

Beata Magdalena Sobieszkańska<sup>1</sup>, Romuald Gryko<sup>2</sup>, Roman Franiczek<sup>2</sup>,  
Grażyna Gościński<sup>1</sup>, Izabela Grześ<sup>1</sup>

## CHARAKTERYSTYKA VEROTOKSYCZNYCH SZCZEPÓW *ESCHERICHIA COLI*

- 1) Katedra i Zakład Mikrobiologii AM, Wrocław  
Kierownik: prof. dr hab. *Kryspina Grzybek-Hryniewicz*
- 2) Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii Puławy  
Kierownik: prof. dr hab. *Michał Bartoszcze*

*Verotoksyczne szczepy E.coli (VTEC) zajmują obecnie jedną z czołowych pozycji na liście patogenów jelitowych zarówno w krajach Europy, jak i w Ameryce Północnej. Wiele z tych szczepów charakteryzuje: niezdolność do fermentacji sorbitolu, brak enzymu  $\beta$ -glukuronidazy oraz zdolność do produkcji enterohemolizyny. Cechy te zostały wykorzystane w rutynowej diagnostyce zakażeń wywołanych przez VTEC. Celem wykonanych badań była izolacja na podstawie charakterystycznych cech metabolicznych, verotoksycznych szczepów E. coli (VTEC), z kalu chorych na biegunkę a następnie porównanie izolowanych szczepów z referencyjnymi szczepami VTEC.*

### WSTĘP

Nazwa verotoksyczne szczepy *E. coli* – VTEC (verotoxigenic *E. coli*) związana jest z działaniem cytopatycznym jaki mają na komórki linii Vero toksyny wytwarzane przez VTEC – tzw. verotoksyny. Verotoksyny oznaczane są skrótami VT (verotoxins) lub SLT (Shiga-like toxins) – ze względu na duży stopień homologii z toksyną wytwarzaną przez *Shigella dysenteriae* (2, 4).

Większość verotoksycznych szczepów *E. coli* należy do serotypu O157:H7, który posiada charakterystyczne cechy biochemiczne – brak zdolności fermentacji (lub opóźnioną fermentację) sorbitolu oraz brak enzymu  $\beta$ -glukuronidazy (5, 11, 12). W rutynowej diagnostyce zakażeń VTEC wykorzystywane są różne podłoża selektywne wykorzystujące te właściwości (12). Najczęściej jest to podłoże MacConkey'a z sorbitolem zamiast laktozy – SMAC (w Polsce dostępny jest gotowy agar sorbitol – MacConkey firmy – Oxoid). Na podłożu SMAC szczepy sorbitolo-ujemne rosną w postaci szarych kolonii, natomiast sorbitolo-dodatnie w postaci różowych kolonii, podobnie jak laktozo-dodatnie kolonie pałeczek Enterobacteriaceae na podłożu MacConkeya z laktozą. Poza *E. coli* O157 wiele innych pałeczek jelitowych nie wykazuje zdolności fermentacji sorbitolu. Należą do nich: *Proteus* sp., *Providencia*

sp., *Yersinia pseudotuberculosis*, większość szczepów *Shigella sonnei* i *Shigella flexneri*, niektóre szczepy *Kluyvera ascorbata*, *Edwardsiella tarda*, *Enterobacter sakazaki* i *gervoviae*, *Hafnia alvei*. Poza *E. coli* O157, sorbitolo-ujemne są również inne gatunki z rodzaju *Escherichia*: *E. hermanii* oraz *E. vulneris* (9). *E. vulneris* fermentuje malonian, w przeciwieństwie do *E. hermanii* (gatunek ten wytwarza żółty barwnik) i *E. coli* O157. Sorbitolo-ujemne szczepy *E. coli* powinny być przebadane testem lateksowym dla *E. coli* O157 (12). W Polsce, na rynku dostępne są dwa testy lateksowe *E. coli* O157 – firmy Oxoid oraz polski test firmy Biomex. W obu testach reakcje krzyżowe mogą dawać następujące gatunki bakterii: *Escherichia hermanii*, *Salmonella* z grupy N, *Citrobacter freundii* oraz *Yersinia enterocolitica* O9 (9).

Wiele, bo aż 89.9% VTEC ma zdolność produkcji enterohemolizyny (E-Hly) (1, 2, 3). Jest to nowy typ hemolizyny *E. coli*, którą można wykryć tylko na podłożu tryptozowo-sojowym wzbogaconym 5% krwinkami baraniami, płukanymi trzykrotnie w PBS. Enterohemolizyna stanowi bardzo dobry marker epidemiologiczny, szczególnie w przypadku sorbitolo-dodatnich szczepów VTEC np.: *E. coli* O26 lub O111.

Celem pracy była izolacja verotoksycznych szczepów *E. coli* na podstawie ich charakterystycznych cech metabolicznych oraz zdolności do produkcji enterohemolizyny, z próbek kału osób z biegunką a następnie porównanie izolowanych szczepów z referencyjnymi szczepami verotoksycznymi VTEC.

## MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badania było 257 próbek kału pobranych od chorych z biegunką (175 dzieci i 82 dorosłych), leczonych w Klinikach: Pediatrii, Hematologii i Gastroenterologii Akademii Medycznej we Wrocławiu. Z każdej próbki kału wysianej na podłoże MacConkeya izolowano średnio po 20 laktozo-dodatnich kolonii, charakterystycznych dla *E. coli*. Równocześnie ze szczepami izolowanymi od chorych badano 7 referencyjnych, verotoksycznych szczepów *E. coli* otrzymanych z Niemiec, dzięki uprzejmości dr F. Ebla i dr L. Beutina: O26:H11 (H-19); O26:H- (413/89-1); O157:H7 (EDL 933); O111:H- (HUS-2); O126:H6 (E 2348/69); O157:H7 (N); O157:H7 (D).

### 1. Oznaczanie hemolizyn wg Beutin i wsp. i zdolności do fermentacji sorbitolu (3, 7, 12)

Izolowane z badanych materiałów laktozo-dodatnie kolonie bakteryjne oraz referencyjne szczepy VTEC przesiewano na podłoża:

- do wykrywania enterohemolizyny: agar tryptozowo-sojowy z 5% krwinkami baraniami trzykrotnie płukanymi w PBS (pH 7,2) z dodatkiem 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ,
- do oznaczania  $\alpha$ - i/lub  $\beta$ -hemolizyn: agar tryptozowo-sojowy wzbogacony 5% krwią baranią z 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ,
- do określania zdolności fermentacji sorbitolu: agar MacConkeya z sorbitolem zamiast laktozy – SMAC (Oxoid).

Wszystkie podłoża inkubowano 24 godz. w temp. 37°C. Hemolizę odczytywano po 3 i 24 godz. inkubacji. Hemolizujące i sorbitolo-ujemne szczepy różnicowano krótkim, probówkowym szeregiem biochemicznym. Dalsze badania prowadzo-

no tylko na szczepach, które zaszeregowano do rodzaju *Escherichia* oraz na szczepach referencyjnych.

## 2. Wykrywanie $\beta$ -glukuronidazy wg Thompson i wsp. (11)

Wszystkie izolowane z badanych materiałów, hemolizujące oraz niezdolne do fermentacji sorbitolu a także referencyjne szczepy *E. coli* badano w kierunku zdolności do produkcji enzymu  $\beta$ -glukuronidazy. W tym celu przygotowano substrat dla  $\beta$ -glukuronidazy: MUG (4-metylumbelliferyl- $\beta$ -D-glukuronid), rozkładany przez enzym do fluoryzującego produktu. 100 mg odczynnika MUG (Sigma Chemical Co.) rozpuszczono w 100 ml dejonizowanej wody i dodano 2 krople detergentu Triton X-100 (Sigma Chemical Co.). Powstały roztwór po wyjałowieniu przez filtr membranowy (0,45  $\mu$ m) rozporcjowano do szklanych buteleczek z zakraplaczem. Odczynnik przechowywany w temperaturze lodówki (4°C) jest przydatny do użytku przez ponad 6 miesięcy. Reakcję przeprowadzano na 96-dolkowej płytce mikrotitracyjnej. Do odpowiedniej ilości dołków płytki (zależnie od ilości badanych szczepów) nakrapiano po dwie krople odczynnika MUG (przed wykonaniem oznaczenia odczynnik MUG ogrzewano do temp. pokojowej). Do oznaczenia  $\beta$ -glukuronidazy badane szczepy przesiewano na bulion tryptozowo-sojowy i inkubowano w temp. 37°C do następnego dnia. Płynne hodowle odwirowywano (15 min przy 4 tys. rpm/min). Supernatant zlewano i ponownie odwirowywano (15 min przy 15 tys. rpm/min). 1,5 ml uzyskanego supernatantu przenoszono do jałowych probówek Ependorfa i zamrażano w -70°C do czasu badania na linii komórkowej. Osad bakteryjny uzyskany po pierwszym wirowaniu płynnych hodowli bakteryjnych służył do badania obecności enzymu  $\beta$ -glukuronidazy. Osad mieszano z odczynnikiem MUG w dołku płytki testowej, do uzyskania mlecznej zawiesiny. Płytkę inkubowano w temp. 37°C przez 20 min. Dodatni wynik reakcji (zdolność do produkcji  $\beta$ -glukuronidazy) w postaci niebieskiej fluorescencji odczytywano w świetle długofalowej lampy ultrafioletowej (Biometra 3T), w zaciemnionym pokoju. Brak świecenia charakterystyczny jest dla bakterii MUG-ujemnych (nie zdolnych do produkcji  $\beta$ -glukuronidazy).

## 3. Wykrywanie verotoksyn na linii komórkowej Vero wg zmodyfikowanej metody Konowalchuk i wsp. (6)

Hodowlę linii komórkowej Vero na podłożu wzrostowym RPMI z 2% glutaminą i 5% surowicą cielęcą oraz gentamycyną (20  $\mu$ g/ml), trypsynizowano, odwirowywano i po dwukrotnym odpłukaniu, komórki zawieszano w podłożu wzrostowym do gęstości  $2 \times 10^5$  komórek/ml. Zawiesinę komórek (100  $\mu$ l) nakrapiano do dołków płytki mikrotitracyjnej (NUNC) i inkubowano 24 godz. w 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>, w celu uzyskania jednowarstwowej hodowli komórkowej (monolayer). Monolayer komórkowy zakażano supernatantem (10  $\mu$ l) płynnej hodowli badanych i referencyjnych szczepów (każdy szczep nakrapiano do dwóch dołków). Zakażone komórki inkubowano w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>, w 37°C przez 3 dni. Efekt cytopatyczny odczytywano w mikroskopie kontrastowo-fazowym po 24, 48 i 72 godz. w porównaniu z kontrolą ujemną: monolayer komórek Vero z 10  $\mu$ l jałowego bulionu tryptozowo-sojowego. Badanie powtarzano dwukrotnie.

#### 4. Określenie właściwości biochemicznych i lekowrażliwości badanych i referencyjnych szczepów *E. coli*

Izolowane z kału chorych hemolizujące, sorbitolo-ujemne, MUG-ujemne i verotoksyczne szczepy *Escherichia* oraz referencyjne szczepy VTEC oznaczano testami ID GN i ATB GN (bio Merieux) zgodnie z instrukcją producenta.

#### 5. Typowanie serologiczne sorbitolo-ujemnych i verotoksycznych szczepów *E. coli* izolowanych z kału chorych

Hodowle badanych szczepów *E. coli* przesiewano na agar zwykły i inkubowano 18 godz. w 37°C. Typowanie serologiczne przeprowadzono techniką aglutynacji szkiełkowej testem lateksowym dla *E. coli* O157 (Oxoid), a następnie testem lateksowym dla enteropatogennych szczepów *E. coli* (Biomex) zgodnie z instrukcją producenta.

### WYNIKI

Spośród 257 badanych próbek kału od chorych z biegunką z 93 (36,2%) materiałów izolowano 163 hemolizujące szczepy z rodzaju *Escherichia*. W 40 (15,6%) materiałach były to szczepy  $\alpha$ -hemolizujące (wyraźna, przejrzysta strefa hemolizy po 3 godz. inkubacji na podłożach z krwinkami baranymi płukanymi i nie płukanymi), w 51 (19,8%) badanych materiałach obecne były szczepy bakteryjne hemolizujące krwinki po 24 godz. na obu podłożach, a w 2 badanych materiałach stwierdzono obecność szczepów *E. coli* produkujących enterohemolizynę – mętna, mała strefa hemolizy widoczna była tylko na podłożu z krwinkami płukanymi (tab. I). Wśród szczepów hemolizujących (izolowanych z 93 materiałów) były szczepy sorbitolo-dodatnie i sorbitolo-ujemne oraz szczepy rozkładające MUG i nie posiadające  $\beta$ -glukuronidazy. W pozostałych 164 (63,8%) badanych materiałach nie wykazano obecności szczepów należących do rodzaju *Escherichia* sorbitolo-ujemnych i/lub MUG-ujemnych. Izolowane z badanych materiałów sorbitolo-ujemne szczepy nie należące do rodzaju *Escherichia* nie były brane pod uwagę w dalszych badaniach.

W 3 (1,2%) badanych materiałach występowały szczepy *E. coli* hemolizujące, nie fermentujące sorbitolu. Jeden materiał zawierał szczepy  $\alpha$ -hemolizujące, a dwa pozo-

Tabela I. Badane materiały, z których izolowano szczepy wytwarzające hemolizyny i szczepy niehemolizujące.

The studied materials from which hamolisin-producing strains and non-haemolytic strains were isolated

Badana populacja	Liczba materiałów	Szczepy produkujące hemolizyny typu			Szczepy niehemolizujące
		$\alpha$ -hemolizyna	$\beta$ - i/lub enetro-	enetrohemolizyna	
Dorośli	82	8 (9,8%)	17 (20,7%)	0	57 (69,5%)
Dzieci	175	32 (18,3%)	34 (19,4%)	2 (0,8%)	107 (61,2%)
Razem	257	40 (16,6%)	51 (19,8%)	2 (0,8%)	164 (63,8%)

Tabela II. Zdolność rozkładu sorbitolu i MUG oraz rodzaj wytwarzanych hemolizyn przez szczepy z rodzaju *Escherichia* izolowane z 93 badanych materiałów.The ability to decompose sorbitol and MUG and the types of haemolysins produced by *Escherichia* genus strains isolated from 93 tested materials

Liczba materiałów	Hemolizyny			Rozkład sorbitolu		Rozkład MUG	
	$\alpha$ -hemolizyna	$\beta$ - i/lub entero-	entero-	dodatni	ujemny	dodatni	ujemny
36	+			+		+	
3	+			+			+
1	+				+	+	
42		+		+		+	
7		+		+			+
2		+			+	+	
2			+	+		+	
93	40	51	2	90	3	83	10

stałe szczepy  $\beta$ - i/lub enterohemolizujące. W 90 (96,8%) badanych materiałach występowały szczepy sorbitolo-dodatnie i hemolizujące: w 39 materiałach były to szczepy  $\alpha$ -hemolizujące, w 49 materiałach szczepy  $\beta$ - i/lub enterohemolizujące, a w 2 materiałach enterohemolizujące (tab. II). Szczepy *E. coli*  $\beta$ -glukuronidazo-ujemne stwierdzono w 10 (3,9%) z 93 badanych materiałów: w 7 materiałach, z których równocześnie izolowano szczepy hemolizujące po 24 godz. na obu podłożach oraz w 3 materiałach, z których izolowano również szczepy *E. coli*  $\alpha$ -hemolizujące (tab. II). Wszystkie izolowane z 93 próbek kałów szczepy hemolizujące i sorbitolo-ujemne lub dodatnie oraz  $\beta$ -glukuronidazo-ujemne lub dodatnie, na podstawie oznaczenia krótkim szeregiem biochemicznym zaszeregowano do rodzaju *Escherichia*. Oznaczenie metabolizmu badanych hemolizujących sorbitolo-ujemnych szczepów testem ID GN wykazało, że szczepy te należą do gatunku *Escherichia vulneris*. Pozostałe badane szczepy należały do gatunku *E. coli*.

Izolowane z badanych materiałów hemolizujące szczepy bakteryjne oraz szczepy referencyjne przebadano na linii komórkowej Vero. Wszystkie referencyjne szczepy VTEC już po 24 godz. inkubacji z komórkami Vero powodowały silny efekt cytotacyjny (zaokrąglenie większości komórek), a po 3 dobach 100% zakażonych komórek było zaokrąglonych i odklejonych od podłoża. W kontroli ujemnej nawet po 72 godz. komórki tworzyły monolayer i zachowywały swój pierwotny, wydłużony kształt. Tylko w 2 (0,8%) badanych materiałach stwierdzono szczepy które, powodowały efekt cytotacyjny na linii Vero. Izolowane, verotoksyczne szczepy były enterohemolizujące i należały do gatunku *E. coli*. Typowanie serologiczne wykazało przynależność obu szczepów do serotypu O26 (antygeny rzęskowego nie oznaczono). W przypadku pozostałych badanych – hemolizujących szczepów nie obserwowano żadnych zmian w morfologii komórek Vero po trzech dobach.

Dla izolowanych verotoksycznych szczepów *E. coli* O26 oraz referencyjnych szczepów VTEC oznaczono lekowrażliwość (tab. III). Poza nielicznymi wyjątkami, badane szczepy były wrażliwe na testowane antybiotyki. Oporność na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe, tetracykliny oraz chinolony 1 generacji wykazały 3 szczepy referencyjne

Tabela III. Wrażliwość na antybiotyki referencyjnych VTEC oraz 2 izolowanych, werotoksycznych szczepów *E. coli* O26<sub>1</sub>(738) i O26<sub>2</sub>(740).  
Susceptibility to antibiotics of reference VTEC and two isolated verotoxic *E. coli* strains O26<sub>1</sub>(738) i O26<sub>2</sub>(740)

Szczep	O26:H11	O26:H-	O111:H-	O126:H6	O157:H7 EDL 933	O157:H7 N	O157:H7 D	O26 <sub>1</sub> 738	O26 <sub>2</sub> 740
AMO/PENICIL.GR.A	S	I	I	S	R	S	S	S	S
AMOX/ CLAV. AC	S	I	S	S	R	S	S	S	S
TICARCILINA	S	S	S	S	R	S	S	S	S
PIP/UREIDOPEN.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PIPER + TAZOBCTAM	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IMIPENEM	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CFT/CEPHALO. 1 G	S	R	R	S	R	S	S	S	S
CTX/CEPHALO 3 G	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CEFTAZIDIME	S	S	S	S	I	S	S	S	S
CEFTAZIDIME 1	S	S	R	S	R	S	S	S	S
CEFOXITIN	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TOBRAMYCIN	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AMIKACIN	S	S	S	S	S	S	S	S	S
GENTAMICIN	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NETILMICIN	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TET/CYCLINES	S	R	R	S	R	S	S	S	S
NAL/QUINOLONES 1G	S	R	S	S	R	S	S	S	S
PEF/QUINOLONES 2G	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CIPROFLOXACIN	S	S	S	S	S	S	S	S	S
COTRIMOXAZOLES	S	S	S	S	S	S	S	S	S

R – oporny, I – zmniejszona wrażliwość, S – wrażliwy

Tabela IV. Wyniki badań referencyjnych szczepów VTEC  
Results of tests of reference strains

VTEC	O26:H1 H-19	O26:H- 413/891	O126:H6 E 2348/69	O111:H- HUS-2	O157:H7 EDL 933	O157:H7 N	O157:H7 D
Fermentacja sorbitolu	+	+	+	+	-	-	-
Rozkład MUG	+	+	+	+	-	-	-
Typ hemolizyny	E-Hly	E-Hly	E-Hly	E-Hly	β- i/lub entero-	E-Hly	E-Hly

E-Hly – enterohemolizyna, MUG – 4-metylbelliferyl-β-D-glukuronid

VTEC (O26:H-; O157:H7 EDL 933; O111:H-). Izolowane z przypadków biegunki werotoksyczne szczepy *E. coli* O26 oraz pozostałe szczepy referencyjne (O26:H11; O126:H6; 2 szczepy O157:H7-N i D) były wrażliwe na wszystkie testowane antybiotyki. Wyniki badań (rozkład MUG i sorbitolu, typy wytwarzanych hemolizyn) referencyjnych szczepów VTEC przedstawiono w tabeli IV.

## DYSKUSJA

Enterohemolizyna opisana została po raz pierwszy przez Beutin i wsp. w roku 1989 (2). Jest to nowy typ hemolizyny produkowany przez enteropatogenne szczepy *E. coli* O26 i O111 oraz niektóre szczepy O25 i O121. Badania Beutin i wsp. wykazały, że 94% verotoksycznych szczepów *E. coli* O157 ma zdolność do produkcji enterohemolizyny (1, 2, 3). W naszych badaniach wśród 257 przebadanych materiałów, tylko w 2 (0.8%) przypadkach izolowaliśmy enterohemizujące szczepy *E. coli*, które należały do serotypu O26. Spośród 7 badanych, referencyjnych szczepów VTEC, 6 z nich (serotypy: 2 szczepy O26, 2 szczepy O157, O111 i O126) produkowało enterohemolizynę a 1 szczep (O157:H7 – EDL 933)  $\beta$  i/lub enterohemolizynę. Ustalenie rodzaju hemolizy sprawia wiele trudności w przypadku szczepów *E. coli*  $\alpha$  i/lub  $\beta$ -hemolizujących. Strefy hemolizy wywoływane przez  $\alpha$ - i  $\beta$ -hemolizyny są duże, przejrzyste i widoczne na podłożach z krwinkami płukanymi i nie płukanymi. Strefy lizy krwinek powodowane przez inne niż enterohemolizyna rodzaje hemolizyn widoczne na podłożach po 24 godz. mogą maskować małą, mętną strefę hemolizy wywoływaną przez enterohemolizynę, jeżeli badany szczep bakteryjny wytwarza dwa różne rodzaje hemolizyn np.:  $\alpha$ - i enterohemolizynę. Na tej podstawie w naszych badaniach oznaczając szczepy verotoksyczne na linii komórkowej Vero, uwzględniliśmy wszystkie szczepy hemolizujące (bez względu na typ hemolizyny). Beutin i wsp. w swych badaniach wysiewali badany materiał bezpośrednio na podłoża do oznaczania hemolizyn i izolowali tylko kolonie hemolizujące po 24 godz. krwinki płukane w PBS (3). Podjęte przez nas próby wysiewania materiału bezpośrednio na podłoże do oznaczania hemolizyn nie powiodły się, ponieważ nierzadko w materiale obecne były bakterie z rodzaju *Proteus* sp., które uniemożliwiały dalsze badanie. Ponadto na wzbogaconym podłożu z krwią wyrastało, pomimo redukcyjnej techniki posiewu, bardzo dużo różnych kolonii bakteryjnych, wśród których trudno było wyodrębnić pojedyncze, hemolizujące kolonie. Strefa hemolizy powodowana przez enterohemolizynę jest mała, mętna, słabo widoczna (nawet na podłożu dwuwarstwowym) i zwykle należy zdjąć całą kolonię bakteryjną, aby można było ją dostrzec. Izolacja z podłoża MacConkeya laktozo-dodatnich, charakterystycznych dla *E. coli* kolonii pozwoliła na wyodrębnienie szczepów enterohemizujących, jednak mogła wpłynąć na pominięcie obecnych w materiale VTEC. Podłoże MacConkeya z sorbitolem zamiast laktozy jest obecnie najczęściej stosowanym podłożem wybiórczym w rutynowej diagnostyce zakażeń wywołanych przez VTEC (5, 7, 10, 12). W naszych badaniach tylko w 3 materiałach stwierdziliśmy obecność szczepów sorbitolo-ujemnych, które okazały się szczepami *Escherichia vulneris*.

Wybiórczy charakter podłoża SMAC można zwiększyć dodając antybiotyki np.: cefixim, hamujące wzrost wielu sorbitolo-ujemnych pałeczek jelitowych (12). Krishan i wsp. proponują jako podłoże selektywne agar MacConkey z sorbitolem lub agar Müller-Hinton z dodatkiem MUG (100 mg/ml) (7). Należy jednak wziąć pod uwagę, że spośród VTEC tylko serotyp *E. coli* O157 nie fermentuje sorbitolu i jest MUG-ujemny, chociaż opisano izolowane w Niemczech szczepy *E. coli* O157 sorbitolo-dodatnie i MUG-dodatnie (5).

Szybki test oznaczania  $\beta$ -glukuronidazy, podobnie jak podłoże MacConkeya z sorbitolem ogranicza badanie VTEC do serotypu *E. coli* O157. Izolowane w naszych

badaniach verotoksyczne szczepy *E. coli* O26 były sorbitolo i MUG-dodatnie. Wśród przebadanych referencyjnych szczepów VTEC, 3 z nich należące do serotypu O157 były sorbitolo- i MUG-ujemne, pozostałe, należące do serotypów O26, O111 i O126 fermentowały sorbitol i wytwarzały  $\beta$ -glukuronidazę.

Wykorzystywanie w rutynowej diagnostyce zakażeń wywołanych przez VTEC tylko podłoża SMAC i/lub oznaczania  $\beta$ -glukuronidazy może być powodem nie wyizolowania verotoksycznych szczepów *E. coli* z badanego materiału.

Najlepszą metodą wykrywania VTEC jest oznaczenie verotoksyn w supernatantach z płynnych hodowli badanych szczepów lub bezpośrednio w materiałach badanych, na linii komórkowej Vero lub HeLa (6, 8, 10). Jest to jednak badanie kosztowne, pracochłonne, wymagające odpowiedniego wyposażenia laboratorium, dlatego niedostępne dla rutynowej diagnostyki. W Polsce dostępny jest komercyjny test pozwalający na oznaczenie verotoksyn w badanym materiale – VTEC-RPLA firmy Oxoid (3).

Oznaczanie enterohemolizyny wydaje się dobrą metodą, pozwalającą z dużym prawdopodobieństwem na izolację z badanych materiałów VTEC, a możliwą do zastosowania w rutynowej diagnostyce. Ponadto jej oznaczenie pozwala również na wykrycie verotoksycznych szczepów *E. coli* sorbitolo-dodatnich i MUG-dodatnich.

Biorąc pod uwagę fakt, że niektóre enteropatogenne szczepy *E. coli* (serotypy O26 i O111) zaliczane obecnie do VTEC, mogą produkować verotoksyny, celowe wydaje się zwrócenie uwagi na te patogeny jelitowe, izolowane w Polsce z przypadków biegunek prawdopodobnie częściej niż szczepy *E. coli* O157 (12).

## WNIOSEK

1. Oznaczanie enterohemolizyny pozwala na izolację z badanego materiału większości verotoksycznych szczepów *E. coli*.

*B.M. Sobieszkańska, R. Gryka, R. Francizek, G. Gościński, I. Grześ*

## CHARACTERISTIC OF VEROTOXIGENIC STRAINS OF *ESCHERICHIA COLI*

### SUMMARY

The aim of the study was the isolation from faecal samples of patients with diarrhoea of verotoxigenic strains of *E. coli* (VTEC) on the basis of characteristic biochemical properties and production of enterohaemolysin and comparison of isolated verotoxigenic strains with reference strains of VTEC.

For isolation of VTEC from 257 stool samples derived from patients with diarrhoea were used selective medium sorbitol – Mac Conkey agar (SMAC) and media supplemented with unwashed and washed in PBS sheep erythrocytes for detection of haemolysins of *E. coli*. In all haemolytic and sorbitolo-positive or – negative strains isolated from 93 stool samples were examined the activity of  $\beta$ -glucuronidase using MUG (4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid) as a substrate for that enzyme. All isolated haemolytic strains as well as reference VTEC were examined on Vero cell line. Verotoxigenic strains from examined samples were investigated by agglutination assay with antiserum to *E. coli* O157 and then with antisera to enteropathogenic *E. coli* (EPEC). After that they were examined with ID GN and ATB GN tests.



In 93 (36,2%) examined samples there were haemolytic strains of *E. coli* which fermented or not sorbitol and were MUG-positive or negative. Only in 2 (0,2%) stool samples there were verotoxigenic strains of *E. coli* which were sorbiol-positive and MG-positive. Both strains belonged to O26 serotype and were derived from samples of two children with diarrhoea. Isolated verotoxigenic strains of *E. coli* O26 were susceptible on all tested antibiotics.

## PIŚMIENNICTWO

1. Beutin L. The different hemolysins of *Escherichia coli*. Med. Microbiol Immunol 1991; 180: 167–182.
2. Beutin L, Montenegro M, Orskov I i inni. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1989; 27: 2559–2564.
3. Beutin L, Zimmermann S, Gleier E. Rapid detection and isolation of Shiga-like toxin (Verocytotoxin) – producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC – RPLA assay. J Clin Microbiol 1996; 34: 2812–2814.
4. Chinyu S, Brandt L. *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. Ann Intern Med 1995; 123: 698–714.
5. Coia J. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. FEMS Immunol Med Microbiol 1998; 20: 1–9.
6. Konowalchuk J, Speirs J, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun 1977; 18: 775–779.
7. Krishnan C, Fitzgerald V, Dakin S i inni. Laboratory investigation of outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7. J Clin Microbiol 1987; 25: 1043–1047.
8. Maniar A, Williams T, Anand C i inni. Detection of verotoxin in stool specimens. J Clin Microbiol 1990; 28: 134–135.
9. Ratnam S, March S, Ahmed R i inni. Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. J Clin Microbiol 1988; 26: 2006–2012.
10. Ritchie M, Partington S, Jessop J i inni. J Clin Microbiol 1992; 30: 461–464.
11. Thompson J, Hodge D, Borczyk A. Rapid biochemical test to identify verocytotoxin – positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. J Clin Microbiol 1990; 28: 2165–2168.
12. Veronzy – Rozand C. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxin – producing *Escherichia coli* (VTEC) in food. J Appl Microbiol 1997; 82: 537–551.

Adres autora:

dr Beata Sobieszkańska

Katedra i Zakład Mikrobiologii AM we Wrocławiu

ul. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław