multiplex PCR dla szybkiej identyfikacji *Escherichia coli* oraz genów kodujących toksyny LTI, STII i EAST1

JACEK OSEK

Zakład Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Osek J.

Multiplex PCR use for rapid identification of *E. coli* and genes encoding LTI, STII, and EAST1 toxins

Summary

Strains of *E. coli* responsible for diarrhoeal diseases in humans and animals usually belong to the enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) group. These bacteria produce enterotoxins: heat-labile LTI and/or heat-stable ST (STI or STII). It has also been demonstrated that some ETEC possess the ability to release the enteroaggregative heat-stable toxin 1 (EAST1), the role of which in the pathogenesis of diarrhoea is still unclear. Routine diagnosis of pathogenic *E. coli* is based on bacterial isolation, their biochemical identification and determining the ability for toxin production. This procedure is usually time-consuming and needs at least 24 - 48 h. The aim of the present study was to develop a rapid and specific method based on PCR that allows for simultaneous identification of *E. coli* and the presence of genes encoding the production of LTI and STII enterotoxins as well as EAST1 toxin (multiplex PCR assay). It was demonstrated that it is possible to simultaneously amplify the *uspA* (*E. coli*-specific) and *eltI* (LTI), *estII* (STII), and *astA* (EAST1) genes, which allow for rapid (without any additional biochemical analyses) identification of *E. coli* together with their toxic properties. The developed test will improve identification methods of pathogenic *E. coli* strains responsible for diarrhoeal diseases in animals and humans.

Keywords: *E. coli*, LTI and STII enterotoxins, EAST1 toxin, multiplex PCR

Szczepy *Escherichia coli* są istotnym czynnikiem schorzeń biegunkowych u zwierząt (zwłaszcza prosiąt i cieląt) jak też u ludzi (dzieci oraz osoby dorosłe, tzw. biegunki podróżnych) (5, 13). Izolaty *E. coli* wywołujące objawy biegunkowe zostały zaklasyfikowane do szeregu grup, których przedstawiciele różnią się obecnością odmiennych czynników chorobotwórczości, jak też mechanizmami indukowania biegunki. Opierając się na tych kryteriach, Nataro i Kaper (13) wyróżnili szczepy enterotoksyczne (ETEC), enteropatogenne (EPEC), enterokrwotoczne (EHEC) (odpowiedzialne za schorzenia u ludzi), a wśród nich shigatoksyczne (STEC) (występujące u zwierząt-nosicieli), enteroinwazyjne (EIEC) oraz enteroagregacyjne (EAEC). Dominującym czynnikiem etiologicznym schorzeń biegunkowych u zwierząt są szczepy enterotoksyczne (ETEC), będące przyczyną zachorowań u prosiąt oseków oraz okresu odsadzania od macior jak też biegunek u cieląt, jagniąt i zwierząt towarzyszących (psy) (5, 10).

Bakterie grupy ETEC posiadają zdolność uwalniania przynajmniej jednej odmiany toksyny (enterotoksyny) – ciepłochwiejnej LT lub ciepłostajęcej ST (11, 12). Wykazano, że każda z tych toksyn może wystąpić w co najmniej dwóch wariantach, różniących się przede wszystkim opornością na temperaturę, sekwencją aminokwasową i powinowactwem do swoistych recepto-

rów nabłonkowych. Odmiany te oznaczają się zwykle jako LTI i LTII oraz STI (Sta) i STII (STb) (11, 23). Stwierdzono, że w patogenezie biegunek zwierząt, a zwłaszcza prosiąt, podstawową rolę odgrywają enterotoksyny LTI i STII, chociaż stwierdza się też szczepy ETEC mające zdolność produkcji toksyny STI (2, 23).

W ostatnim okresie szereg badań poświęcono grupie enteroagregacyjnych *E. coli* (EAEC). Izolaty te posiadają zdolność adhezji *in vitro* do komórek linii Hep-2 i HeLa w postaci agregatów komórkowych (13, 22). Wykazano również, że szczepy EAEC występowały w znaczącym odsetku w materiale pobranym od dzieci z biegunką (22). Mechanizm chorobotwórczego działania tych bakterii nie jest dobrze poznany ale uważa się, że ich istotnym czynnikiem patogenności może być niskocząsteczkowe białko (38 aminokwasów), określane nazwą enteroagregacyjna *E. coli* ciepłostajęca enterotoksyna 1 (enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1; EAST1) (13, 21). Stwierdzono, że EAST1 jest odmienna od enterotoksyn STI i STII chociaż ich mechanizm działania biegunkowego, prowadzący do aktywacji cykazy guanylowej, jest zbliżony (21, 23). Materiał genetyczny kodujący syntezę EAST1, określony nazwą *astA*, może występować w chromosomie jak też w plazmidach chorobotwórczych szczepów *E. coli*. Rola toksyny EAST1

w patogenezie schorzeń biegunkowych nie jest w pełni wyjaśniona. Stwierdzono jednak, że oprócz szczepów EAEC wyosobnionych od dzieci, gen *astA* obecny był również u bakterii grup ETEC, EPEC i EHEC (4, 12). Szczepy takie (*astA*⁺) wykazano w materiale pochodzenia ludzkiego jak też wśród izolatów wyizolowanych od zwierząt, zwłaszcza prosiąt z biegunką (4, 17).

Oznaczanie chorobotwórczych (biegunkowych) szczepów *E. coli*, będących przyczyną schorzeń zwierząt, opiera się na izolacji bakterii, ich biochemicznej identyfikacji oraz na określeniu podstawowych markerów patogenności – zdolności wytwarzania enterotoksyn i fimbrii adhezyjnych. Procedura ta jest zwykle czaso- i pracochłonna (badanie biochemiczne) i wymaga co najmniej 24-48 h. Należy również uwzględnić dodatkowy czas niezbędny dla określenia czynników chorobotwórczości lub ich markerów genotypowych. Enterotoksyny *E. coli* oznacza się najczęściej testami serologicznymi (ELISA) lub też określa ich geny metodą polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR), niekiedy w odmianie multiplex (mPCR), umożliwiającej równoczesną identyfikację dwóch lub więcej markerów genotypowych (5, 10, 13). Testy PCR znajdują również zastosowanie do identyfikacji bakterii Gramujemnych a zwłaszcza *E. coli* (6-9). Ostatnio, opracowano specyficzną parę starterów, pozwalających na oznaczenie fragmentu genu *uspA*, kodującego typowe dla *E. coli* uniwersalne białko stresowe UspA (14). Metodyka ta pozwala na znacznie szybsze określenie gatunkowe izolowanych bakterii (bez konieczności wykonania badań biochemicznych) i różnicowanie ich od innych gatunków drobnoustrojów mikroflory towarzyszącej (3, 18). Celem obecnych badań było opracowanie testu multiplex PCR umożliwiającego szybkie i swoiste oznaczenie *E. coli* (identyfikacja genu *uspA*) oraz określenie u nich trzech markerów genotypowych, kodujących wytwarzanie istotnych w patogenezie biegunki enterotoksyn LTI (gen *eltI*), STII (gen *estII*) i potencjalnie chorobotwórczej toksyny EAST1 (gen *astA*). Metoda ta pozwoli

na usprawnienie diagnostyki patogennych szczepów *E. coli*, odpowiedzialnych za rozwój schorzeń biegunkowych u zwierząt i ludzi.

Materiał i metody

Szczepy bakteryjne. Do opracowania testu multiplex PCR (mPCR) użyto następujących referencyjnych szczepów *E. coli*: 256 (O141 : K81, STI/STII), 281 (O149 : K91, F4, LTI), 282 (O101 : K?, STII), 290 (O149 : K91, LTI/STII/EAST1), 293 (O149 : K91, LTI/STII), 452 (O78 : K80, LTI/EAST1), 453 (O78 : K80, EAST1), 454 (O147 : K89, STII/EAST1), 390 (K-12; szczep laboratoryjny nie wytwarzający badanych toksyn) oraz szereg izolatów Gramujemnych nie należących do gatunku *E. coli* (*Proteus vulgaris*, *Pr. mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella sp.*, *Pasteurella multocida*). Szczepy przechowywano w temperaturze -80°C w bulionie LB zawierającym 15% glicerolu. Do badań użyto też 207 terenowych izolatów *E. coli*, wyosobnionych od prosiąt z biegunką okresu odsadzenia od macior (w wieku 4-6 tygodni) (17, 19, 20). Szczepy te identyfikowano jako *E. coli* przy użyciu zestawu biochemicznego API 20E (bioMerieux, Francja). Do testów PCR bakterie posiewano na agar LB lub bulion LB i inkubowano w 37°C przez 18 h.

Matrycowy DNA. Bakteryjny DNA użyty do analizy metodą PCR przygotowano wykorzystując dwie metody: 1. Izolacji przy pomocy handlowego zestawu Genomic Isolation Kit (Sigma, St. Louis, USA) z hodowli bakteryjnej w bulionie LB oraz 2. Lizy komórek bakteryjnych wykonanej przez zawieszenie jednej kolonii w 25 µl jałowej wody, wolnej od DNaz i Rnaz (ICN Biomedicals, Costa Mesa, USA) i odwirowanie zawiesiny (13.000 g, 1 min.) celem uzyskania supernatantu wolnego od osadu komórkowego. W przypadku izolowanego DNA (metoda 1), koncentrację materiału genetycznego określano spektrofotometrycznie (260 nm i 280 nm) i do testów PCR używano 50 ng kwasu nukleinowego.

Testy PCR i multiplex PCR. W pierwszym etapie pracy dobrano optymalne warunki amplifikacji DNA, pozwalające na identyfikację genów kodujących toksyny wytwarzane przez szczepy *E. coli*: enterotoksyny LTI (gen *eltI*)

Tab. 1. Charakterystyka starterów DNA użytych do testów PCR i multiplex PCR

| Nazwa startera | Sekwencja nukleotydomowa (5'→3') | Temperatura topnienia startera (°C) | Amplifikowany gen | Produkt genowy | Produkt amplifikacji (pz) | Piśmiennictwo |
|----------------|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------|
| Ec1 | CCGATACGCTGCAATCAGT | 53,8 | <i>uspA</i> | uniwersalne białko stresowe | 884 | 3 |
| Ec2 | ACGCAGACCGTAGGCCAGAT | 55,8 | | | | |
| LT3 | TATCCTCTCTATATGCACAG | 47,6 | <i>eltI</i> | enterotoksyna LTI | 480 | 16 |
| LT4 | CTGTAGTGGAAGCTGTTATA | 47,6 | | | | |
| STIIB1 | GCCTATGCATCTACACAATC | 51,8 | <i>estII</i> | enterotoksyna STII | 278 | 15 |
| STIIB2 | TGAGAAATGGACAATGTCCG | 53,8 | | | | |
| EAST1-1 | CCATCAACACAGTATATC | 44,7 | <i>astA</i> | toksyna EAST1 | 111 | 25 |
| EAST1-2 | GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT | 63,5 | | | | |

Tab. 2. Optymalna koncentracja starterów DNA, jonów magnezu i polimerazy Taq użytych do testów PCR i multiplex PCR

| Składnik mieszaniny PCR | Koncentracja | |
|-------------------------|--------------|---------|
| | PCR | mPCR |
| Ec1 | 0,1 µM | 0,05 µM |
| Ec2 | | |
| LT3 | 0,5 µM | 0,5 µM |
| LT4 | | |
| STIIB1 | 0,1 µM | 0,5 µM |
| STIIB2 | | |
| EAST1-1 | 0,2 µM | 0,05 µM |
| EAST1-2 | | |
| MgCl ₂ | 5 mM | 4 mM |
| Polimeraza | 1 U | 2 U |

i STII (gen estII) oraz enteroagregacyjnej toksyny EAST1 (gen astA). Dodatkowo, wystandaryzowano test PCR pozwalający na identyfikację genu *uspA*, kodującego typowe dla *E. coli* uniwersalne białko stresowe (UspA). Sekwencje nukleotydowe i charakterystykę użytych starterów DNA przedstawiono w tab. 1. Reakcje PCR wykonano w mieszaninach o objętości 50 µl, zawierających 5 µl matrycowego DNA bakteryjnego (izolowany lub w postaci zawiesiny wodnej), 5 µl buforu PCR (10-razy skoncentrowany), 5 µl mieszaniny deoksynukleotydów (dATP, dCTP, dGTP i dTTP; 200 µM każdego), 10 µl MgCl₂ (5 mM), 0,5-2,5 µl każdego ze starterów (końcowa stężenie odpowiednio 0,1-0,5 µM; tab. 2), 1 U polimerazy Taq (Fermentas, Wilno, Litwa) oraz wody do końcowej objętości 50 µl. Uzyskane produkty PCR barwiono bromkiem etydyny (5 µg/ml), odbarwiano w wodzie redystylowanej i analizowano w świetle UV przy użyciu systemu dokumentacji Gel-Doc 2000 (Bio-Rad). Produkty PCR, o masach molekularnych przedstawionych w tab. 1, określano przez porównanie z markerem DNA (100 bp DNA ladder; Fermentas).

Tab. 3. Optymalne parametry reakcji amplifikacji genowej dla testów PCR i multiplex PCR

| Etap reakcji PCR | Parametry reakcji | | | | | |
|---------------------|-------------------|------|-------------|------|--------------|------|
| | temperatura (°C) | | czas (min.) | | liczba cykli | |
| | PCR | mPCR | PCR | mPCR | PCR | mPCR |
| Denaturacja wstępna | 94 | 94 | 5 | 5 | 1 | 1 |
| Denaturacja | 94 | 94 | 1 | 1 | 30 | 30 |
| Przyłączenie | 55 | 53 | 1 | 1 | 30 | 30 |
| Wydluzanie | 72 | 72 | 1 | 2 | 30 | 30 |
| Wydluzanie końcowe | 72 | 72 | 5 | 5 | 1 | 1 |

W kolejnym etapie badań opracowano test multiplex PCR, pozwalający na równoczesną amplifikację 4 genów *E. coli*: *uspA* (specyficzny dla *E. coli*), *eltI* (enterotoksyna LTI), *estII* (enterotoksyna STII) i *astA* (toksyna EAST1). Optymalne stężenia starterów, jonów magnezu i ilości polimerazy Taq przedstawiono w tab. 2. W skład mieszaniny testu mPCR wchodziły: bufor enzymatyczny (10-razy skoncentrowany; 5 µl), mieszanina dNTP (200 µM), MgCl₂ (6 µl), cztery pary starterów DNA (0,25-2,5 µl), 2 U polimerazy Taq oraz woda do objętości 50 µl.

Wszystkie amplifikacje w testach PCR i mPCR wykonano w automatycznym termocyklerze (PTC-100; MJResearch, USA), używając parametrów przedstawionych w tab. 3. Produkty amplifikacji PCR i mPCR określano w 2% żelu agarozowym, testem elektroforezy horyzontalnej w buforze TAE przy napięciu 100 V.

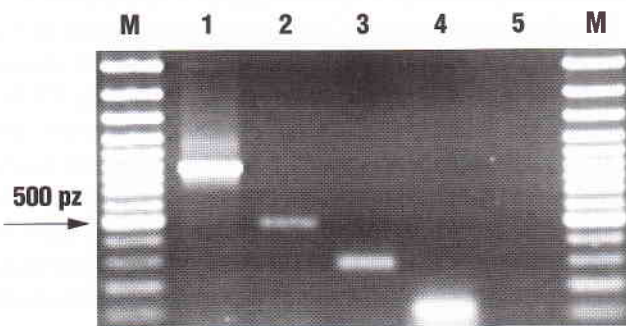
Wyniki i omówienie

W pierwszym etapie badań opracowano i wystandaryzowano szereg testów PCR, pozwalających na szybką i swoistą identyfikację bakterii z grupy *E. coli* (obecność genu *uspA*) oraz wykazanie markerów genotypowych, kodujących wytwarzanie enterotoksyn LTI i STII oraz toksyny EAST1. Celem optymalizacji reakcji amplifikacji z referencyjnych szczepów *E. coli* i *P. vulgaris* izolowano DNA, a następnie ustalano jego koncentrację na 10 ng/µl. Tak przygotowane zawiesiny dodawano następnie (5 µl) do mieszaniny PCR zawierającej właściwe dla danych genów startery DNA (tab. 1). Startery te wybrano w oparciu o dane literaturowe oraz na podstawie wcześniejszych badań własnych, biorąc pod uwagę możliwość ich dalszego wykorzystania do testu multiplex PCR, a zwłaszcza uzyskanie amplikonów o różnej masie molekularnej, pozwalającej na ich odróżnienie w żelu agarozowym. Dotyczyło to przede wszystkim starterów amplifikujących geny enterotoksyn LTI i STII, które w zależności od sekwencji nukleotydowej mogą generować produkty o odmiennej masie molekularnej (1, 24). W przypadku genów *uspA* i *astA* w dostępnym piśmiennictwie występują tylko oligonukleotydy o cechach podanych w tab. 1, umożliwiające uzyskanie produktów o wielkości odpowiednio 884 pz i 111 pz. Stwierdzono, że optymalna koncentracja każdego ze starterów wynosiła odpowiednio 0,1 µM (*uspA*), 0,5 µM (*eltI*), 0,1 µM (*estII*) i 0,2 µM (*astA*) (tab. 2). Dodatkowo wykazano, wykonując szereg reakcji testowych, że najlepsze wyniki (optymalny obraz amplikonów PCR, brak prążków niespecyficznych) uzyskano w obecności 5 mM jonów magnezu (MgCl₂) i 1 U polimerazy Taq (tab. 2). Wykonując szereg reakcji próbnych, w których zmieniano temperaturę przyłączenia starterów i liczbę cykli PCR stwierdzono, że optymalne rezultaty otrzy-

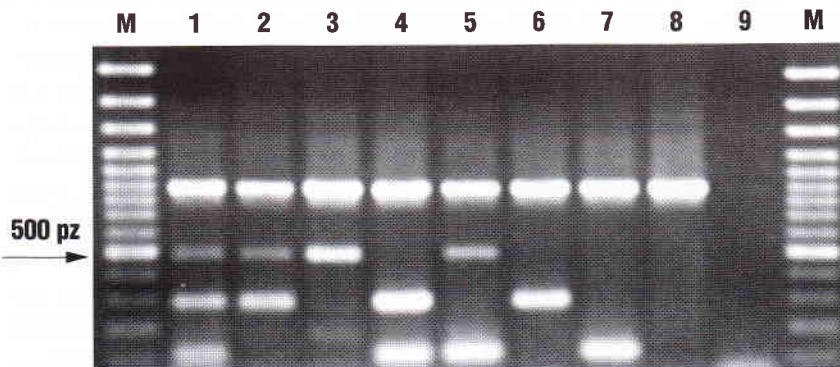
mywano gdy amplifikowano badane geny *E. coli* przy użyciu programu o parametrach przedstawionych w tab. 3. Uzyskane amplikony cechowały się oczekiwaną masą molekularną i były łatwe do identyfikacji w 2% żelu agarozowym (ryc. 1).

Celem uproszczenia reakcji PCR wykonano następnie testy, w których do mieszaniny reakcyjnej dodawano matrycowy DNA w postaci izolowanego i oczyszczonego materiału genetycznego (50 ng) oraz równolegle – w postaci komórek bakteryjnych zawieszonych w wodzie. Uzyskane w obu grupach testów wyniki były takie same i z tego też względu do dalszych badań (test mPCR) używano DNA w postaci wodnej zawiesiny analizowanych komórek *E. coli*.

Kolejny etap badań zmierzał do opracowania testu multiplex PCR, umożliwiającego równoczesną amplifikację wspomnianych wyżej 4 genów (*uspA*, *eltI*, *estII* i *astA*), a przez to szybką i swoistą identyfikację izolatów chorobotwórczych i odróżnienie ich od szczepów nie wytwarzających tych toksyn jak też różnicowanie od innych bakterii nie należących do grupy *E. coli*. W tym celu zmieszano wszystkie 4 startery DNA w koncentracjach używanych do pojedynczych reakcji PCR (tab. 2), dodając jony magnezu (5 mM) i poli-



Ryc. 1. Obraz elektroforetyczny produktów amplifikacji genowej uzyskany w testach PCR w kierunku genów: *UspA* (białko *UspA E. coli*; szczep 390 K-12; ścieżka 1), *eltI* (enterotoksyna LTI, szczep 281, ścieżka 2), *estII* (enterotoksyna STII, szczep 282, ścieżka 3), *astA* (toksyna EAST1, szczep 453, ścieżka 4). Ścieżka 5 – kontrola reakcji PCR. M – 100 pz standard masy molekularnej (Fermentas). Pozycja 500 pz zaznaczona strzałką



Ryc. 2. Obraz elektroforetyczny produktów amplifikacji genowej uzyskanych w teście multiplex PCR w kierunku genów *uspA*, *eltI*, *estII* i *astA*, z referencyjnymi szczepami *E. coli*. Poszczególne ścieżki: M, 100 pz standard masy molekularnej, 1, *E. coli* 290 (LTI/STII/EAST1); 2, *E. coli* 293 (LTI/STII); 3, *E. coli* 281 (LTI); 4, *E. coli* 454 (STII/EAST1); 5, *E. coli* 452 (LTI/EAST1); 6, *E. coli* 282 (STII); 7, *E. coli* 453 (EAST1); 8, *E. coli* 390 (K-12); 9, *Pr. vulgaris*). Pozycja 500 pz zaznaczona strzałką

merazę Taq (1 U) oraz DNA referencyjnego szczepu *E. coli* 290, posiadającego wszystkie badane markery patogenności (LTI/STII/EAST1). Amplifikację wykonano przy użyciu programu PCR używanego poprzednio, a analizę uzyskanych amplikonów przeprowadzono w 2% żelu agarozowym. Stwierdzono, że podane wyżej warunki amplifikacji genowej nie były w pełni optymalne, gdyż nie wszystkie oczekiwane prążki DNA były widoczne w żelu jak również ich intensywność nie zawsze była wystarczająca do wykonania prawidłowej analizy. Z tego też względu wykonano szereg dodatkowych reakcji PCR, w których zmieniano koncentrację poszczególnych par starterów jak też modyfikowano nieznacznie stężenie jonów magnezu (od 1,5 mM do 4,0 mM) oraz polimerazy Taq (1,5 U, 2,0 U, 2,5 U). W wyniku tych prac stwierdzono, że optymalne stężenia poszczególnych reagentów testu mPCR były nieco odmienne niż w przypadku wykonywanych wcześniej pojedynczych reakcji amplifikacji (tab. 2). Najbardziej wyraźne amplikony (ryc. 2), typowe dla poszczególnych amplifikowanych genów (*uspA*, *eltI*, *estII* i *astA*) otrzymano gdy mPCR wykonywano ze starterami o koncentracji podanej w tab. 2. W układzie tym stwierdzono relatywnie słaby prążek charakterystyczny dla genu enterotoksyny LTI (480 pz) ale na jego intensywność nie miała wpływu zmiana (zwiększenie lub zmniejszenie) koncentracji starterów LT3 i LT4. Wykazano też, że amplikon *estII* wymagał wzrostu stężenia starterów STIIB1 i STIIB2, podczas gdy optymalne prążki markerów *uspA* i *astA* obserwowano po zmniejszeniu (odpowiednio 2 i 4 razy w porównaniu z testami PCR) ilości swoistych dla nich oligonukleotydów DNA (tab. 2). Optymalna koncentracja jonów Mg^{+2} (4 mM) była też nieznacznie niższa w przypadku testu mPCR w porównaniu z pojedynczymi reakcjami PCR (5 mM).

Specyficzność opracowanego systemu mPCR wykazano, gdy do badań użyto szczepów *E. coli*, posiadających oznaczone we wcześniejszych pracach (17, 19, 20) markery genotypowe enterotoksyn LTI i STII i toksyny EAST1 jak również izolatów, nie wykazujących obecności badanych w pracy czynników toksycznych. Stwierdzono, że nietoksyczne szczepy *E. coli* generowały tylko jeden amplikon o masie 884 pz (gen *uspA*) podczas gdy izolaty posiadające genotypowe markery toksyczności prowadziły do powstania odpowiednio czterech (*uspA/eltI/estII/astA*), trzech (*uspA/eltI/estII*, *uspA/eltI/astA*, *uspA/estII/astA*) lub dwóch (*uspA/eltI*, *uspA/estII*, *uspA/astA*) produktów amplifikacji. W przypadku analizy szczepów nie należących do gatunku *E. coli* nie stwierdzono obecności żadnego z wymienionych produktów amplifikacji genowej jak również innych, niespecyficznych amplikonów o masach odmiennych

niż 884 pz, 480 pz, 278 pz i 111 pz. Wykazano całkowitą korelację między wynikami testów PCR i mPCR w przypadku analizy 207 izolatów *E. coli* pochodzących od prosiąt z biegunką (17, 19, 20): szczepy posiadające genotypowe markery toksyczności w teście PCR generowały analogiczne amplikony (oraz dodatkowo swoisty dla *E. coli* produkt genu *uspA* o masie 884 pz) o masach typowych dla oznaczanych toksyn *eltI*, *estII* i/lub *astA*.

Opracowany test multiplex PCR pozwala na szybką, nie wymagającą czaso- i pracochłonnych dodatkowych badań biochemicznych, identyfikację bakterii rodzaju *E. coli* oraz równocześnie – umożliwia określenie obecności u nich istotnych markerów genotypowych, kodujących wytwarzanie dwóch enterotoksyn (LTI i STII) jak też toksyny EAST1. Molekularna identyfikacja testem mPCR chorobotwórczych i niechorobotwórczych *E. coli* pozwala też równocześnie na odróżnienie tych bakterii od innych drobnoustrojów Gramujemnych, które mogą być izolowane od prosiąt z biegunką ale nie są przyczyną schorzenia (np. *Proteus*, *Enterobacter*). Zastosowane w teście cztery pary starterów DNA umożliwiają wytworzenie amplikonów o zróżnicowanej masie molekularnej, która pozwala na ich łatwą identyfikację w 2% żelu agarozowym. Dodatkowo, istotną zaletą przedstawionego odczytu jest możliwość wykorzystania matrycowego DNA testowanych bakterii w postaci zawiesiny wodnej komórek, bez konieczności przeprowadzenia procesu izolacji i oczyszczania materiału genetycznego. Przedstawiona metoda diagnostyczna może więc być rutynowo stosowana do szybkiej identyfikacji chorobotwórczych szczepów *E. coli* w laboratoriach mających dostęp do techniki PCR.

Piśmiennictwo

1. Candrian U., Furrer C., Hofflein C. R., Meyer C. R., Jermini M., Luthy J.: Detection of *Escherichia coli* and identification of enterotoxigenic strains by primer-directed enzymatic amplification of specific DNA sequences. *Int. J. Food Microbiol.* 1991, 12, 339-351.
2. Celemin C., Anguita J., Naharro G., Suarez S.: Evidence that *E. coli* isolated from healthy pigs intestine hybridize with LT-II, ST-Ib and SLTII DNA probes. *Microb. Pathog.* 1994, 16, 77-81.
3. Chen J., Griffiths M. W.: PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. *Let. Appl. Microbiol.* 1998, 27, 369-371.
4. Choi C., Kwon D., Chae C.: Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I gene and its relationship with fimbrial and toxin genes in *E. coli* isolated from diarrheic piglets. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2001, 13, 26-29.
5. Holland R. E.: Some infectious cases of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 1990, 3, 345-375.
6. Hsu S. C., Tsen H. Y.: PCR primers designated from malic acid dehydrogenase gene and their use for detection of *Escherichia coli* in water and milk samples. *Int. J. Food Microbiol.* 2001, 64, 1-11.
7. Klausegger A. M., Hell M., Berger A., Zinober K., Baier S., Jones N., Sperl W., Kofler B.: Gram type-specific broad-range PCR amplification for rapid detection of 62 pathogenic bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37, 464-466.
8. Lawson A. J., Linton D., Stanley J., Owen R. J.: Polymerase chain reaction detection and speciation of *Campylobacter upsaliensis* and *C. helveticus* in human faeces and comparison with techniques. *J. Appl. Microbiol.* 1997, 83, 375-380.
9. Linton D., Owen R. J., Stanley J.: Rapid identification by PCR of the genus of *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. *Res. Microbiol.* 1996, 147, 707-718.

10. Nagy B., Fekete P. Z.: Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* 1999, 30, 259-284.
11. Nair G. B., Takeda Y.: The heat-stable enterotoxins. *Microb. Pathog.* 1998, 24, 123-131.
12. Nakazawa M., Sugimoto C., Isayama Y., Kashiwazaki M.: Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from pigs with neonatal and post-weaning diarrhea in Japan. *Vet. Microbiol.* 1987, 13, 291-300.
13. Nataro J. P., Kaper J. B.: Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11, 142-201.
14. Nystrom T., Neidhardt F. C.: Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 1992, 6, 3186-3198.
15. Ojeniyi B., Ahrens P., Meyling A.: Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhoea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays. *J. Vet. Med. B* 1994, 41, 49-59.
16. Olive D. M.: Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase. *J. Clin. Microbiol.* 1989, 27, 261-265.
17. Osek J.: Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I (EAST1) gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin markers in *E. coli* isolates from pigs with diarrhoea. *Vet. Microbiol.* 2002, w druku.
18. Osek J., Gallien P., Protz D., Truszczyński M.: Rapid and specific differentiation of enterotoxin-producing *Escherichia coli* strains from other Gram-negative enteric bacteria using multiplex PCR. *Berl. Munch. Tierarztl. Wschr.* 2000, 113, 265-270.
19. Osek J.: Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning. *Vet. Microbiol.* 1999, 68, 209-217.
20. Osek J.: Virulence factors and genetic relatedness of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with post-weaning diarrhea. *Vet. Microbiol.* 2000, 71, 211-222.
21. Savarino S. J., Fasano A., Watson J., Martin B. M., Levine M. M., Guandalini S., Guerry P.: Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 3093-3097.
22. Scaletsky I. C. A., Silva M. L. M., Trabulsi L. R.: Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.* 1984, 45, 534-536.
23. Sears C. L., Kaper J. B.: Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev.* 1996, 60, 167-215.
24. Tsen H. Y., Jian L. Z.: Development and use of a multiplex PCR system for the rapid screening of heat labile I, heat stable toxin II and shiga-like toxin I and II genes of *Escherichia coli* in water. *J. Appl. Microbiol.* 1998, 84, 585-592.
25. Yamamoto T., Nakazawa M.: Detection and sequences of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I gene in enterotoxigenic *E. coli* strains isolated from piglets and calves with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 223-227.

Adres autora: doc. dr hab. Jacek Osek, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: josek@piwet.pulawy.pl

LE GRAND D., CALAVAS D., BRANK M., CITTI C., ROSENGARTEN R., BÉZILLE P., POUMARAT F.: Częstość występowania zakażenia *Mycoplasma bovis* u bydła użytkowości mięsnej we Francji w oparciu o badania serologiczne. (Serological prevalence of *Mycoplasma bovis* infection in suckling beef cattle in France). *Vet. Rec.* 150, 268-273, 2002 (9)

Na podstawie wyników testu ELISA określono częstość występowania zakażeń wywołanych przez *Mycoplasma bovis* u bydła mięsnego we Francji. Przebadano 824 losowo wybrane stada krów z 8 departamentów. Ogółem przebadano surowice 32 197 krów w wieku powyżej 1 roku. Liczba stad w poszczególnych departamentach, w których występowały zwierzęta reagujących pozytywnie w teście ELISA wahała się od 28 do 90%. Odsetek zwierząt zakażonych w stadzie wahał się od 10 do 20%. Występowały statystycznie istotne różnice pomiędzy częstością występowania seropozytywnych stad i ilością zwierząt reagujących dodatnio w teście ELISA w stadzie w zależności od departamentu, w którym były zlokalizowane badane stada.