

Beata Magdalena Sobieszczęńska¹, Romuald Gryko²

TYPY ADHEZJI SZCZEPÓW *ESCHERICHIA COLI* IZOLOWANYCH Z PRZYPADKÓW BIEGUNEK

¹ Katedra i Zakład Mikrobiologii AM we Wrocławiu
Kierownik: *A. Przędo-Mordarska*

² Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii w Puławach
Dyrektor: *M. Bartoszcze*

Zaobserwowana wśród enteropatogennych szczepów Escherichia coli (EPEC) zależność między sposobem adhezji do komórek hodowlanych in vitro a zdolnością do wywoływania charakterystycznych zmian histopatologicznych w komórkach nabłonka jelita, stała się podstawą reklasyfikacji tej grupy patogenów jelitowych.

WSTĘP

Pod koniec lat 70-tych Cravioto i wsp. (1) oraz inni badacze (2, 3) zaobserwowali, że pałeczki *E. coli* należące do niektórych serotypów enteropatogennych (EPEC), w teście in vitro przylegają do komórek linii HEp-2 lub HeLa w postaci charakterystycznych skupisk, co określono mianem zlokalizowanej adhezji - LA (localised adherence). W przeciwieństwie do nich pozostałe serotypy EPEC oraz wiele niepatogennych szczepów *E. coli* wykazuje in vitro rozsiany typ adhezji - DA (diffuse adherent), w którym pojedyncze bakterie przylegają do całej powierzchni komórek (2). Badania Levine i wsp. (4) wykazały, że zlokalizowany typ adhezji związany jest z obecnością plazmidu (60 MDa), który nazwano czynnikiem adhezji *E. coli* - EAF (*E. coli* adherence factor) (5, 6). Plazmid EAF koduje fimbrie BFP (bundle forming pili), mające zasadnicze znaczenie w procesie adhezji szczepów LA. Badania wykonane na ochotnikach ujawniły związek pomiędzy obecnością czynnika EAF a zdolnością szczepów *E. coli* do wywoływania biegunki (7). Szczepy wyleczone z tego plazmidu nie wykazują adhezji typu LA i są znacznie mniej chorobotwórcze dla ludzi (8). Następnie wykazano, że szczepy *E. coli* EAF-dodatnie tworzą in vivo na błonie śluzowej jelita takie same skupiska (mikrokolonie) bakterii, jak te obserwowane in vitro oraz, że większość tych szczepów wywołuje w enterocytach charakterystyczne zmiany histopatologiczne tzw. przylegania i zacierania struktury kosmków jelitowych - AE (attaching and effacing) (7, 9). Zmiany AE charakteryzuje ścisły kontakt bakterii z enterocytom, zniszczenie rąbka szczoteczkowego w miejscu adhezji bakterii oraz zniszczenie cytoszkieletu komórki. W miejscu adhezji bakterii błona cytoplazmatyczna komórki ulega wyniesieniu, tworząc strukturę podobną do piedestału, wewnątrz której gromadzą się włókna aktyny i inne białka cytoszkieletu (9, 10, 11). Za zdolność szczepów *E. coli* do

wywoływania zmian AE odpowiada chromosomalny gen *eae*, kodujący bakteryjne białko błony zewnętrznej - intiminę, bezpośrednio odpowiedzialną za reorganizację cytoszkieletu enterocytów (10). Na podstawie obecności czynnika EAF oraz zdolności do wywoływania zmian patologicznych w enterocytach, grupę EPEC podzielono na klasyczne EPEC (I grupa) i nieklasyczne EPEC (II grupa). Klasyczne EPEC, obejmujące serotypy: 026, 055, O111, O119, 0126, 0127, 0142 charakteryzuje typ adhezji LA oraz zdolność wywoływania zmian AE. Szczepy *E. coli* należące do II grupy (nieklasyczne), obejmujące m.in. serotypy 044, 086, 0114, nie mają zdolności wywoływania zmian AE (brak genu *eae*) oraz wykazują rozsianą adhezję lub należą do szczepów nieadherentnych (2). Poza EPEC zdolność do wywoływania zmian typu AE, związaną z obecnością genu *eae*, wykazano także m.in. u enterokrwotocznych szczepów *E. coli* (EHEC). EHEC, do których należą niektóre serotypy zaliczane równocześnie do EPEC np.: 026 i O111 oraz inne serotypy m.in. 0157, poza tym, że mogą produkować verotoksyny, charakteryzują się obecnością plazmidu o ciężarze cząsteczkowym podobnym do plazmidu EAF, ale oznaczonym p0157, który koduje fimbrie odpowiedzialne za adhezję i ekspresję enterohemolizyny (12, 13).

Celem pracy była charakterystyka typów adhezji szczepów *E. coli* izolowanych z przypadków biegunek oraz porównanie typu adhezji z obecnością: plazmidu 60 MDa, fimbrii adhezyjnych, genu *eae* oraz zdolnością badanych szczepów do wywoływania zmian w cytoszkielecie komórek hodowlanych w teście *in vitro*.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 96 szczepach *E. coli* izolowanych w latach 1998 - 1999 z próbek kału od 94 dzieci z biegunką (średni wiek dzieci 3 miesiące), hospitalizowanych w Klinice Pediatrii AM we Wrocławiu. W badaniach wykorzystano tylko te próbki kału, w których w rutynowym badaniu bakteriologicznym nie stwierdzono innych patogenów jelitowych (*Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, *Yersinia* spp, Rotavirusy). Jako kontrolę dodatnią zastosowano referencyjny szczep *E. coli* 026:H11 (H-19) EAF i *eae* - dodatni wykazujący zlokalizowany typ adhezji (LA) oraz referencyjny szczep *E. coli* 0157:H7 (EDL 933) p0157 i *eae* - dodatni, posiadający geny dla verotoksyn (*stx1* i *stx2*), produkujący enterohemolizynę i nie wykazujący adhezji do komórek linii HEp-2. Szczepy izolowano z posiewu próbek kału na podłożu MacConkeya. Przynależność gatunkową badanych szczepów potwierdzano testem biochemicznym ID GN32 (bioMerieux).

Serologiczną identyfikację badanych szczepów (18-godzinne hodowle na agarze zwykłym) przeprowadzano metodą aglutynacji szkiełkowej z zestawem diagnostycznych odczynników lateksowych wieloważnych i jednoważnych dla enteropatogennych pałeczek *Escherichia coli* (EPEC) (P.W. Biomex, Kraków) oraz z odczynnikiem lateksowym (Oxoid) dla *E. coli* 0157.

Fimbrie adhezyjne oznaczano metodą hemaglutynacji 3% zawiesiny krwinek czerwonych świnki morskiej oraz ludzkich grup A i O, w obecności i nieobecności D - mannozy, wg Evans i wsp. (14). Pałeczki *E. coli* wytwarzające mannozooporne fimbrie (MR) aglutynują krwinki w obecności i nieobecności D - mannozy, natomiast szczepy posiadające fimbrie mannozowrażliwe (MS) aglutynują krwinki tylko w nieobecności D - mannozy.

Test adhezji *in vitro* do komórek linii HEp-2 wykonano wg I.C. Scaletsky i wsp. (15).

Hodowlę komórek HEp-2 prowadzono w podłożu MEM z L-glutaminą, 10% surowicą cielęcą i roztworem antybiotyków (penicylina 100 U, streptomycyna 100 U, amfoterycyna B 0,25 ug/ml), w temp. 37°C w atmosferze 5% CO₂. Podłoże i suplementy pochodziły z firmy Gibco BRL. 24-godzinną hodowlę komórek HEp-2 (monolayer) w kamerkach 2-komorowych na szkiełku mikroskopowym (NUNC), płukano 2-krotnie w PBS (pH 7,2) z 0,5% D-mannozą; następnie dodawano świeże podłoże MEM z 2% surowicą cielęcą, 0,5% D-mannozą, bez antybiotyków. Tak przygotowane komórki zakażano 18-godzinną hodowlą badanych szczepów w LB (Luria broth, Difco) w temp. 37°C z napowietrzaniem. Po 3-godzinnej inkubacji w temp. 37°C i w atmosferze 5% CO₂, komórki płukano 6-krotnie w PBS i utrwalano przez 30 min. 100% metanolem. Po 3-krotnym odpłukaniu w jałowej wodzie destylowanej, komórki barwiono 4-5 godzin metodą Giemza. Badanie wykonywano dwukrotnie dla każdego szczepu. Ponadto dla szczepów, które nie wykazały adhezji po 3 godzinach inkubacji z komórkami, test powtarzano, przedłużając czas inkubacji do 6 godz. Wynik odczytywano w mikroskopie świetlnym, w układzie imersyjnym, przy powiększeniu 1000-krotnym. Badany szczep uznawano za zdolny do adhezji, gdy 80% komórek HEp-2 wykazywało przylegające bakterie.

Isolację plazmidowego DNA wykonano wg metody Birnboim i Doły (16).

Analizy ciężarów cząsteczkowych plazmidów badanych szczepów dokonywano w systemie do analizy żeli GelDok 2000 (BioRad), w programie Quantity One, w odniesieniu do wzorcowego szczepu *E. coli* V517, posiadającego plazmidy o znanych ciężarach cząsteczkowych.

Test FAS (fluorescence actin staining), pozwalający na wykazanie zdolności badanych szczepów do wywoływania zmian typu AE, wykonano zgodnie z metodą opisaną przez Knutton i wsp. (17), na linii komórkowej HEp-2.

Sekwencje nukleotydowe, swoiste dla genu *eae* oraz genów dla verotoksyn VT1 i VT2 (przedstawione w tabeli I), wykrywano metodą PCR (polymerase chain reaction) według Linqvist i wsp. (18).

Tabela I. Primery zastosowane w PCR do amplifikacji fragmentów specyficznych dla genów verotoksyn VT1 i VT2 oraz genu *eae*

Table I. Primers used in PCR to amplify specific fragments from genes for VT1, VT2, and *eae*

| Primery | Sekwencje oligonukleotydowe (5'-3') | Ciężar cząsteczkowy (bp) |
|----------------|-------------------------------------|--------------------------|
| VT1 a | GAAGAGTCCGTGGGATTACG | |
| VT1 b | AGCGATGCAGCTATTAATAA | 130 |
| VT2 a | TACACAGGAGCAGTTTCAGACAGT | |
| VT2 b | ACCGTTTTTCAGATTTT(AG)CACATA | 298 |
| <i>eae</i> - 1 | CACACGAATAAACTGACTAAAATG | |
| <i>eae</i> - 2 | AAAAACGCTGACCCGCACCTAAAT | 376 |

Zdolność do produkcji enterohemolizyny oznaczano na podłożu tryptozowo - sojowym z 10 mM CaCl₂ i 5% zawiesiną krwinek baranich trzykrotnie płukanych w PBS (pH 7,2) według Beutin i wsp. (19).

WYNIKI

Wśród przebadanych 96 szczepów *E. coli* izolowanych z próbek kału dzieci z biegunką, zlokalizowany typ mannozoopornej adhezji (LA) wykazało 9,4% szczepów, typ podobny do zlokalizowanego (LAL) 9,4%, rozsiany (DA) 46,8%, natomiast 28,1% szczepów nie wykazało mannozo-opornej adhezji do komórek linii HEP-2 (NA); w przypadku 6,2% szczepów stwierdzono odrywanie komórek od szkła, zarówno po 3 jak i 6 godz. inkubacji; prawdopodobnie były to szczepy „odrywające” CDEC - cell detaching *E. coli*. Wyniki badania zależności pomiędzy typem adhezji, serotypem a obecnością fimbrii typu MR i MS przedstawiono w tabeli II. Obecność genu *eae* wykazało 25 (26%) badanych szczepów. Wszystkie te szczepy były zdolne do wywoływania zmian w cytoszkielecie komórek, co wykazano w teście FAS. Zlokalizowany typ adhezji (rycia) dotyczył szczepów *eae* i FAS - dodatnich, należących do serotypów: 026 (6 szczepów), OH4 (1 szczep) oraz 1 szczepu szorstkiego, który aglutynował z 3% roztworem NaCl. Szczepy te wykazały również obecność plazmidu około 60 MDa. Typ adhezji podobny do zlokalizowanej (ryc.lb), charakteryzują luźne skupiska bakterii przylegające tylko do nielicznych (11 - 25%) komórek HEP-2 i jest on wykrywany po 6 godz. inkubacji. Szczepy *E. coli* o typie adhezji LAL (9,4% badanych izolatów) należały do serotypu: 026 (2 szczepy), 0127 (1 szczep) oraz do szczepów nie aglutynujących z surowicami swoistymi dla EPEC (6 szczepów). Wszystkie LAL szczepy posiadały gen *eae*, co potwierdził dodatni test FAS, ale nie posiadały plazmidu 60 MDa. Spośród 25 szczepów *eae* i FAS-dodatnich, 8 (32%) wykazało rozsiany typ adhezji (ryc.1c); 1 z tych szczepów należał do serotypu 026, pozostałe nie aglutynowały z diagnostycznymi odczynnikami lateksowymi dla EPEC; 3 spośród DA szczepów (2 - niepatogenne i 1-026) wykazały obecność plazmidu około 60 MDa. Wyniki badania zależności pomiędzy obecnością genu *eae* oraz plazmidu EAF a serotypem i wynikiem testu FAS przedstawiono w tabeli III. Zdolność do produkcji enterohemolizyny wykazały tylko 2 szczepy *E. coli* 026 - jeden o zlokalizowanym, a drugi o rozsianym typie adhezji. Oba te szczepy poza obecnością genu *eae* oraz plazmidu ok. 60 MDa, posiadały geny dla verotoksyny VT1. Pozostałe 9 szczepów, u których wykazano plazmid 60 MDa, należały do niehemolizujących. Ogółem 22 (22,9%) badane szczepy wykazały obecność genów dla verotoksyn, pomimo, że nie stwierdzono wśród nich serotypu O157. Zależność między obecnością genów VT1 i/lub VT2 oraz serotypem i typem adhezji wykazano w tabeli IV. Wśród 27 (28,1%) szczepów NA wykazano duże zróżnicowanie pod względem serotypów i obecności fimbrii; żaden szczep z tej grupy nie posiadał genu *eae*, genów dla verotoksyn lub plazmidu 60 MDa (tab. I). Spośród 6 szczepów CDEC (ryc.1d), połowa należała do serotypu 018 i posiadała fimbrie typu MR oraz tylko jeden plazmid o wysokim ciężarze cząsteczkowym (ok. 30 MDa). Podobnie jak w przypadku szczepów nieadherentnych, nie wykazano w tej grupie obecności genów: *stx1*, *stx2*, *eae* lub plazmidu 60 MDa. Wyniki badań szczepów CDEC wykazano w tabeli V.

Tab e l a II. Serotypy, fimbrie oraz typy adhezji szczepów *E. coli* izolowanych z próbek kału od dzieci z biegunką

Tab l e II. Serotypes, fimbria and adherence patterns of *E. coli* strains isolated from stool samples of children with diarrhea

| Serotyp | Liczba szczepów | Fimbrie | | | Typ adhezji | | | | |
|--------------|-----------------|-------------|---------------|---------------|-------------|-------------|----------------|---------------|--------------|
| | | brak | MS | MR | LA | LAL | DA | NA | CDEC |
| 026 | 9 | 5 | 4 | 0 | 6 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 018 | 9 | 2 | 1 | 6 | 0 | 0 | 5 | 1 | 3 |
| 044 | 4 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| 0125 | 4 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 |
| OH4 | 4 | 1 | 3 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| Szorstkic | 4 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | | 0 |
| 086 | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 2 | | 0 |
| 0127 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | | 0 |
| OH9 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | | 0 |
| 025 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | | 0 |
| 0111 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0128 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 0124 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Niepatogenne | 50 | 9 | 38 | 3 | 0 | 6 | 30 | 12 | 2 |
| Razem | 96 (100%) | 22 (23%) | 62 (64,5%) | 12 (12,5%) | 9 (9,4%) | 9 (9,4%) | 45 (46,85%) | 27 (28,1%) | 6 (6,25%) |

NA - nieadherentne szczepy, pozostałe objaśnienia tabeli w tekście

Tab e l a III. Zależność między serotypem, typem adhezji a wynikiem testu FAS i obecnością genu *eae*, badanych szczepów *E. coli*

Tab l e III. The dependence of serotype and pattern of adherence upon the FAS test result and the presence of *eae* gene of examined *E. coli* strains

| Liczba szczepów | Serotyp | Typ adhezji | Obecność genu <i>eae</i> | Test FAS | Plazmid EAF |
|-----------------|----------|-------------|--------------------------|----------|-------------|
| 6 | O26 | LA | + | + | + |
| 1 | O114 | LA | + | + | + |
| 1 | szorstki | LA | + | + | + |
| 2 | O26 | LAL | + | + | - |
| 1 | O127 | LAL | + | + | - |
| 6 | np | LAL | + | + | - |
| 1 | O26 | DA | + | + | + |
| 2 | np | DA | + | + | + |
| 5 | np | DA | + | + | - |

np - szczep niepatogenny

Tab e l a IV. Zależność między serotypem, obecnością genów *eae*, *stx 1*, *stx 2* a wynikiem testu FAS, typem fimbrii adhezyjnych i typem adhezji badanych szczepów *E. coli*

Tab l e IV. The dependence of serotype, the presence of *eae*, *stx 1*, and *stx 2* genes and the FAS assay result, fimbria and adherence pattern of examined strains of *E. coli*

| Lp. | Serotyp | Typ adhezji | Fimbrie | Geny dla verotoksyn | Gen <i>eae</i> | Hemolizyny | Test FAS | Plazmid 60 MDa |
|-----|----------|-------------|---------|---------------------|----------------|------------|----------|----------------|
| 1. | 02A | LA | MS | VT1 | + | E | + | + |
| 2. | 026 | LA | 0 | VT1,VT2 | + | 0 | + | + |
| 3. | 026 | LA | 0 | VT1,VT2 | + | 0 | + | + |
| 4. | 026 | LA | 0 | VT1,VT2 | + | 0 | + | + |
| 5. | 026 | LA | MS | VT1,VT2 | + | 0 | + | + |
| 6. | 026 | LA | MS | VT1,VT2 | + | 0 | + | + |
| 7. | 026 | LAL | MS | 0 | + | 0 | + | brak |
| 8. | 026 | LAL | 0 | VT1 | + | 0 | + | brak |
| 9. | 026 | DA | 0 | VT1 | + | E | + | + |
| 10. | OH4 | LA | 0 | VT1 | + | 0 | + | + |
| 11. | szorstki | LA | MS | VT1,VT2 | + | 0 | + | + |
| 12. | 0127 | LAL | MS | VT2 | + | 0 | + | brak |
| 13. | np | LAL | MS | VT1,VT2 | + | 0 | + | brak |
| 14. | np | LAL | MS | VT2 | + | 0 | + | brak |
| 15. | np | LAL | MS | VT1,VT2 | + | 0 | + | brak |
| 16. | np | LAL | MS | VT2 | + | 0 | + | brak |
| 17. | np | LAL | MS | 0 | + | 0 | + | brak |
| 18. | np | LAL | MS | 0 | + | 0 | + | brak |
| 19. | np | DA | MS | VT1 | + | 0 | + | + |
| 20. | np | DA | MS | VT2 | + | 0 | + | + |
| 21. | np | DA | MS | VT1,VT2 | + | 0 | + | brak |
| 22. | np | DA | MS | VT1,VT2 | + | 0 | + | brak |
| 23. | np | DA | MR | VT1,VT2 | + | 0 | + | brak |
| 24. | np | DA | MR | VT1 | + | 0 | + | brak |
| 25. | np | DA | MR | VT1,VT2 | + | 0 | + | brak |

np - szczep niepatogenny

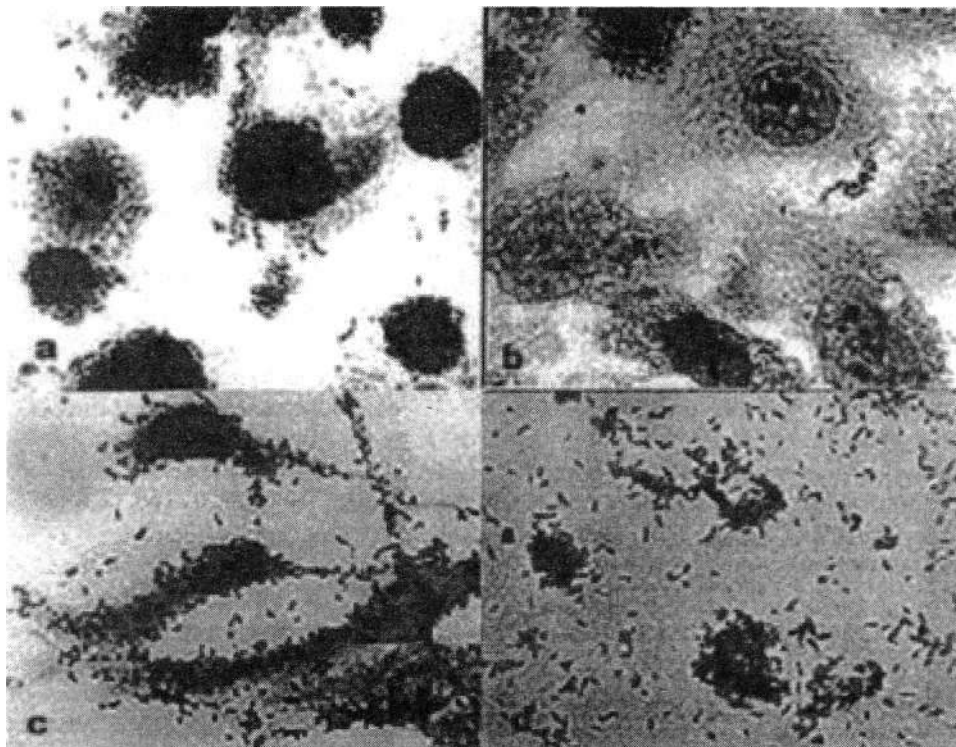
E - enterohemolizyna

Tabela V. Charakterystyka izolowanych szczepów „odrywających” *E. coli* (CDEC)

Tab l e V. Characteristics of isolated cell detaching *E. coli* (CDEC) strains

| Serotyp | Fimbrie | Wzór plazmidowy (MDa) |
|---------|---------|-----------------------|
| O18 | MR | 33 |
| O18 | MR | 30 |
| O18 | MR | 32 |
| O125 | MS | 41; 3,2 |
| np | MS | brak |
| np | MS | 25; 7 |

np - szczep niebadany



Ryc. 1. Typy adhezji badanych szczepów *E. coli*: a) LA - zlokalizowana, b) LAL - podobna do zlokalizowanej, c) DA - rozsiana, d) CDEC - „odrywające” *E. coli*

Fig. 1. Adherence patterns of examined strains of *E. coli*: a) LA - localized adherence, b) LAL - localized like adherence, c) DA - diffuse adherence, d) CDEC - cell detaching *E. coli*

OMÓWIENIE

Oznaczenie *in vitro* typu adhezji do hodowlanych komórek linii HEP-2 lub HeLa, jest jedną z badawczych metod wstępnej klasyfikacji szczepów izolowanych z próbek kału do grupy wywołujących biegunkę, enteropatogennych *E. coli* (5, 7). Wyniki naszych badań uzyskane dla szczepów o zlokalizowanym i podobnym do zlokalizowanego typie adhezji są zgodne z doniesieniami innych badaczy, biorąc pod uwagę obecność genu *eae*, dodatnie wyniki testu FAS oraz obecność czynnika EAF. Wśród izolowanych LA-szczepów *E. coli*, poza serotypami zaklasyfikowanymi jako klasyczne EPEC (026, 0111, 0127) były szczepy, które nie aglutynowały z odczynnikami lateksowymi, swoistymi dla EPEC, uznane na tej podstawie za niepatogenne oraz jeden szczep szorstki i jeden szczep serotypu O114. Zgodnie z nowym podziałem, serotyp O114 zaliczono do nieklasycznych EPEC, nie posiadających typowych cech wirulencji (genu *eae* i czynnika EAF). Według badań Beutin i wsp. (20) serotyp O114 obejmuje bardzo zróżnicowane szczepy, które w zależności od posiadanego antygeny rzęskowego H mogą

produkować enterotoksynę ciepłostalą ST i/lub ciepłochwiejną LT, a nawet (serotyp OH4:H4) verotoksynę VT1. Z kolei China i wsp. (21) opisali szczep *E. coli* OH4:H2 *eae* - dodatni. Wśród LA - 2 szczepy serotypu 026 produkowały enterohemolizynę stąd wniosek, że obecny u tych izolatów plazmid 60 MDa może odpowiadać plazmidowi p0157, który warunkuje zarówno ekspresję enterohemolizyny, jak i adhezję do komórek. U pozostałych szczepów niehemolizujących, o zlokalizowanym typie adhezji, obecny plazmid ok. 60 MDa odpowiada raczej czynnikowi EAF. Według badań Scotland i wsp. (12) prowadzonych na enterohemolizujących, wywołujących zmiany AE szczepach *E. coli* 026, posiadających plazmidy o ciężarach: 66, 50 - 60 i < 50 MDa, utrata plazmidu 59 MDa *związana*, była z utratą zdolności do hemolizy, chociaż szczepy te nadal wywoływały zmiany w cytoszkieletcie komórek. Z badań tych wynika również, że szczepy LA enterohemolizujące, *eae* - dodatnie, powinny posiadać 2 plazmidy o ciężarach cząsteczkowych około 60 MDa - jeden odpowiedzialny za produkcję enterohemolizyny, drugi za ekspresję fimbrii BFP. W naszych badaniach, żaden szczep nie wykazał obecności dwóch plazmidów ciężkich, co mogło być spowodowane ich utratą w trakcie pasażowania. Zgodnie z doniesieniem Knutton i wsp (17) 66% szczepów EPEC rzeczywiście „gubi” te plazmidy, nie tracąc jednak genu *eae*. Według badań Scaletsky i wsp. (15) klasyczne EPEC EAF-ujemne, które utraciły plazmid 60 MDa, z uwagi na obecność genu *eae* i zdolność do wywoływania zmian typu AE w jelicie, należą do klasycznych, atypowych EPEC. Wśród 9 wykazanych w naszym badaniu szczepów o typie adhezji LAL, charakteryzującej szczepy EAF-ujemne, 3 należały do serotypów powszechnie uznanych za chorobotwórcze: O26 i O127, ale 6 pozostałych nie aglutynowało z odczynnikami lateksowymi, swoistymi dla EPEC. Wszystkie te szczepy posiadały gen *eae* oraz wykazały dodatni test FAS, a 6 spośród nich posiadało również geny dla verotoksyn: 1 - O26, 1 - O127 i 4 szczepy niepatogenne. Szczepy *E. coli* EAF-ujemne posiadające geny *eae* oraz geny dla verotoksyn, opisali również w swych badaniach Forestier i wsp. (22) oraz Scotland i wsp. (12). Biorąc pod uwagę fakt, że większość laboratoriów bakteriologicznych zaszeregowuje izolowane z próbek kału szczepy *E. coli* do enteropatogennych tylko na podstawie aglutynacji z surowicami odpornościowymi lub odczynnikami lateksowymi dla EPEC, szczepy te, chociaż potencjalnie chorobotwórcze, zdolne do wywoływania zmian AE w jelicie lub posiadające geny dla verotoksyn, zostałyby uznane za niepatogenne. Wydaje się prawdopodobne, że badane LAL-szczepy EAF-ujemne i *eae*-dodatnie, nie aglutynujące z odczynnikami lateksowymi dla EPEC, mogą należeć do chorobotwórczych szczepów np.: zwierzęcych, których udział w etiopatogenezie biegunek u ludzi wzrasta.

Kontrowersyjną grupą *E. coli* są szczepy wykazujące rozsiany typ adhezji. Według wielu badaczy (15, 22) rola tych szczepów w etiologii biegunek u ludzi jest wątpliwa, ponieważ są one izolowane od osób z biegunką równie często jak od osób zdrowych. Z kolei w swych badaniach Giron i wsp. (23) wykazali, że szczepy DA są częściej izolowane od dzieci z biegunką niż od dzieci zdrowych, co przemawia za udziałem tych szczepów w etiologii biegunek niemowlęcych. Rola szczepów DA jest obecnie szeroko dyskutowana. W naszych badaniach, niektóre szczepy DA wykazały obecność fimbrii MR, aglutynujących krwinki ludzkie grup A i O, co można uznać za czynnik wirulencji, a także obecność genu *eae* i plazmidu 60 MDa. Wśród badanych, niepatogennych szczepów o rozsianym typie adhezji, aż 7 z nich wykazało obok genu *eae* obecność

genów dla werotoksyn VT1 i/lub VT2. Prawdopodobnie selekcja próbek kału (próbki pochodziły od dzieci z biegunką wymagającą hospitalizacji i nie stwierdzono w nich innych patogenów jelitowych) miała wpływ na uzyskanie tak wysokiego odsetka szczepów werotoksyucznych. Grupa „odrywających szczepów *E. coli*” jest bardzo słabo poznana. Szczepy takie izolowano od dzieci z biegunką, ale nie jest znany ani patomechanizm działania tych drobnoustrojów, ani ich znaczenie w etiologii biegunek (24).

W naszych badaniach nie uwzględnione zostały szczepy *E. coli* izolowane z próbek kału dzieci zdrowych, co utrudnia ocenę chorobotwórczego działania szczepów o rozsiałym typie adhezji oraz „odrywających” *E. coli*. Niemniej uzyskane wyniki badań wykazały szerokie zróżnicowanie pod względem czynników wirulencji wśród izolowanych szczepów *E. coli*, które można uznać za czynnik etiologiczny biegunki u badanych dzieci.

WNIOSEK

Klasyfikacja izolowanych z próbek kału szczepów *E. coli* wywołujących biegunkę na podstawie aglutynacji z surowicami swoistymi dla EPEC, może być przyczyną pomijania ważnych szczepów chorobotwórczych.

BM Sobieszkańska, R Gryko

ADHERENCE PATTERNS OF *ESCHERICHIA COLI* STRAINS ISOLATED FROM CHILDREN WITH DIARRHEA

SUMMARY

Among enteropathogenic *E. coli* strains (EPEC) there are different patterns of adherence to the culture cells in vitro assay: localized, localized-like and diffuse.

The adherence pattern is dependent on the ability of *E. coli* strains to cause of diarrhea. The strains locally adhering possess a 60 MDa plasmid - *E. coli* adherence factor (EAF), and produce characteristic histopathologic intestinal lesions linked with the presence of chromosomal *eae* gene. The pathogenicity of diffusely adherent as well as cells detaching *E. coli* (CDEC) remains controversial.

The aim of the study was to identify the adherence patterns of *E. coli* strains isolated from children with diarrhea and to compare that patterns with the serotypes and the presence of EAF and/or pO157 plasmids, fimbriae and *eae*, *stx1*, and *stx2* specific sequences. Nine out of examined *E. coli* strains showed the localized pattern of adherence. About half (46,8 %) of strains were diffusely adherent and six isolates were cells detaching *E. coli* (CDEC). A total of 22 (23%) examined strains showed the presence of specific for verocytotoxins sequences.

The results showed that many strains recognized on the ground of agglutination with specific EPEC antisera as unpathogenic could be an etiologic agents of diarrhea which are able to produce histopathologic lesions in the intestinal epithelium. In turn, many strains classified as EPEC could be unpathogenic on the basis of diffuse pattern of adherence.

PIŚMIENNICTWO

1. Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, i in. An adherence factor found in strains of *E. coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* 1979; 3: 95-9.
2. Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhoea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* 1987; 155: 377-89.

3. Scaletsky IC, Milani SR, Trabulsi LR, i in. Isolation and characterization of the localised adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1988; 56: 2979-83.
4. Levine MM, Nataro JP, Karch H, i in. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J Infect Dis* 1985; 152: 550-9.
5. Donnenberg MS, Giron JA, Nataro JP, i in. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localised adherence. *Mol Microbiol* 1992; 6: 3427-37.
6. Knutton S, Baldini MM, Kaper JB, i in. Role of plasmid - encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Infect Immun* 1987; 55: 78-85.
7. Hicks S, Frankel G, Kaper JB, i in. Role of intimin and bundle - forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. *Infect Immun* 1998; 66: 1570-8.
8. Vuopio-Varkila J, Schoolnik GK. Localised adherence by enteropathogenic *Escherichia coli* is an inducible phenotype associated with the expression of new outer membrane proteins. *J Exp Med* 1991; 174: 1167-77.
9. Deibel C, Kramer S, Chakraborty T, i in. EspE, a novel secreted protein of attaching and effacing bacteria, is directly translocated into infected host cells, where it appears as tyrosine - phosphorylated 90 kDa protein. *Mol Microbiol* 1998; 28: 463-74.
10. Goosney DL, Knoechel DG, Finlay BB. Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Shigella*: masters of host cell cytoskeletal exploitation. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 216-23.
11. Jerse AE, Yu J, Tall BD, i in. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 7839-43.
12. Scotland SM, Willshaw GA, Smith AR, i in. Properties of strains of *Escherichia coli* O26:H11 in relation to their enteropathogenic or enterohemorrhagic classification. *J Infect Dis* 1990; 162: 1069-74.
13. Karch H, Heesemann J, Laufs R, i in. A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infect Immun* 1987; 55: 455-61.
14. Evans DJ, Evans DG, Young LS, i in. Hemagglutination typing of *Escherichia coli* definition of seven hemagglutination types. *J Clin Microbiol* 1980; 12: 235-42.
15. Scaletsky IC, Pedroso MZ, Olivia CA, i in. A localised adherence - like pattern as a second pattern adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1999; 67: 3410-5.
16. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res* 1979; 7: 1513-23.
17. Knutton S, Baldwin T, Williams PH, i in. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1989; 57: 1290-8.
18. Lingvist R. Preparation of PCR samples from food by a rapid and single centrifugation technique evaluated by detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol* 1997; 37: 73-82.
19. Beutin L, Montenegro M, Orskov I, i in. Close association of verotoxin (Shiga - like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2559-64.
20. Beutin L, Orskov I, Orskov F, i in. Clonal diversity and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic enteropathogenic serogroup O114. *J Infect Dis* 1990; 162: 1329-34.

21. China B, Jacquemin E, Devrin A, i in. Heterogeneity of eae genes in attaching/effacing *Escherichia coli* from cattle: comparison with human strains. *Res Microbiol* 1999; 150: 323-32.
22. Forestier CH, Mayer M, Favre - Bonte S, i in. Enteroadherent *Escherichia coli* and diarrhea in children: a prospective case - control study. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2897-903.
23. Giron JA, Jones T, Milian - Velasco F, i in. Diffuse - adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhoea in Mayan children in Mexico. *J Infect Dis* 1991; 163: 507-13.
24. Thielman NW. Enteric *Escherichia coli* infections. *Curr Opin Infect Dis* 1994; 7: 582-91.

Adres autorki:

Beata Magdalena Sobieszczęńska
Katedra i Zakład Mikrobiologii AM
ul. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław
tel. (071) 784-12-78; fax: (071) 328-36-72
e-mail: bmsobie@polbox.com