

Charakterystyka wybranych markerów patogenności shigatoksycznych szczepów *Escherichia coli* wyosobnionych z surowej wołowiny przy użyciu PCR*)

MARCIN WEINER

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

Weiner M.

Characterization of selected virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* originated from raw beef by the use of PCR

Summary

The aim of the study was the characterization of selected virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* originated from raw beef by the use of PCR. The identification of Stx variants (stx_{2c}, stx_{2d}, stx_{2e} and stx_{2f}) was done with the stx₂-positive *E. coli* strains, resulting in the detection of the stx_{2d} gene in 13 STEC isolates out of which 3 strains also had the stx_{2c} gene. None of the isolates possessed the stx_{2f} or stx_{2e} genes. The intimin marker (γ variant) was observed in all *E. coli* O157:H7, whereas β variant in *E. coli* O26 isolates. The genotypic factors such as katP, toxB and efa1 were detected in all O157:H7 as well as in one O26 isolate. Fifteen STEC were iha-positive and five saa-positive. None of the saa-positive isolates belonged to the O157 or O26 groups. The simultaneous presence of the lpfA_{O157/O1-141} and lpfA_{O157/O1-154} genes was noted in 8 O157:H7 and in one O26 STEC. The lpfA_{O157/O1-141} gene alone was present in 4 other STEC tested, including one *E. coli* O26. None of *E. coli* O157:H7 had the lpfA_{O113} marker that was observed in the all remaining STEC. In one isolate belonging to the *E. coli* O26 group, for the first time a simultaneous presence of the lpfA_{O157/O1-141}, lpfA_{O157/O1-154} and lpfA_{O113} was noted.

Keywords: virulence markers, STEC, PCR, beef

Shigatoksyczne szczepy *Escherichia coli* (STEC) zostały zidentyfikowane jako groźny czynnik zakażeń pokarmowych u ludzi na początku lat osiemdziesiątych XX w. Do chwili obecnej stwierdzono ponad 400 serotypów STEC, przy czym około 100 z nich izolowano z przypadków chorobowych u ludzi. Materiał genetyczny szczepów STEC zawiera geny zlokalizowane w obrębie chromosomu oraz plazmidów, których produkty odgrywają szereg funkcji w patogenezie krwotocznego zapalenia okrężnicy (HC), hemolitycznego zespołu mocznicowego (HUS) i małopłytkowej plamicy zakrzepowej (TTP) poprzez wytwarzanie i uwalnianie substancji toksycznych oraz elementów biorących udział w adhezji bakterii do komórek nabłonkowych. Najważniejszym czynnikiem patogenności szczepów STEC jest toksyna Shiga (Stx), kodowana przez gen stx i występująca w dwóch podstawowych odmianach: Stx1 oraz Stx2. Ta ostatnia została podzielona na warianty oznaczone jako Stx2c, Stx2d,

Stx2f i Stx2e, różniące się toksycznością w odniesieniu do poszczególnych linii komórkowych *in vitro* (16). Do grupy chromosomalnych czynników patogenności zalicza się również markery zlokalizowane w odcinku DNA o masie 35-43 kDa, określonym terminem „locus of enterocyte effacement” (LEE): eaeA, tir oraz odcinki DNA kodujące białka regulatorowe. Intymina, determinowana przez gen eaeA warunkuje przyczepność *E. coli* do nabłonka jelitowego oraz odpowiada za wystąpienie szeregu zmian histopatologicznych określanych jako attaching-effacing (A-E). Występuje w szeregu wariantach, z których klinicznie najważniejsze znaczenie mają odmiany oznaczone jako β i γ (15). W piśmiennictwie opisano również produkty genów iha, efa1 oraz lpfA, których rola w patogenezie HC, HUS i TTP nie jest jednoznacznie wyjaśniona (22, 23). Białko Iha, kodowane przez gen iha, wykazuje homologię do IrgA, proteiny o masie 67-kDa występującej u *Vibrio cholerae*. Czynnikiem ten bierze udział w przyleganiu *E. coli* O157:H7 do komórek linii HeLa (20). U większości STEC nie-O157 stwierdza się gen efa1, zlokalizowany w wyspie patogen-

*) Badania wykonane w ramach projektu nr 2P06K03427 finansowanego przez MNiSzW w Zakładzie Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego PIWet-BIP; kierownik projektu: prof. dr hab. Jacek Osek.

ności oznaczonej jako PAI O#122. Produkt genu efa1 bierze udział w przyleganiu STEC do komórek linii CHO (5). W adhezji STEC do komórek nabłonka jelitowego dużą rolę mogą pełnić fimbrie LPF stwierdzone po raz pierwszy u bakterii z rodzaju *Salmonella*, a u pałeczek *E. coli* opisane szczegółowo w ostatnich latach. Czynniki adhezyjne kodowane przez geny *lpfA*_{O157/O1-141} oraz *lpfA*_{O157/O1-154}, związane są z grupą serologiczną O157, zarówno u szczepów *E. coli* O157:H7, jak również u O157:H-, natomiast *lpfA*_{O113} koduje fimbrie adhezyjne *E. coli* O113 (2, 22, 23).

U wszystkich *E. coli* O157:H7 oraz wielu bakterii innych serotypów należących do STEC zidentyfikowano plazmid pO157 zawierający geny *ehlyA*, *katP*, *toxB*, oraz inne, kodujące ok. 35 białek o różnych funkcjach. Za ekspresję enterohemolizyny odpowiedzialny jest gen *ehlyA* o wielkości 3,4 kb (7). W 1996 r. stwierdzono w plazmidzie pO157 obecność genu o wielkości 2,2 kb, który oznaczono jako *katP* (P od plazmid) (1). Gen ten determinuje wytwarzanie przez *E. coli* O157 enzymu o podwójnej aktywności – katalazy i peroksydazy. Stwierdzono, że posiada on zdolność przemieszczania się przez błony komórkowe, jednak rola tego białka w patogenezie schorzeń wywołanych szczepami STEC nie jest ustalona (16). Produkt genu *toxB*, tj. białko ToxB, bierze udział w kolonizacji nabłonka jelitowego gospodarza, wpływając na system wydzielniczy typu III oraz działa hamująco na odpowiedź immunologiczną typu komórkowego (9). W 2001 r. odkryto białko Saa o właściwościach autoaglutyniny, kodowane przez plazmidowy gen *saa* szczepu *E. coli* O113:H21, odpowiedzialne za wystąpienie HUS podczas epidemii w Australii. Produkt genu *saa* wykazuje podobieństwo na poziomie 24% i 27% z adhezyjnym białkiem YaDA (*Yersinia Adhesion Protein*) występującym u *Yersinia enterocolitica* i EiBD (*E. coli* Immunoglobulin-Binding Protein) (17).

Celem badań była charakterystyka wybranych markerów patogenności STEC występujących w surowej wołowinie przy użyciu testów PCR.

Materiał i metody

Szczepy bakteryjne. Do badań użyto 16 izolatów, które na podstawie obecności genów kodujących toksynę Shiga, zaliczono do grupy STEC. Kolonie bakteryjne wyosobniono po przebadaniu 272 próbek wołowiny przy użyciu hybrydyzacji z sondą molekularną znakowaną digoksygeniną (25). Profil genotypowy tych drobnoustrojów, wykonany przy użyciu testów multiplex PCR, przedstawiono w tab. 1.

Matrycowy DNA. Materiał pobierano z hodowli wyrosłych

na agarze i zawieszano w 50 µl jałowej wody redestylowanej, zawiesinę ogrzewano w temp. 99°C przez 10 min., schładzano w lodzie przez 20 min. i wirowano (13 000 × g, 1 min.). Otrzymany supernatant stanowił źródło matrycowego DNA.

Testy PCR. W badaniach uwzględniono następujące markery patogenności STEC: *stx2c*, *stx2d*, *stx2f*, *stx2e*, *katP*, *iha*, *toxB*, *efa1*, *saa*, *lpfA*_{O113}, *lpfA*_{O157/O1-141}, *lpfA*_{O157/O1-154}, *eaeβ* oraz *eaeγ*. Ich identyfikację wykonywano w mieszaninie PCR składającej się z matrycowego DNA, 5 µl buforu enzymatycznego, MgCl₂, 5 µl nukleotydów dNTP (dATP, dCTP, dGTP i dTTP w koncentracji 200 µM), 1 U termostabilnej polimerazy Taq (Fermentas, Litwa), starterów oligonukleotydowych (IBB PAN, Polska) oraz wody, dodanej do końcowej objętości 50 µl. Charakterystykę oraz sekwencje nukleotydowe starterów przedstawiono w tab. 2. Reakcję amplifikacji wykonywano w termocyklerze PTM-100 (MJ Research, USA), używając parametrów przedstawionych w tab. 3. Analizę elektroforetyczną produktów amplifikacji genowej wykonywano w 1,5% żelu agarozowym (Agarose type I: low EEO, Sigma) w buforze TAE przy napięciu 100 V (HE33, Hoefer Scientific Instruments, USA). Żele barwiono bromkiem etydydy (Sigma) (5 µg/ml) przez 2 min. i fotografowano w świetle UV przy użyciu zestawu Gel-Doc 2000 (Bio-Rad).

Wyniki i omówienie

Identyfikację genów kodujących wytwarzanie odmian toksyny Shiga 2 (geny *stx*_{2c}, *stx*_{2d}, *stx*_{2e} oraz *stx*_{2f}) wykonano testem PCR wyłącznie w odniesieniu do izolatów, u których obecny był gen *stx*₂ (tab. 1, tab. 4). Marker toksyny Stx2d stwierdzono łącznie u 13 z 15

Tab. 1. Profil genotypowy izolatów STEC uzyskanych z próbek wołowiny

Nr izolatu	Profil genotypowy								
	<i>rfbO157</i>	<i>fliCH7</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>O26wzx</i>	<i>rfbO111</i>	<i>rfbO113</i>	<i>ehlyA</i>	<i>eaeA</i>
1	+	+	+	+		n.b.		+	+
2	+	+	+	+		n.b.		+	+
3	-	-	+	+	-	-	-	+	-
4	-	-	-	+	-	-	-	+	-
5	+	+	+	+		n.b.		+	+
6	-	-	+	-	+	-	-	+	+
7	-	-	-	+	-	-	-	+	-
8	+	+	+	+		n.b.		+	+
9	+	+	+	+		n.b.		+	+
10	+	+	+	+		n.b.		+	+
11	+	+	+	+		n.b.		+	+
12	-	-	-	+	+	-	-	+	+
13	-	-	+	+	-	-	-	+	-
14	-	-	+	+	-	-	-	+	-
15	-	-	-	+	+	-	-	+	+
16	+	+	+	+		n.b.		+	+

Objaśnienie: n.b. – nie badano ze względu na obecność genu *rfbO157*, świadczącego o przynależności do *E. coli* O:157

Tab. 2. Charakterystyka oraz koncentracje starterów oligonukleotydowych użytych w testach PCR

Nazwa startera	Sekwencja (5' → 3')	Amplifikowany gen	Amplikon PCR (pz)	Koncentracja w teście PCR (μM)	Piśmiennictwo
Stx2c-a Stx2c-b	GCGGTTTTATTGTCATTAGT AGTACTCTTTCCGGCCACT	stx2c	124	0,1	(26)
Stx2d-a Stx2d-b	GGTAAAATTGAGTTCTCTAAGTAT CAGCAAATCCTGAACCTGAGG	stx2d	175	0,1	(26)
128-1 128-2	GGTAAAATTGAGTTCTCTAAGTAT CAGCAAATCCTGAACCTGAGG	stx2f	428	0,05	(20)
SLT2vB1 SLT2vB2	ATGAAGAAGATGTTTATAGCG TCAGTTAAACTTCACCTGGGC	stx2e	267	0,2	(4)
wkatA wkatB	CTTCCTGTTCTGATTCTTCTGG AACTTATTTCTCGCATCATCCC	katP	2125	0,1	(1)
iha-I iha-II	CAGTTCAGTTTCGCATTACCC GTATGGCTCTGATGCGATG	iha	1305	0,1	(18)
toxB.911F toxB.1468R	ATACCTACCTGCTCTGGATTGA TTCTTACCTGATCTGATGCAGC	toxB	602	0,1	(20)
88T14 88T9	GAGACTGCCAGAGAAAG GGTATTGTTGCATGTTCCAG	efa1	479	0,1	(11)
SAADF SAADR	CGTGATGAACAGGCTATTGC ATGGACATGCCTGTGGCAAC	saa	119	0,2	(16)
lpfO141-F lpfO141-R	CTGCGCATTGCCGTAAC ATTACAGGGGAGATCGTG	lpfA _{0157/01-141}	412	0,2	(19)
O154-FCT O154-RCT	GCAGGTCACCTACAGGGCGGC CTGCGAGTCGGCGTTAGCTG	lpfA _{0157/01-154}	525	0,1	(22)
lpfA-F lpfA-R	ATGAAGCGTAATATTATAG TTATTTCTTATATTCCGAC	lpfA ₀₁₁₃	573	0,5	(2)
SK1 LP4	CCCGAATTCGGCACAAAGCATAAGC CCCGTGATACCAGTACCAATTACGGGTC	eaeβ	2287	0,1	(15)
SK1 LP3	CCCGAATTCGGCACAAAGCATAAGC CCCGAATTCCTATTCTACACAAACCGC	eaeγ	2792	0,1	(15)

Tab. 3. Parametry amplifikacji DNA oraz koncentracje MgCl₂ użyte w testach PCR

Produkt amplifikacji	Koncentracja MgCl ₂ (mM)	Denaturacja wstępna	Przyłączenie Wydłużanie Denaturacja Wydłużanie końcowe				Liczba cykli
			temp. (°C)/czas (min.)				
stx2c	5	94/5	55/1	72/2	94/1	72/5	30
stx2d	5	94/5	55/1	72/2	94/1	72/5	30
stx2f	5	94/5	53/1	72/2	94/1	72/5	30
stx2e	5	94/5	53/1	72/2	94/1	72/5	30
katP	3	94/5	55/1	72/2	94/1	72/5	30
iha	3	94/5	58/1	72/2	94/1	72/5	30
toxB	3	94/5	58/1	72/2	94/1	72/5	30
efa1	3	94/5	58/1	72/2	94/1	72/5	30
saa	3	94/5	58/1	72/2	94/1	72/5	30
lpfA ₀₁₁₃	5	94/5	50/1	72/2	94/1	72/5	30
lpfA _{0157/01-141}	3	94/5	58/1	72/2	94/1	72/5	30
lpfA _{0157/01-154}	3	94/5	58/1	72/2	94/1	72/5	30
eaeβ	2	94/5	55/1	72/2	94/1	72/5	30
eaeγ	2	94/5	48/1	72/2	94/1	72/5	30

badanych izolatów, w tym u 3 (nr 4, 12, 15) z jednoczesną obecnością genu toksyny Stx2c (tab. 4). Te stx_{2d}-dodatnie izolaty należały do *E. coli* O157 (8 szczepów), O26 (2 szczepy) lub też były o nieoznaczonej grupie O (3 szczepy). Stwierdzone w obecnej pracy jednoczesne występowanie wariantów stx_{2c} i stx_{2d} u szczepów STEC izolowanych z żywności, jest pierwszym doniesieniem tego typu. Badania Oska (13) przeprowadzone na 25 STEC wyosobnionych od cieląt i ludzi wykazały, że u dwóch szczepów nie należących do grupy O157 obecne były geny stx_{2c} i stx₁, a u jednego izolatu rfbO157-dodatniego stx₂ i stx_{2d}. W kolejnych badaniach Oska i Weinera (14), dotyczących 28 STEC pochodzących od ludzi, cieląt i świń, wykazano jednoczesną obecność genów stx₂ i stx_{2d} u jednego, a stx₁ i stx_{2c} u dwóch szczepów *E. coli*. Natomiast w publikacji Wanga i wsp. (24) stwierdzono u STEC pochodzących z różnych źródeł następujące profile genotypowe toksyny Shiga: stx₁ oraz stx_{2c} (n = 2), stx₁ i stx_{2d} (n = 3), stx₂ i stx_{2c} (n = 27), wyłącznie stx_{2c} (n = 10) oraz stx_{2d} (n = 1). Odmienne wyniki uzyskano w innych badaniach nad STEC wyosobnionymi od ludzi. U 42% izolatów występowały geny stx₂ i stx_{2c}, u 21% stx₂,

Tab. 4. Charakterystyka genotypowa izolatów STEC uzyskanych z próbek wołowiny

Nr izolatu	Marker patogenności													
	stx _{2c}	stx _{2d}	stx _{2e}	stx _{2f}	katP	iha	toxB	efa1	saa	lpfA _{O157/O1-141}	lpfA _{O157/O1-154}	lpfA _{O113}	eae β	eae γ
1	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
2	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
3	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	n.b.**	
4	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	n.b.**	
5	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
6	n.b.*				+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
7	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	n.b.**	
8	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
9	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
10	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
11	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
12	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-
13	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	n.b.**	
14	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	n.b.**	
15	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
16	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+

Objaśnienie: n.b. – nie badano; * – (stx₂-ujemny); ** – (eaeA-ujemny)

u 16% stx₁, a u 5% stx_{2d}. Ponadto stwierdzono różnice pomiędzy profilami toksyn STEC O157 oraz nie-O157 STEC. Jednoczesne występowanie stx₂ i stx_{2c} wykazano u 64%, a gen stx₁ u 1% *E. coli* O157, natomiast markery stx₂ i stx_{2c} u 2%, a stx₁ u 89% izolatów nie-O157 (3).

U żadnego z badanych izolatów STEC nie stwierdzono genu stx_{2f} kodującego toksynę Stx_{2f}, jak również genu stx_{2e}, determinującego Stx_{2e} (tab. 4). Te odmiany Stx wykazywane były przede wszystkim u *E. coli* pochodzących od ptaków (Stx_{2f}) oraz świń (Stx_{2e}) (4, 18), sporadycznie tylko wykrywano je u izolatów klinicznych od ludzi i cieląt (3, 24). W badaniach Tatarczak i wsp. (21) wariant stx_{2f} występował u *E. coli* O:-H18 i O:-H-, natomiast stx_{2e} u szczepów należących do serotypów O157:H-, O138:K81 oraz O138:K82 izolowanych od prosiąt, a Wang i wsp. (24) wykazali stx_{2e} u szczepu O139:K82, a stx_{2f} u *E. coli* O128:K12. Gen kodujący odmianę stx_{2e} zidentyfikowano testem PCR również u *E. coli* wyosobnionych z trzech próbek mięsa wieprzowego, jednak nie wykazano go w badaniach dotyczących wołowiny (10).

W niniejszych badaniach geny toxB i efa1 stwierdzono u wszystkich wyosobnionych izolatów O157:H7 oraz jednego grupy O26 (tab. 4). Tatarczak i wsp. (21) zidentyfikowali te markery u STEC O157:H7 pochodzących z żywności, jak również u *E. coli* serotypów O26:H- i O111:H-, uzyskanych od ludzi i bydła. Obecność efa1 stwierdzono wśród 14 z 18 STEC O157:H7 oraz u szczepów grup O26 i O111, zarówno pochodzenia bydłowego, jak i ludzkiego (19). Z drugiej strony, inni autorzy (5) wykazali, że szczepy należące do serotypu O157:H7 nie posiadały genu efa1, który obec-

ny był jednak u wszystkich *E. coli* O26, O111 oraz O118. Toma i wsp. (22) zaobserwowali ścisłą współzależność pomiędzy obecnością toxB a markerem intyminowym u szczepów *E. coli* O157:H7, co znalazło potwierdzenie również w badaniach własnych. Z drugiej strony, w obecnej pracy, w przypadku dwóch izolatów *E. coli* O26 posiadających gen eaeA, nie stwierdzono obecności markera toxB (tab. 1; tab. 4).

Gen katP, kodujący wytwarzanie enzymu o podwójnej aktywności – katalazy – peroksydazy, wykazano w przypadku ośmiu izolatów należących do serotypu O157:H7 oraz jednego O26 (tab. 4). Obecność katP stwierdzili też Khan i wsp. (6) u siedmiu z trzydziestu badanych STEC, dwóch pochodzenia ludzkiego, czterech zwierzęcego i jednego izolowanego z wołowiny. Ten ostatni należał do serotypu O172:NM, posiadał geny obu odmian Stx oraz enterohemolizyny, natomiast nie występował u niego gen intyminy. Według tych autorów, współwystępowanie katP i ehlyA wynikało z obecności obu genów w obrębie tego samego plazmidu pO157. W innych badaniach (26) katP oraz ehlyA wykazano u 33 z 55 STEC grupy O26 pochodzących z przypadków klinicznych u ludzi.

Gen iha, kodujący białko Iha, obecny był u 15 z 16 użytych w niniejszych badaniach izolatów STEC, w tym *E. coli* O157:H7 i O26 i stanowił najczęściej występujący po enterohemolizynie i Stx2 marker patogenności (tab. 4). Wyniki te zbliżone są do rezultatów innych autorów (21, 22), którzy wykazali iha u wszystkich *E. coli* O157:H7 pochodzących od ludzi, bydła oraz z żywności, jak również w przypadku *E. coli* O26 izolowanych od ludzi.

Plazmidowy gen *saa* w obecnych badaniach stwierdzono u 5 izolatów nie należących do serotypu O157:H7 ani O26:H11 (tab. 4). Rezultat ten podobny jest do wyników badań Tatarczak i wsp. (21), którzy nie zidentyfikowali tego markera u żadnego ze zbadanych STEC grup O157 i O26. Według tych autorów, gen *saa* występował jednak u szczepu O55:H9 pochodzenia zwierzęcego, jak również obecny był u STEC O113:H21 izolowanego od ludzi. Podobnie, nie wykazano *saa* w przypadku *E. coli* O157:H7 oraz O26:H11, jednak stwierdzono go u szczepów *E. coli* O113:H21, O174:H21 oraz O8:H19 (22). Lucchesi i wsp. (8) zbadali 132 szczepy wyizolowane od cieląt oraz 32 z próbek wołowiny i wykazali *saa* wyłącznie u izolatów *eaeA*-ujemnych. Według nich, w większości przypadków obecność markera *saa* związana była z występowaniem genu *ehlyA*, ze względu na ich lokalizację w obrębie jednego plazmidu. Znalazło to potwierdzenie w badaniach własnych, w których wszystkie *saa*-dodatnie izolaty posiadały także gen *ehlyA*, kodujący wytwarzanie enterohemolizyny. Z drugiej strony, Zweifel i wsp. (27) stwierdzili *saa* u 7 z 42 badanych STEC, przy czym 4 izolaty *saa*-dodatnie nie posiadały genu enterohemolizyny.

W obecnych badaniach marker $lpfA_{O157/O1-141}$ występował u wszystkich izolatów *E. coli* serotypu O157:H7, dwóch należących do grupy O26 oraz u 3 innych STEC (tab. 4). Gen ten zidentyfikowali również we wcześniejszych badaniach Tatarczak i wsp. (21) wśród szczepów O157:H7, izolowanych zarówno od ludzi, jak i z żywności. Z drugiej strony autorzy ci u żadnego z badanych *E. coli* grupy serologicznej O26, pochodzących od ludzi, testem PCR nie uzyskali amplikonu charakterystycznego dla tego markera.

Gen $lpfA_{O157/O1-154}$ występował u wszystkich *E. coli* O157:H7, jak również u jednego szczepu grupy O26 (tab. 4). Wyniki niniejszych badań zbliżone są do rezultatów innych badaczy (22), którzy stwierdzili $lpfA_{O157/O1-154}$ również u wszystkich *E. coli* O157. Według badań Tatarczak i wsp. (21), $lpfA_{O157/O1-154}$ obecny był także wśród O157:H7 izolowanych od ludzi oraz z żywności, ale nie wystąpił u badanych szczepów grup O26, O111 oraz O113. Szczegółowa analiza wyników własnych wykazała, że wszystkie STEC $lpfA_{O157/O1-154}$ -dodatnie posiadały jednocześnie gen $lpfA_{O157/O1-141}$. Z drugiej strony, występujący łącznie u 13 badanych STEC marker $lpfA_{O157/O1-141}$ obecny był u $lpfA_{O157/O1-154}$ -dodatnich izolatów należących do grupy O157:H7 oraz jednego z grupy O26. Tatarczak i wsp. (21) stwierdzili równoczesne występowanie $lpfA_{O157/O1-154}$ i $lpfA_{O157/O1-141}$ u dwunastu STEC O157:H7, w tym sześciu wyizolowanych z próbek żywności.

W badaniach własnych u żadnego z ocenianych izolatów *E. coli* O157:H7 nie wykazano genu $lpfA_{O113}$, który obecny był u pozostałych STEC, w tym *E. coli* O26 (tab. 4). Z badań Oska i wsp. (12) wynika, że $lpfA_{O113}$ występował u 38 szczepów STEC należących do serotypu O157:H- pochodzących od świń, trzech

E. coli O157:H- pochodzących od cieląt oraz 4 *E. coli* O26, natomiast nie stwierdzono tego markera patogenności u *E. coli* O157:H7.

W obecnych badaniach analiza zależności między genami $lpfA_{O113}$ i $lpfA_{O157/O1-154}$ wykazała, że u 15 wyizolowanych STEC występował tylko jeden z tych markerów. Z drugiej strony, stwierdzona przez Tatarczak i wsp. (21) jednoczesna obecność $lpfA_{O157/O1-154}$ oraz $lpfA_{O113}$ dotyczyła jednak wyłącznie szczepów *E. coli* O157:H- izolowanych od świń.

Inaczej przedstawiały się zależności wykazane w badaniach własnych pomiędzy $lpfA_{O113}$ a $lpfA_{O157/O1-141}$. Geny te występowały u pięciu szczepów *E. coli*, dwóch należących do grupy O26, a trzech o nieokreślonej grupie O. U żadnego ze szczepów należących do serotypu O157:H7 nie zaobserwowano współwystępowania tych markerów, co stanowi potwierdzenie wyników badań innych autorów (21). Z drugiej strony, w obecnych badaniach jeden z wyizolowanych z wołowiny szczepów O26 posiadał wszystkie analizowane geny *lpfA*. Jest to pierwsze doniesienie na temat równoczesnego występowania markerów $lpfA_{O157/O1-154}$, $lpfA_{O157/O1-141}$ oraz $lpfA_{O113}$.

Szczepy *eaeA*-dodatnie różnicowano amplifikując geny *eaeβ* i *eaeγ*, odpowiadające odmianom intyminy β i γ. Intymina γ, według danych piśmiennictwa, występuje u shigatoksynicznych *E. coli* grup serologicznych O157, O111, O145 oraz O113, natomiast intymina β stwierdzana jest zwykle u szczepów EPEC i STEC, przede wszystkim grupy O26 (15). W prezentowanych badaniach wszystkie *eaeA*-dodatnie *E. coli* należące do serotypu O157:H7 posiadały gen kodujący intyminę γ (*eaeγ*). Pozostałe szczepy, zaliczone do grupy O26, miały zdolność wytwarzania intyminy β (tab. 4). Wyniki niniejszych badań zgodne są z rezultatami Tatarczak i wsp. (21), którzy gen intyminy γ wykazali u wszystkich *E. coli* O157:H7, a marker intyminy β u *E. coli* O26. Podobnie Osek (13) stwierdził, że wśród *E. coli* O157:H7 wyizolowanych od ludzi i cieląt występował gen intyminy γ, natomiast u szczepów *E. coli* O26 marker intyminy β. Te *eaeβ*-dodatnie izolaty posiadały wyłącznie zdolność wytwarzania toksyny Stx1. W niniejszych badaniach wykazano natomiast, że wśród trzech szczepów O26 *eaeβ*-dodatnich, tylko u jednego obecny był gen *stx*₁, natomiast u pozostałych marker *stx*₂ (tab. 1; tab. 4).

Reasumując, w przeprowadzonych badaniach poddano analizie 16 izolatów STEC pochodzących z surowej wołowiny i określono u nich występowanie łącznie 14 markerów patogenności, zarówno pochodzenia chromosomalnego, jak i plazmidowego. Jeden z wyizolowanych z wołowiny szczepów O26 posiadał wszystkie analizowane geny *lpfA*: $lpfA_{O157/O1-154}$, $lpfA_{O157/O1-141}$ oraz $lpfA_{O113}$. Ponadto stwierdzone jednoczesne występowanie wariantów *stx*_{2c} i *stx*_{2d} u szczepów STEC izolowanych z żywności, jest pierwszą informacją na ten temat. Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do bliższego poznania tych drobno-

ustrojów oraz pozwalają na określenie zależności pomiędzy poszczególnymi czynnikami patogenności STEC.

Piśmiennictwo

1. Brunder W., Schmidt H., Karch H.: KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* 1996, 142, 3305-3315.
2. Doughty S., Sloan J., Bennett-Wood V., Robertson M., Robins-Browne R. M., Hartland E. L.: Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 2002, 70, 6761-6769.
3. Eklund M., Leino K., Siitonen A.: Clinical *Escherichia coli* strains carrying stx genes: stx variants and stx-positive virulence profiles. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 4585-4593.
4. Imberechts H., de Greve H., Lintermans P.: The pathogenesis of edema disease in pigs. A review. *Vet. Microbiol.* 1992, 31, 221-233.
5. Janka A., Bielaszewska M., Dobrindt U., Karch H.: Identification and distribution of the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* factor for adherence (efa1) gene in sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-. *Int. J. Med. Microbiol.* 2002, 292, 207-214.
6. Khan A., Yamasaki S., Sato T., Ramamurthy T., Pal A., Datta S., Chowdhury N. R., Sas S. C., Sikdar A., Tsukamoto T., Bhattacharya S. K., Takeda Y., Nair G. B.: Prevalence and genetic profiling of virulence determinants of non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* isolated from cattle, beef, and humans, Calcutta, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2002, 8, 54-61.
7. Levine M. M.: *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohaemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 1987, 155, 377-389.
8. Lucchesi P. M. A., Kruger A., Parma A. E.: Distribution of saa variants in verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and food. *Res. Microbiol.* 2006, 157, 263-266.
9. Morabito S., Tozzoli R., Oswald E., Caprioli A.: A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*. *Infect. Immun.* 2003, 71, 3343-3348.
10. Nawrotek P.: Wykorzystanie metody PCR-RFLP do wykrywania i różnicowania shigatoksycznych szczepów *Escherichia coli* na podstawie analizy genów slt. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 35-39.
11. Nicholls L., Grant T. H., Robins-Browne R. M.: Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 2000, 35, 275-288.
12. Osek J.: Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. *J. Appl. Microbiol.* 2003, 95, 1217-1225.
13. Osek J.: Genetic identification of virulence markers in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2001, 45, 47-42.
14. Osek J., Weiner M.: Opracowanie testów multiplex PCR do identyfikacji odmian toksyny Shiga wytwarzanych przez *Escherichia coli*. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 207-210.
15. Oswald E., Schmidt H., Morabito S., Karch H., Marches O., Caprioli A.: Typing of intimin genes in human and animal enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect. Immun.* 2000, 68, 64-71.
16. Paton A. W., Paton J. C.: Direct detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA, and saa. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 271-274.
17. Paton A. W., Srimanote P., Woodrow M. C., Paton J. C.: Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect. Immun.* 2001, 69, 6999-7009.
18. Schmidt H., Zhang W. L., Hemmrich U., Jelacic S., Brunder W., Tarr P. I., Dobrindt U., Hacker J., Karch H.: Identification and characterization of a novel genomic island integrated at selC in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 2001, 69, 6863-6873.
19. Szalo I. M., Goffaux F., Pirson V., Pierard D., Ball H., Maimil J.: Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesions of human EHEC strains. *Res. Microbiol.* 2002, 53, 653-658.
20. Tarr P. I., Bilge S. S., Vary J. C., Jelacic S., Habeeb R. L., Ward T. R., Baylor M. R., Besser T. E.: Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect. Immun.* 2000, 68, 1400-1407.
21. Tatarczak M., Wieczorek K., Posse B., Osek J.: Identification of putative adhesin genes in shigatoksigenic *Escherichia coli* isolated from different sources. *Vet. Microbiol.* 2005, 110, 77-85.
22. Toma C., Espinosa E. M., Song T., Miliwebsky E., Chinen I., Iyoda S., Iwanaga M., Rivas M.: Distribution of putative adhesions in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 4937-4946.
23. Torres A. G., Giron J. A., Perna N. T., Burland V., Blattner F. R., Avelino-Flores F., Kaper J. B.: Identification and characterization of Ipf_{ABCCDE}, a fimbrial operon of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 2002, 70, 5416-5427.
24. Wang G., Clark C., Rodgers G.: Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 3613-3619.
25. Weiner M.: Identyfikacja i charakterystyka shigatoksycznych szczepów *Escherichia coli* występujących w surowej wołowinie przy użyciu sondy molekularnej oraz multiplex PCR. *Medycyna Wet.* (wysłane do redakcji).
26. Zhang W. L., Kohler B., Oswald E., Beutin L., Karch H., Morabito S., Caprioli A., Suerbaum S., Schmidt H.: Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 4486-4492.
27. Zweifel C., Schumacher S., Blanco M., Blanco J. E., Tasara T., Blanco J., Stephan R.: Phenotypic and genotypic characteristics of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from Swiss cattle. *Vet. Microbiol.* 2005, 105, 37-45.

Adres autora: dr Marcin Weiner, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: mpweiner@piwet.pulawy.pl