

ODKRIVANJE NEKATERIH GENOV, POVEZANIH Z VIRULENCO, PRI SEVIH *E. coli*, KI POVZROČAJO ČREVESNE OKUŽBE DETECTION OF SOME VIRULENCE RELATED GENES OF DIARRHEAGENIC *E. coli* STRAINS

Marija Trkov¹, Ingrid Berce², Darja Dovečar¹, Eva Grilc¹, Marina Bujko¹, Alenka Kraigher¹

Prispelo: 1. 10. 2007 – Sprejeto: 16. 1. 2008

Izvirni znanstveni članek
UDK 616.9

Izvleček

Namen dela: Odkrivanje virulentnih dejavnikov *E. coli* omogoča boljše poznavanje bolezni, ki jo povzročajo. Zato smo preiskali določeno število sevov *E. coli*, osamljenih iz vzorcev iztrebkov bolnikov, na prisotnost nekaterih genov, povezanih z virulenco teh bakterij in ugotavljali sposobnost izdelave verocitotoksinov VT1 in VT2. Preiskovane seve so osamili v letu 2006 v ljubljanski in novogoriški regiji.

Metode: Z metodo »multipli« PCR (mPCR) smo odkrivali naslednjih šest genov, povezanih z virulenco *E. coli*: *ipaH*, *eltA*, *estA*, *eae*, *vtx1* in *vtx2*. Sposobnost izdelave verocitotoksinov VT1 in VT2 smo ugotavljali z reverzno pasivno aglutinacijo lateksa.

Rezultati: Pri šestih od 42 preiskovanih sevov *E. coli* smo našli vsaj en dejavnik, povezan z virulenco. Pri vseh smo ugotovili prisotnost gena za intimin (*eae*), pripadali pa so naslednjim serološkim skupinam: O26, O128, O145 in O157. Pri treh sevih, pri katerih smo ugotovili prisotnost gena za intimin, smo ugotovili tudi prisotnost genov za verotoksine (*vtx1* ali *vtx2*). Dva med njimi sta pripadala serološki skupini O26, eden pa O157. En sev serološke skupine O26 je izdeloval VT1, en sev O26 in en sev O157 pa sta izdelovala VT2. Pri drugih preiskovanih sevih nismo ugotovili sposobnosti izdelovanja omenjenih toksinov. Prisotnosti genov *ipaH*, *eltA* in *estA* nismo ugotovili pri nobenem preiskovanem sevu.

Zaključek: S to raziskavo smo ugotovili, da v novogoriški in ljubljanski regiji kroži dokaj nizko število sevov *E. coli*, ki imajo gene za verocitotoksine oziroma so jih sposobni izdelovati. Za splošno oceno bi bilo potrebno nadaljevati s preiskovanjem večjega števila sevov z različnih področij Slovenije, raziskavo pa bi bilo smiselno razširiti na odkrivanje tudi drugih virulentnih dejavnikov.

Ključne besede: »multipli« PCR, virulentni dejavniki, *Escherichia coli*, črevesne okužbe

Original scientific article
UDC 616.9

Abstract

Aim: Identification of *E. coli* virulence factors improves our understanding of the disease they cause. Different *E. coli* strains isolated from patient stool samples were examined for the presence of some virulence-related genes of these bacteria, and for their ability to produce verocytotoxins VT1 and VT2. The samples were obtained from patients in the Ljubljana and Nova Gorica regions in 2006.

Methods: We used the multiplex PCR (mPCR) method, which allows detection of six different virulence genes, i.e. *ipaH*, *eltA*, *estA*, *eae*, *vtx1* and *vtx2*. The ability to produce verocytotoxins VT1 and VT2 was tested using the reverse passive latex agglutination method.

¹Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Trubarjeva 2, 1000 Ljubljana

²Zavod za zdravstveno varstvo Nova Gorica, Vipavska cesta 13, 5000 Nova Gorica
Kontaktni naslov: e-pošta: marija.trkov@ivz-rs.si

Results: In six of the 42 *E. coli* strains examined, at least one virulence factor was identified. The presence of gene *eae* was confirmed in all six strains belonging to serogroups O26, O128, O145 and O157. Three intimin-positive strains were positive for *vtx1* or *vtx2* genes. Two strains belonged to serogroup O26 and one to serogroup O157. VT1 production was detected in one serogroup O26 strain, while one serogroup O26 strain and one serogroup O157 strain showed the ability to produce VT2. In the rest of the strains tested no verocytotoxin production was detected. All strains examined were negative for the genes *ipaH*, *eltA* and *estA*.

Conclusion: The study showed limited circulation of *E. coli* strains with verocytotoxin genes and of strains able to produce verocytotoxins in the Nova Gorica and Ljubljana regions. In order to get a larger-scale estimate, a larger number of strains from different geographical regions of Slovenia will have to be tested, and research will have to be expanded to include identification of other potential virulence factors.

Key words: multiplex PCR, virulence factors, diarrheagenic *Escherichia coli*

1 Uvod

Bakterije iz rodu *Escherichia*, ki obsega pet vrst, so po Gramu negativne, oksidaza negativne, gibljive ali negibljive palčke. Vrsta *E. coli* je del normalne črevesne flore ljudi in živali. Večina sevov *E. coli* je nepatogenih, ob zmanjšani odpornosti gostitelja, pomanjkljivem imunskem odzivu ali ob vstopu v telesne predele, kjer običajno ni mikrobov, pa lahko povzročajo oportunistične okužbe (1, 2). Zaradi številnih virulentnih dejavnikov lahko nekateri sevi povzročajo različne bolezni, kot so driska, meningitis in okužbe sečil, ki so najpogostejše zunajčrevesne okužbe (3). Seve, ki povzročajo črevesne okužbe, delimo v različne skupine predvsem glede na klinično sliko bolezni, ki jo povzročajo, in specifične virulentne dejavnike. Te skupine so: enteropatogene *E. coli* (EPEC), enterotoksogene *E. coli* (ETEC), enteroinvazivne *E. coli* (EIEC), enteroagregativne *E. coli* (EAggEC), difuzno adherentne *E. coli* (DAEC) in *E. coli*, ki izdelujejo Šigove toksine (STEC) ali verocitotoksine (VTEC). Med slednje sodijo tudi enterohemoragične *E. coli* (EHEC) (4, 2). Enteropatogene *E. coli* (EPEC) povzročajo histopatološke spremembe črevesnega epitela, vendar ne izdelujejo verotoksinov (4, 2). Povzročajo vodeno drisko, ki jo lahko spremljajo vročina, slabost, bruhanje, pomanjkanje teka, dehidracija in izguba telesne teže. Iztrebek lahko vsebuje sluz, vendar je brez krvi (5). Med enteropatogene *E. coli* lahko sodijo naslednje O-serološke skupine O26, O55, O86, O88, O103, O111, O114, O119, O125ac O126, O127, O128ab, O142, O145, O157, O158 (2). Verotoksogene *E. coli*

(VTEC) izdelujejo verotoksine VT1 ali VT2, nekateri sevi pa lahko izdelujejo obe skupini verotoksinov. Podobni so Šigovim toksinom, ki jih izdeluje *Shigella dysenteriae* tipa 1 (2). V to skupino sodi nad 100 različnih serotipov, najpogostejše O-serološke skupine pa so O157, O6, O26, O91, O103, O111, O113, O117, O118, O121, O128, O145 (6, 7). Vir so različne, pogosto zdrave domače živali, zlasti govedo. Z iztrebki okuženih živali se širijo v okolje, v vodo, na zelenjavo in sadje (7). Rezultati raziskave iz leta 1997 so pokazali, da je bilo v Sloveniji govedo naravni vir verotoksigenih *E. coli*, saj so jih dokazali v 20,4 % vzorcev rektalnih brisov govedi. Med njimi je bila občasno prisotna *E. coli* O157 (8). Klinični znaki bolezni so vodena, lahko tudi krvava driska, ki jo pogosto spremljajo bolečine v trebuhu, pa tudi slabost, bruhanje in povišana telesna temperatura. Včasih pride zlasti pri otrocih in starejših do nevarnega zapleta, hemolitično uremičnega sindroma (HUS) (6). Enterotoksogene *E. coli* (ETEC) izdelujejo toplotno labilne (LT) ali pa toplotno stabilne (ST) enterotoksine, nekateri sevi pa izdelujejo obe skupini enterotoksinov (9, 2). Klinični znaki bolezni so obilna vodena, včasih pa le blaga driska, krči v trebuhu, lahko vročina, slabost, bruhanje, izguba teka, glavobol, bolečine v mišicah (9). Med enterotoksogene *E. coli* lahko sodijo O6, O8, O25, O78, O153, O128, O86 in druge O-serološke skupine (2). Enteroinvazivne *E. coli* (EIEC) so sorodne šigelam, običajno povzročajo vodeno drisko, včasih dizenterijo in kolitis. Njihova značilnost je, da vstopijo v epitelne celice, se v njih razmnožujejo, potujejo v citoplazmi in prehajajo v sosednje celice (4). Za enteroagregativne *E. coli*

(EAggEC) je značilno, da se na celice črevesne sluznice pritrjujejo v značilnem vzorcu, bakterije se povezujejo tudi med seboj, povzročajo pa dolgotrajno drisko. Izdelujejo nekatere enterotoksine in citotoksine (4).

Pri *E. coli* so virulentni dejavniki, ki povzročajo diarejo, številni in zelo različni, mnogi med njimi se pojavljajo pri različnih skupinah. Njihovo prepoznavanje nam omogoča boljšo diagnostiko bolezni, ki jo povzročajo, kot to omogoča zgolj serološko diagnostično tipiziranje glede na O-somatske antigene. Zato je bil namen naloge preiskati določeno število sevov *E. coli*, ki so jih osamili v letu 2006 iz iztrebkov bolnikov v novogoriški in ljubljanski regiji, na prisotnost nekaterih genov, povezanih z virulenco teh bakterij in ugotavljati sposobnost izdelave verocitotoksinov VT1 in VT2.

2 Materiali in metode

Pridobivanje epidemioloških podatkov: V skladu z Zakonom o nalezljivih boleznih (Ur. l. RS št. 69/1995) in Pravilnikom o prijavi in ukrepih za obvladovanje nalezljivih bolezni (Ur. l. RS št. 16/1999) so zdravniki dolžni prijavljati gastroenterokolitise, ki jih povzroča *E. coli*, v roku treh dni po postavitvi diagnoze. Nalezljive bolezni prijavijo na standardnem obrazcu (Obr. št. 8,163) – Prijava obolenja – smrti za nalezljivo boleznijo. Prijavnice pošljejo na območne zavode za zdravstveno varstvo. Tam jih registrirajo z nacionalnim računalniškim programom Survival 5.00 po ustaljenem postopku.

Bakterijski sevi: V študijo smo vključili 42 sevov *E. coli* različnih O-seroloških skupin, 16 sevov so osamili v Zavodu za zdravstveno varstvo Nova Gorica, 26 sevov pa v Centru za nalezljive bolezni, Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije. Vse seve so osamili iz iztrebkov bolnikov v letu 2006 po klasičnih bakterioloških metodah, O-serološke skupine pa so bile določene po navodilih proizvajalcev antiserumov (Imunološki zavod Zagreb, Hrvaška; Sifin, Nemčija; Statens Serum Institut, Danska).

Pomnoževanje v »multipli« verižni reakciji s polimerazo (mPCR): Tarčno DNK smo pripravili tako, da smo do 10 kolonij *E. coli*, zraslih na trdnem gojišču, suspendirali v 200 µl 10% Chelex-100 (Sigma, ZDA) v 1 x pufru TE. Suspenzijo smo segrevali 5 min pri 100°C, centrifugirali 5 min pri 2200 x g, nato pa 15 µl supernatanta prenesli v 100 µl 1x pufru TE, 8 µl tako redčenega supernatanta smo

uporabili za »multipli PCR«. Z mešanico začetnih oligonukleotidov »DEC Primer Mix« smo, po navodilu proizvajalca (Statens Serum Institut, Danska), ugotavljali prisotnosti naslednjih genov, povezanih z virulenco *E. coli*: *ipaH* (povezan z invazivnostjo), *eltA* (toplotno labilen enterotoksin), *estA* (toplotno stabilen enterotoksin), *eae* (intimin), *vtx1* (verotoksin 1) in *vtx2* (verotoksin 2). Omenjena mešanica je vsebovala tudi začetne oligonukleotide za prepoznavanje dela gena za 16S rDNK (notranja kontrola PCR). Reakcijska mešanica za pomnoževanje v verižni reakciji s polimerazo je poleg tarčne DNK vsebovala še: 5 µl 10x pufru PCR, 3,5 µl 50mM MgCl₂, 8 µl mešanice dNTP (vsakega 1,25 mM) (Applied Biosystems, ZDA), 4 µl mešanice začetnih oligonukleotidov (Statens Serum Institut, Danska), 0,4 µl 5 U/ µl polimeraze DNK Platinum Taq (Invitrogen, ZDA) in 11 µl vode (Sigma, ZDA). Pomnoževanje s PCR je potekalo po naslednji shemi: dveminutni začetni denaturaciji DNK pri 95° C je sledilo 35 ciklov (50 sekundna denaturacija pri 94° C, 40 sekundno prileganje začetnih oligonukleotidov pri 62° C, 50 sekundno podaljševanje pri 72° C) in tri minutno podaljševanje pri 72° C. Za pomnoževanja s PCR smo uporabili ciklični termostat Eppendorf (Nemčija). Ob vsakem pomnoževanju preiskovane DNK smo pomnoževali tudi dve kontrolni mešanici DNK *E. coli*, ki sta vsebovali gene za *eae*, *vtx1* in *vtx2* ter *ipaH*, *eltA* in *estA* (Statens Serum Institut, Danska).

Agarozna gelska elektroforeza: Pomnožke PCR smo pregledovali v 1,5 – 2,0 % 0,5 x TBE (Sigma, ZDA) agaroznih gelih.

Sposobnosti izdelave verotoksinov VT1 in VT2: Pri vseh sevih *E. coli* smo jo ugotavljali z reverzno pasivno aglutinacijo lateksa s testom VTEC – RPLA, po navodilu proizvajalca (Oxoid, Velika Britanija). Preiskovan sev *E. coli* smo nacepili na trdno poševno gojišče BHI (Merck, ZDA) in ga po inkubaciji preko noči pri 37°C, suspendirali v 0,85-odstotni raztopini natrijevega klorida s polimiksinom B. Tako pripravljen vzorec smo inkubirali 30 min pri 37°C in ga nato centrifugirali 20 minut pri 4° C in 4000 obratih/min. Če je bil v supernatantu prisoten verocitotoksin VT1 in / ali VT2, je le-ta aglutiniral z delci lateksa, na katere so vezana specifična protitelesa bodisi za verocitotoksin VT1 bodisi za verocitotoksin VT2. Test smo izvedli na mikrotitrski ploščici, rezultate pa odčitali po inkubaciji preko noči na sobni temperaturi. Prisotnost verocitotoksinov se opazi kot motnost na dnu jamice, če pa ti niso prisotni, je na dnu opazna kompaktna tvorba.

3 Rezultati

V Tabeli 1 so prikazani prijavljeni primeri črevesnih okužb, povzročenih z *E. coli*, po posameznih mesecih od leta 1997 do leta 2006. Največ okužb je bilo v toplejših mesecih leta, predvsem avgusta in septembra, nekoliko manj pa maja, junija in julija. V Sloveniji so *E. coli* na tretjem mestu med bakterijskimi povzročitelji črevesnih nalezljivih bolezni (10).

Zanimala nas je prisotnost virulentnih dejavnikov pri sevih *E. coli*, osamljenih iz iztrebkov bolnikov. Zato smo preiskali 42 sevov, nekateri so bili osamljeni v novogoriški, nekateri pa v ljubljanski regiji, v letu 2006. Pripadali so 15 različnim O-serološkim skupinam, ki so navedene v Tabeli 2. Enega ali več genov, povezanih z virulenco *E. coli*, smo odkrili pri šestih od 42 preiskovanih izoliranih sevov. Pripadali so štirim različnim O-serološkim skupinam in sicer O26, O128, O145 in O157. Preiskali smo pet sevov *E. coli* O26, pri treh smo odkrili gen za intimin (*eae*). Pri dveh sevih, izoliranih v ljubljanski regiji, smo poleg gena za intimin, odkrili še gen za verotoksin, pri enem za verotoksin 1 (*vtx1*), pri enem pa za verotoksin 2 (*vtx2*). Pri obeh sevih smo ugotovili tudi sposobnost

izdelave verotoksinov VT1 oziroma VT2. Pri sevu, ki je imel le gen za intimin (novogoriška regija), sposobnosti izdelave verotoksinov nismo ugotovili. Pri dveh sevih *E. coli* O26 nismo odkrili niti genov, povezanih z virulenco, niti sposobnosti izdelave verotoksinov (Tabela 3). Prisotnost gena za intimin smo ugotovili tudi pri enem od dveh sevov serološke skupine O128, ki sta bila izolirana v novogoriški regiji in enem od treh testiranih sevov O145. Vsi trije sevi so bili izolirani v novogoriški regiji. Verotoksinov VT1 ali VT2 ni izdeloval noben od omenjenih izolatov. Pri enem od dveh preiskovanih sevov O157 smo ugotovili prisotnost genov za intimin in verotoksin 2. Ta sev je tudi izdeloval verotoksin VT2 (Tabela 3), izoliran pa je bil v novogoriški regiji. Pri preostalih 30 testiranih sevih nismo ugotovili niti sposobnosti izdelave verotoksinov VT1 in/ali VT2 niti genov *eae*, *vtx1*, *vtx2*. Prisotnosti genov *ipaH*, *eltA* in *estA* z uporabljeno metodo nismo odkrili pri nobenem od 42 preiskovanih sevov *E. coli*. Slika 1 prikazuje prisotnost preiskovanih genov, ki smo jih našli pri petih sevih *E. coli*, in kontrolni DNK. Glede sposobnosti izdelovanja verotoksinov VT1 in / ali VT2 z metodo RPLA in prisotnosti genov *vtx1* in / ali *vtx2*

Tabela 1. Prijavljeni primeri okužb, povzročenih z *E. coli*, po mesecih v Sloveniji, od leta 1997 do leta 2006.
Table 1. *E. coli* infections notified in Slovenia during the period 1997-2006, by months.

LETO/ MESEC YEAR/ MONTH	JAN	FEB	MAR	APR	MAJ	JUN	JUL	AVG	SEP	OKT	NOV	DEC	SKUPAJ	Incidenca/ 100000 prebivalcev Rate per 100,000 population
1997	0	5	4	4	3	7	12	15	16	13	11	5	95	4,8
1998	5	10	12	16	14	14	20	16	13	13	27	17	177	9,0
1999	20	19	32	30	31	35	19	27	37	32	25	24	331	16,7
2000	22	22	32	10	31	13	19	17	21	17	16	13	233	11,8
2001	21	18	10	17	17	18	16	23	12	12	18	16	198	10,1
2002	14	6	11	9	12	24	18	13	8	19	8	10	152	7,6
2003	12	9	12	24	19	11	14	18	25	11	9	5	169	8,5
2004	17	19	11	8	12	15	14	14	9	14	7	13	153	7,7
2005	9	9	12	4	6	15	13	17	13	9	4	6	117	5,9
2006	6	4	6	8	15	15	6	14	19	12	9	7	121	6,0
SKUPAJ TOTAL	126	121	142	130	160	167	151	174	173	152	134	116	1746	

Tabela 2. Število preiskanih sevov *E. coli* po posameznih O-seroloških skupinah.
 Table 2. The number of *E. coli* strains tested, by O-serogroups.

O-serološka skupina O-serogroup	Število preiskanih sevov No. of strains tested	% preiskanih sevov % of strains tested
O2	5	11,9
O26	5	11,9
O1	4	9,5
O6	4	9,5
O103	4	9,5
O4	3	7,1
O75	3	7,1
O145	3	7,1
O18	2	4,8
O91	2	4,8
O128	2	4,8
O157	2	4,8
O5	1	2,4
O15	1	2,4
O86	1	2,4
Skupaj Total	42	100

z uporabljenim »multiplim« PCR smo pri vseh preiskovanih sevih ugotovili enake rezultate.

4 Razprava

E. coli, ki povzročajo okužbe prebavil, sodijo v različne skupine, predvsem glede na klinično sliko bolezni, ki jo povzročajo, in specifične virulentne dejavnike. Ti so številni in zelo različni. Nekateri so skupni različnim skupinam *E. coli*, ki povzročajo drisko, pa tudi drugim skupinam *E. coli*, ki povzročajo zunajčrevesne okužbe. Zapisi za posamezne virulentne dejavnike so pogosto na mobilnih genetskih elementih, kot so plazmidi in bakteriofagi. Prepoznavanje specifičnih virulentnih

dejavnikov nam omogoča boljšo diagnostiko bolezni, ki jo *E. coli* povzročajo, kot nam to omogoča serološko tipiziranje glede na O-somatske antigene. Zato je bil namen tega dela preiskati seve *E. coli* različnih O-seroloških skupin, ki so jih osamili iz vzorcev iztrebkov bolnikov, na prisotnost nekaterih virulentnih dejavnikov. Uporabljeni »multipli PCR« in mešanica začetnih oligonukleotidov omogočajo odkrivanje šestih genov, *ipaH*, *eltA*, *estA*, *eae*, *vtx1* in *vtx2*, povezanih z virulenco *E. coli*, ki povzročajo diarejo (11). Gen *ipaH* je prisoten pri enteroinvazivnih *E. coli* pa tudi pri nekaterih šigelah. Gena *eltA* in *estA* kodirata toplotno labilni (LT) in toplotno stabilni (ST) enterotoksin enterotoksigenih *E. coli* (ETEC). Te lahko izdelujejo le

Tabela 3. O-serološke skupine, izdelava verotoksinov VT1 / VT2 in prisotnost genov, povezanih z virulenco, pri sevih *E. coli*.

Table 3. O-serogroups, production of VT1/VT2 verocytotoxins and presence of virulence-related genes in *E. coli* strains.

O-serološka skupina O-serogroup	Verotoksin Verocytotoxin		Prisotnost preiskovanih genov Presence of genes tested	O-serološka skupina O-serogroup	Verotoksin Verocytotoxin		Prisotnost preiskovanih genov Presence of genes tested
	VT1	VT2			VT1	VT2	
O1*	-	-	-	O26	-	-	-
O1*	-	-	-	O26	-	-	-
O1*	-	-	-	O26	-	-	eae
O1*	-	-	-	O26*	+	-	eae, vtx1
O2*	-	-	-	O26*	-	+	eae, vtx2
O2*	-	-	-	O75	-	-	-
O2*	-	-	-	O75	-	-	-
O2*	-	-	-	O75	-	-	-
O2*	-	-	-	O86*	-	-	-
O4*	-	-	-	O91	-	-	-
O4*	-	-	-	O91*	-	-	-
O4*	-	-	-	O103	-	-	-
O5*	-	-	-	O103	-	-	-
O6*	-	-	-	O103	-	-	-
O6*	-	-	-	O103*	-	-	-
O6*	-	-	-	O128	-	-	-
O6*	-	-	-	O128	-	-	eae
O15*	-	-	-	O145	-	-	-
O18*	-	-	-	O145	-	-	-
O18*	-	-	-	O145	-	-	eae
O157*	-	-	-	O157	-	+	eae, vtx2

Legenda:

*; sevi, ki so jih osamili v ljubljanski regiji, seve brez oznake so osamili v novogoriški regiji,

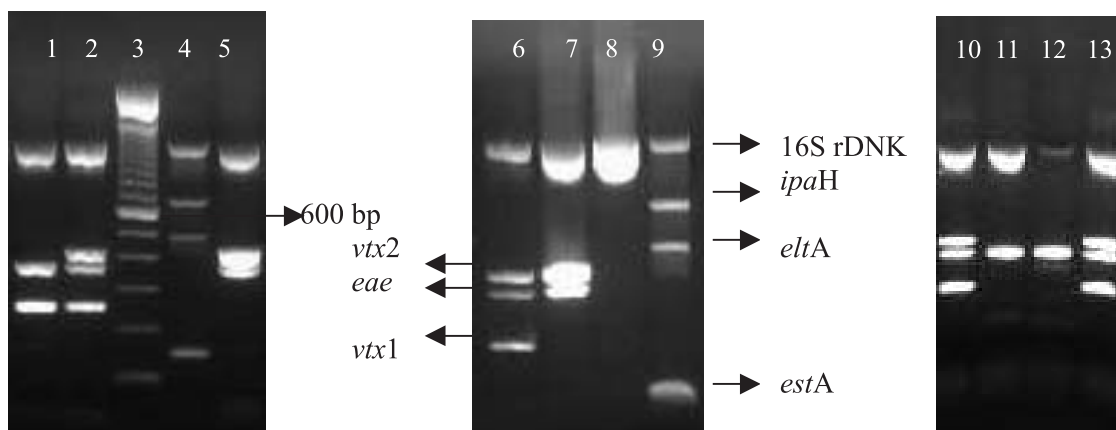
* strains isolated in the Ljubljana region; other strains were isolated in the Nova Gorica region

_; sev ni izdeloval verotoksina, +; sev je izdeloval verotoksin

_; strain unable to produce verocytotoxin, +; verocytotoxin producing strain

_; preiskovani geni, povezani z virulenco *E. coli*, niso bili odkriti

_; the virulence-related genes of *E. coli* tested were not detected



Slika 1. Elektroforeza pomnožkov mPCR: proga 1: sev *E. coli* O26 (*vtx1*, *eae*), proga 2: kontrola 1 (*vtx1*, *eae*, *vtx2*), proga 3: velikostni standard DNK (100 bp, Invitrogen, ZDA), proga 4: kontrola 2 (*estA*, *eltA*, *ipaH*), proga 5: sev *E. coli* O26 (*eae*, *vtx2*), proga 6: kontrola 1 (*vtx1*, *eae*, *vtx2*), proga 7: sev *E. coli* O157 (*eae*, *vtx2*), proga 8: sev *E. coli* O103, proga 9: kontrola 2 (*estA*, *eltA*, *ipaH*), proga 10: kontrola 1 (*vtx1*, *eae*, *vtx2*), proga 11: sev *E. coli* O145 (*eae*), proga 12: sev *E. coli* O128 (*eae*), proga 13: kontrola 1 (*vtx1*, *eae*, *vtx2*).

Figure 1. Electrophoresis of the mPCR products: track 1: *E. coli* O26 (*vtx1*, *eae* strain; track 2: control 1 (*vtx1*, *eae*, *vtx2*)); track 3: DNA size standard (100 bp, Invitrogen, USA); track 4: control 2 (*estA*, *eltA*, *ipaH*), track 5: *E. coli* O26 (*eae*, *vtx2*) strain; track 6: control 1 (*vtx1*, *eae*, *vtx2*), track 7: *E. coli* O157 (*eae*, *vtx2*) strain, track 8: *E. coli* O103 strain; track 9: control 2 (*estA*, *eltA*, *ipaH*); track 10: control 1 (*vtx1*, *eae*, *vtx2*); track 11: *E. coli* O145 (*eae*) strain; track 12: *E. coli* O128 (*eae*) strain; track 13: control 1 (*vtx1*, *eae*, *vtx2*).

enega od obeh ali pa oba enterotoksina (9, 4). Vendar pri nobenem od 42 preiskovanih sevov *E. coli* nismo ugotovili prisotnosti omenjenih genov, čeprav so nekateri pripadali O-serološkimi skupinam, ki lahko sodijo med enterotoksigeno *E. coli* (2). Sevi EIEC in ETEC so v industrijsko razvitih državah redkeje prisotni (12), nasprotno pa so v državah v razvoju zlasti enterotoksigeno *E. coli* pogoste povzročiteljice driske pri majhnih otrocih (9). Gen *eae* nosi zapis za adhezin intimin, ki sodeluje pri pritrjevanju enteropatogenih (EPEC) in nekaterih verotoksigenih *E. coli* na celice epitela črevesne sluznice (12, 5). Ugotovili smo ga pri šestih sevih, ki so pripadali naslednjim O-serološkimi skupinam: O26, O128, O145 in O157. Geni *vtx1* in *vtx2* nosijo zapis za verocitotoksine VT1 in VT2 pri enterohemoragičnih (EHEC) in drugih verotoksigenih *E. coli* (VTEC) (6). Nekateri verotoksigeni sevi izdelujejo le verotoksine 1, nekateri verotoksine 2, nekateri pa obe skupini verotoksinov (13, 6). V študiji, ki so jo izvedli na Irskem in je vključevala 207 sevov VTEC, izoliranih od leta 2002 – 2004, so ugotovili, da je 89 % sevov pripadalo serološki skupini O157, 7,2 % serološki skupini O26, posamezni sevi pa so pripadali serološkimi

skupinam O103, O146, O145 in O111 (14). V naši raziskavi smo ugotovili zapis za verotoksine kakor tudi sposobnost izdelave le-teh pri treh sevih, dva sta pripadala serološki skupini O26, eden pa O157. Vsi trije sevi so izdelovali le eno od obeh skupin verotoksinov, vsi pa so imeli tudi gen za intimin. Večjo verjetnost za nastanek hemolitično-uremičnega sindroma raziskovalci pripisujejo okužbam s sevi *E. coli*, ki so sposobni izdelovati VT2 (6) in imajo gen za intimin (15). V skupino verotoksigenih *E. coli* sodi veliko število različnih serotipov, mnogi med njimi pa so bili izolirani iz kliničnih vzorcev bolnikov s hemolitično-uremičnim sindromom (2). Zato smo v raziskavo vključili tudi seve O-seroloških skupin O1, O2, O4, O5, O15 in O18, saj bi lahko šlo za morebitne verotoksigeno seve (2, 16, 17). Vendar pri nobenem sevu omenjenih O-seroloških skupin nismo ugotovili prisotnosti genov za verotoksine niti sposobnosti za izdelavo le-teh. Za zaključek naj omenimo dve študiji, ki sicer nista povsem primerljivi z našo, a kažeta na pomembnost odkrivanja *E. coli* in prepoznavanja njihovih virulentnih dejavnikov. V študiji, ki so jo izvajali na Danskem od marca 2000 do decembra 2001 in je zajela 424 otrok z drisko, mlajših

od 5 let, so ugotovili prisotnost VTEC v 11 primerih, klasičnih EPEC v 10, EAggEC pa v 11 primerih. Vendar so bile slednje prisotne tudi v kontrolni skupini zdravih ljudi, zato ni nujno, da so povzročile drisko pri bolnikih (18). *E. coli* je bila povzročiteljica driske pri skoraj 30 % od 280 otrok, mlajših od 5 let, ki so bili hospitalizirani od decembra 2005 do februarja 2006 v Tanzaniji. Pri 41 bolnikih so izolirali enteroagregativne *E. coli*, pri 13 enteropatogene, pri 10 enterotoksigene, enterohemoragičnih in enteroinvazivnih sevov pa niso osamili (19).

5 Zaključek

Preiskovani sevi so pripadali 15 različnim O-serološkim skupinam. Pri šestih sevih, ki so pripadali štirim različnim O-serološkim skupinam (O26, O128, O145 in O157), smo našli vsaj en virulentni dejavnik. Prisotnost gena za intimin (*eae*) smo ugotovili pri treh sevih O26, od tega pri dveh sevih tudi gena za *vtx1* ali *vtx2*, pri katerih smo ugotovili tudi sposobnost izdelave verotoksinov VT1 ali VT2. Prisotnost gena *eae* smo ugotovili pri enem sevu O128, ter pri enem sevu O145. Pri enem sevu O157 smo ugotovili prisotnost gena *eae* in *vtx2* ter sposobnost izdelave verotoksina VT2. Genov *ipaH*, *eltA*, *estA* nismo ugotovili pri nobenem preiskovanem sevu *E. coli*. S to študijo smo odkrili, da v novogoriški in ljubljanski regiji kroži dokaj nizko število sevov *E. coli* (3 od 42), ki imajo gene za verocitotoksine oziroma so jih sposobni izdelovati. Za podajo splošne ocene glede prisotnosti virulentnih dejavnikov pri patogenih črevesnih sevih *E. coli* bi bilo potrebno nadaljevati s preiskovanjem večjega števila sevov z različnih področij Slovenije. V raziskovanje bi bilo potrebno vključiti odkrivanje tudi drugih virulentnih dejavnikov, ki so pri patogenih sevih *E. coli* številni in zelo različni.

Literatura

- Koren S, Ihan A, Gubina M. Patogeneza in širjenje bakterijskih okužb. In: Gubina M, Ihan A, editors. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Ljubljana. Medicinski razgledi, 2002: 65-73.
- Scheutz F, Strockbine NA. Escherichia. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM, editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. New York: Springer, 2005: 607-24.
- Andlovic A. Escherichia coli. In: Gubina M, Ihan A, editors. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Ljubljana, Medicinski razgledi, 2002: 65-73.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature reviews, Microbiol 2004; 2: 123-40.
- Blank TE, Nougayrede JP, Donnenberg MS. Enteropathogenic *Escherichia coli*. In: Donnenberg MS, editor. *Escherichia coli*. Virulence mechanisms of a versatile pathogen. San Diego: Academic Press, 2002: 81-118.
- Thorpe CM, Ritchie JM, Acheson DWK. Enterohemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. In: Donnenberg MS, editor. *Escherichia coli*. Virulence mechanisms of a versatile pathogen. San Diego: Academic Press, 2002: 119-54.
- Verocytotoxigenic *Escherichia coli*. In: World Organization for Animal Health: OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). 5th ed., vol II, O.I.E., Paris, 2004: 1127-37.
- Breznik B. Enterohemoragični tipi bakterije *E. coli* pri govedu in toplotno neobdelanih mesninah v Sloveniji. Magistrska naloga. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1997.
- Elsinghorst EA. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. In: Donnenberg MS, editor. *Escherichia coli*. Virulence mechanisms of a versatile pathogen. San Diego: Academic Press, 2002: 155-87.
- Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije. Poročilo o nalezljivih boleznih, 2005: 36-8.
- Persson S, Olsen KE, Scheutz F, Krogfelt KA, Gerner-Smidt P. A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory. Clin Microbiol Infect 2007; 13: 516-24.
- Cleary J, Ali LC, Shaw RK, Straatman-Iwanowska A, Donnenberg S, Frankel G, Knutton S. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. Microbiol 2004; 150: 527-38.
- Reischl U, Youssef MT, Kilwinski J, Lehn N, Zhang WL, Karch H *et al.* Real-time fluorescence PCR assays for detection and characterization of Shiga toxin, intimin, and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 2002; 40: 2555-65.
- Carroll AM, Gibson A, McNamara EB. Laboratory-based surveillance of human verocytotoxigenic *Escherichia coli* infection in the Republic of Ireland, 2002 – 2004. J Med Microbiol 2005; 54:1163-69.
- Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R *et al.* Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. J Clin Microbiol 2003; 41: 4930-40.
- Bettelheim KA. Serotypes of VTEC. Pridobljeno 30.8.2007 s spletne strani: <http://www.microbionet.com.au/vtactable.html>.
- Bopp CA, Brenner FW, Fields PI, Wells JG, Strockbine NA. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White
- Moye SJ, Maselle SY, Matee MI, Langeland N, Mylvaganam H. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania. BMC Infect Dis 2007; 7: 92.