

KARAKTERISTIKE SOJEVA VEROCITOTOKSIN
PRODUKUJUĆIH *ESCHERICHIA COLI* IZOLOVANIH IZ
GOVEDA*

*SOME TRAITS OF VEROTOXIN-PRODUCING STRAINS OF
ESCHERICHIA COLI ISOLATED FROM CATTLE*

S. Lazić, N. Stajković, B. Dimić, Zorica Lepšanović, Milena Krstić,
R. Čekanac, J. Mladenović, Ž. Jadranin, Sonja Radaković, Slavica Rađen**

Verocitotoksična *Escherichia coli* (VTEC) jedna je od 6 grupa patogenih bakterija ove vrste, uzročnika crevnih zaraznih bolesti ljudi i životinja. Dosadašnja istraživanja u svetu su pokazala da je osnovni rezervoar VTEC intestinalni trakt domaćih životinja, pre svega preživala. Na našim prostorima su domaće životinje često inficirane ovim patogenim agensima, ali kod nas su ovi bakterijski agensi redak uzročnik sporadičnih enterokolitisa, dok epidemijske pojave oboljenja izazvanih VTEC do sada nisu registrovane. Zbog toga se postavlja pitanje koliki procenat VTEC, izolovanih iz intestinalnog trakta domaćih životinja na našem geografskom području, ima osobine enterohemoragijskih *E. coli*, tj. sojeva patogenih za ljude. Cilj ovog istraživanja bio je da se ispituju fenotipske i genotipske karakteristike VTEC izolovanih iz intestinalnog trakta goveda sa našeg geografskog područja te da se na osnovu dobijenih rezultata identifikuju enterohemoragijske *Escherichia coli* EHEC i utvrdi njihova zastupljenost u okviru grupe ispitivanih VTEC. Ukupno je ispitano 105 VTEC sojeva izolovanih iz intestinalnog trakta goveda poreklom sa farmi iz prigradskih i seoskih naselja u okolini Beograda i kod svih je PCR metodom utvrđeno prisustvo gena za verocitotoksin (*vtx*). Dokazano je da svi ovi sojevi poseduju jednu ili više *vtx* genskih sekvenci.

Prema našem istraživanju, svega se četiri (3,8%) soja, od ukupno 105 ispitanih VTEC sojeva, mogu svrstati u grupu EHEC. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da većina VTEC, izolovanih iz intes-

* Rad primljen za štampu 19. 05. 2010. godine

** Dr sci. med. Srđan Lazić, docent, dr sci. med. Novica Stajković, profesor, Institut za epidemiologiju VMA; dr vet. med Bane Dimić, Veterinarska stanica Beograd; dr sci. med. Zorica Lepšanović, dr sci. med. Milena Krstić, dr sci. med. Radovan Čekanac, docent, dr spec. epidemiolog Jovan Mladenović, dr spec. epidemiolog Žarko Jadranin, Institut za epidemiologiju VMA; dr sci. med. Sonja Radaković, docent, dr sci. med. Slavica Rađen, docent, Institut za higijenu VMA, Beograd

tinalnog trakta goveda na našem geografskom području, nema osobine sojeva patogenih za ljude – enterohemoragijskih E. coli, te su stoga oboljenja kod ljudi izazvana VTEC kod nas retka i pored toga što domaće životinje predstavljaju znatan rezervoar ovih agensa.

Ključne reči: Verocitotoksin, Escherichia coli, VTEC, EHEC, PCR, goveda

Uvod / Introduction

Verocitotoksična *Escherichia coli* (VTEC) jedna je od 6 grupa patogenih bakterija ove vrste, uzročnika crevnih zaraznih bolesti ljudi i životinja. Naziv je dobila po glavnom faktoru virulencije – verocitotoksinu (VT) (Nataro, 2002). Zbog destrukcije epitela u crevima, usled dejstva VT, kod ljudi dolazi do profuznih krvarenja i hemoragijskog kolitisa (HC). Ekstraintestinalne komplikacije VTEC infekcija su hemolitičko-uremijski sindrom (HUS) i trombotično-trombocitopenična purpura (TTP) (Griffin i Tauxe, 1991).

Na osnovu dosadašnjih ispitivanja uočeno je da sojevi VTEC, izolovani iz stolica obolelih ljudi, pored stvaranja VT, ispoljavaju i neke osobine koje se retko sreću kod ostalih VTEC sojeva: svojstvo destrukcije – brisanja mikrovilusa enterocita (*attaching and effacing lesions*), stvaranje enterohemolizina, posedovanje plazmida veličine 60 megadaltona (MDa) i pripadnost karakterističnim serološkim grupama (O26, O55, O103, O111, O113, O128, O157). Sojevi sa ovakvim osobinama označeni su terminom enterohemoragijske *E. coli* (EHEC). U grupi EHEC najpoznatije su one koje pripadaju serograpi O157 (posebno serotipu O157:H7), jer su najčešći uzročnici sporadičnih i epidemijskih enterokolitisa zbog izrazitih virulentnih svojstava (Thorpe, 2004).

Osnovni rezervoar VTEC je intestinalni trakt domaćih životinja, pre svega preživara (Hussein, 2007). Utvrđeno je da su i na našim prostorima domaće životinje često inficirane ovim patogenim agensima, ali su, kod nas, ovi bakterijski agensi redak uzročnik sporadičnih enterokolitisa, dok epidemijske pojave oboljenja izazvanih VTEC nisu registrovane (Lazić i sar., 2006; Lazić i sar., 2005).

Zbog toga se postavlja pitanje koliki procenat VTEC izolovanih iz intestinalnog trakta domaćih životinja na našem geografskom području ima osobine enterohemoragijskih *E. coli*, odnosno sojeva patogenih za ljude. Cilj ovog istraživanja bio je da se ispituju fenotipske i genotipske karakteristike VTEC izolovanih iz intestinalnog trakta goveda sa našeg geografskog područja i da se na osnovu dobijenih rezultata identifikuju EHEC i utvrdi njihova zastupljenost u okviru grupe ispitivanih VTEC.

Metode rada / Methods

Ukupno je ispitano 105 VTEC sojeva izolovanih iz intestinalnog trakta goveda poreklom sa farmi iz prigradskih i seoskih naselja u okolini Beograda.

Svojstvo produkcije verocitotoksina na Vero kulturi tkiva provereno je kod svih sojeva po metodi Karmali i sar. (1987).

Određivanje serološke pripadnosti izolovanih VTEC rađeno je aglutinacijom na pločici sa komercijalno dostupnim dijagnostičkim serumima za karakteristične EHEC serogrupe (O26, O55, O111, O128 i O157). U slučaju pozitivnog nalaza potvrda određene serogrupe rađena je aglutinacijom u epruvetama po metodi Edwardsa i Ewinga (1976). Sposobnost fermentacije sorbitola određivana je zasejavanjem ispitivanih sojeva na sorbitol-MacConkey agar (March i Ratnam, 1986). Produkcija hemolizina (alfa hemolizina i enterohemolizina) detektovana je po metodi Beutina i sar. (1989), a aerobaktina prema metodi Payne i sar. (1983). Test adherencije ispitivanih sojeva rađen je na HEp-2 kulturi tkiva (Nataro i sar., 1985). Detekcija gena za VT i njegove varijante rađena je pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR) sa specifičnim prajmerima za VT1 (*vtx1c*, *vtx1d*), VT2 (*vtx2c*, *vtx2d*) i VT2v (*vtx2v-1*, *vtx2v-2*), a sa prethodno pripremljenom DNK po metodi Birch i sar. (1996). Rezistencija ispitivanih sojeva na antibiotike rađena je disk difuzionom metodom pri čemu su korišćeni komercijalni diskovi (Institut Torlak, Beograd).

Smatralo se da ispitivani soj VTEC pripada EHEC ukoliko bi ispoljio sledeće osobine: pripadnost karakterističnoj serogrubi (O26, O55, O111, O128 ili O157) uz ispoljavanje LA na HEp-2 kulturi tkiva i/ili svojstvo stvaranja enterohemolizina.

Rezultati su prikazani tabelarno i grafički u apsolutnim i relativnim brojevima. Statistička značajnost razlika utvrđivana je pomoću neparametrijskih testova značajnosti: χ^2 test, sa ili bez Yates-ove korekcije i Fisherov tačan test. Ako je vrednost p bila manja od 0,05 ($p < 0,05$) razlika je smatrana statistički značajnom.

Rezultati / Results

Kod 105 VTEC sojeva izolovanih iz goveda rađen je PCR metod radi utvrđivanja prisustva gena za verocitotoksin (*vtx*). Dokazano je da svi ovi sojevi poseduju jednu ili više *vtx* genskih sekvenci. Pri tom je utvrđeno da 31 (29,5%) soj poseduje istovremeno *vtx1* i *vtx2* gene, a 18 sojeva (17,1%) *vtx2* i *vtx2v* genske sekvence u sastavu svog genoma. Za 15 VTEC sojeva (14,3%) utvrđeno je da sadrže *vtx1*, a za 14 (13,3%) *vtx2* gene. Kombinacija gena *vtx1*, *vtx2*, *vtx2v* nađena je kod 12 (11,4%) sojeva, dok je kod 10 (9,5%) sojeva potvrđeno prisustvo *vtx1* i *vtx2* gena. Svega 5 VTEC sojeva (4,8%) poseduje *vtx2v* gensku sekvencu (tab. 1).

Upoređivanjem fenotipskih karakteristika VTEC sojeva sa različitom kombinacijom genskih sekvenci koje kodiraju produkciju verocitotoksina uočeno je da postoje značajne razlike između pojedinih grupa u hemolitičkoj aktivnosti, kao i u vezi sa pripadnošću serološkim grupama karakterističnim za EHEC (tabele 2 i 2a). Tako su VTEC sojevi sa *vtx1*, *vtx2*, genskom kombinacijom značajno češće hemolizirali eritrocite u poređenju sa sojevima koji poseduju *vtx1* gene ($p=0,02$). Sličan rezultat dobijen je i poređenjem sojeva sa *vtx2*, *vtx2v*, genskom sekvencom

i grupa sojeva sa *vtx1* ($p < 0,005$), *vtx1 vtx2 vtx2v*, ($p = 0,01$) i *vtx2v* genotipom ($p = 0,03$). Hemolizin su, u poređenju sa *vtx1* sojevima, značajno češće posedovali i *vtx1*, *vtx2v* sojevi ($p < 0,03$) (tabela 2).

Tabela 1. *Nalaz vtx gena u VTEC sojeva izolovanih iz goveda /*
Table 1. Findings of vtx genes in VTEC strains isolated from cattle

Kombinacija <i>vtx</i> gena / <i>vtx gene combination</i>	Broj (%) VTEC sojeva izolovanih iz goveda / <i>Number (%) of VTEC strains isolated from cattle</i>
<i>vtx1, vtx2</i>	31 (29,5)
<i>vtx2, vtx2v</i>	18 (17,1)
<i>vtx1</i>	15 (14,3)
<i>vtx2</i>	14 (13,3)
<i>vtx1, vtx2, vtx2v</i>	12 (11,4)
<i>vtx1, vtx2v</i>	10 (9,5)
<i>vtx2v</i>	5 (4,8)
Ukupno / <i>Total</i>	105 (100)

VTEC – verocitotoksična *Escherichia coli* / *verocytotoxic Escherichia coli*

vtx1, vtx2, vtx2v – genske sekvence verocitotoksina / *genetic sequences of verocytotoxin*

Tabela 2. *Fenotipske karakteristike VTEC sojeva iz goveda sa različitim kombinacijama*
gena za verocitotoksin /

Table 2. Phenotypic traits of VTEC strains from cattle with different gene combinations for verocytotoxin

Kombinacija <i>vtx</i> gena / <i>vtx gene</i> <i>combination</i>	VTEC sojevi / <i>VTEC strains</i>		Produkcija hemolizina <i>Haemolysin</i> <i>production</i>		Produkcija aerobaktina / <i>Aerobactin</i> <i>production</i>		Fermentacija sorbitola / <i>Sorbitol</i> <i>fermentation</i>	
	broj / <i>number</i>	(%)	broj / <i>number</i>	(%)	broj / <i>number</i>	(%)	broj / <i>number</i>	(%)
<i>vtx1, vtx2</i>	31	(29,5)	28	(90,3)	/		21	(67,7)
<i>vtx2, vtx2v</i>	18	(17,1)	18	(100)	2		10	(5,5)
<i>vtx1</i>	15	(14,3)	9	(60)	2		9	(60)
<i>vtx2</i>	14	(13,3)	12	(85,7)	/		8	(57,1)
<i>vtx1, vtx2, vtx2v</i>	12	(11,4)	8	(66,7)	/		4	(33,3)
<i>vtx1, vtx2v</i>	10	(9,5)	10	(100)	/		4	(40)
<i>vtx2v</i>	5	(4,8)	3	(60)	/		4	(80)
Ukupno / <i>Total</i>	105		88 (83,8)		4 (3,8)		60 (57,1)	

VTEC – verocitotoksična *Escherichia coli* / *verocytotoxic Escherichia coli*

Od 12 sojeva sa *vtx1, vtx2, vtx2v* genskom kombinacijom, 5 (41,7%) je pripadalo serogrupama karakterističnim za EHEC, što se pokazalo statistički značajnim u poređenju sa *vtx1, vtx2* ($p < 0,000$), *vtx2* ($p = 0,01$), *vtx1* ($p = 0,03$), *vtx2, vtx2v* ($p = 0,05$), *vtx1, vtx 2v* ($p = 0,03$) sojevima (tabela 2a).

Tabela 2a. Fenotipske karakteristike VTEC sojeva iz goveda sa različitim kombinacijama
 gena za verocitotoksin

Table 2a. Phenotypic traits of VTEC strains from cattle with different gene combinations for verocytotoxin

Kombinacija vtx gena / vtx gene combination	VTEC sojeva iz goveda VTEC strains from cattle		EHEC serogrupa / EHEC serogroup		Rezistencija* / Resistance*		Adherencija na HEp-2 ćelije / Adherence to HEp-2 cells	
	broj / number	%	broj/ number	%	broj / number	%	broj / number	%
vtx1, vtx2	31	(29,5)	/		1	(3,2)	2	(6,6)
vtx2, vtx2v	18	(17,1)	/		3	(16,7)	5	(27,8)
vtx1	15	(14,3)	1	(6,7)	/		2	(13,3)
vtx2	14	(13,3)	/		/		1	(7,1)
vtx1, vtx2, vtx2v	12	(11,4)	5	(41,7)	2	(16,7)	/	
vtx1, vtx2v	10	(9,5)	/		/		2	(20)
vtx2v	5	(4,8)	/		/		/	
Ukupno / Total	105	(100)	6	(5,7)	6	(5,7)	12	(11,4)

*- rezistencija na antibiotike / *resistance to antibiotics*

EHEC - enterohemoragijska *Escherichia coli* / *enterohaemorrhagic Escherichia coli*

HEp-2 - kultura tkiva / *tissue culture*

Samo se 4 soja (3,8%), od ukupno 105 ispitanih VTEC sojeva, uklapaju u postavljenu definiciju enterohemoragijskih *E. coli* – EHEC (tabela 3). Svi EHEC sojevi izolovani iz zdravih goveda pripadaju serogrubi O157, produkuju enterohemolizin, a PCR metodom utvrđeno je da poseduju *vtx1*, *vtx2*, *vtx2v* gensku sekvencu koja kodira verocitotoksin. Samo jedan soj fermentuje sorbitol, dok je kod dva utvrđena rezistencija na streptomycin (tabela 3).

Tabela 3. Fenotipske karakteristike EHEC sojeva /

Table 3. Phenotypic traits of EHEC strains

Poreklo i broj EHEC sojeva / Origin and number of EHEC strains	Kombinacija vtx gena / vtx gene combination	Serogrupa / Serogroup	Produkcija hemolizina / Haemolysin production	Fermentacija sorbitola / Sorbitol fermentation	Rezistencija na antibiotike / Resistance to antibiotics
Goveda (1) / Cattle (1)	vtx1, vtx 2, vtx 2v	O 157	Enteroh.	+	Streptomycin / Streptomycin
Goveda (1) / Cattle (1)	vtx1, vtx 2, vtx 2v	O 157	Enteroh.	/	Streptomycin / Streptomycin
Goveda (1) / Cattle (1)	vtx1, vtx 2, vtx 2v	O 157	Enteroh.	/	/
Goveda (1) / Cattle (1)	vtx1, vtx 2, vtx 2v	O 157	Enteroh.	/	/

EHEC – enterohemoragijska *Escherichia coli* / *enterohaemorrhagic Escherichia coli*

vtx1, *vtx2*, *vtx2v* – genske sekvence verocitotoksina / *genetic sequence of verocytotoxin*

Enteroh. – enterohemolizin / *enterohaemolysin*

Diskusija / Discussion

Početak osamdesetih godina prošloga veka VTEC su se pojavile praktično "niotkuda" i u razvijenim zemljama Zapada izazivaju veliki broj sporadičnih slučajeva enterokolitisa, kao i brojne epidemije, od kojih je najveća zabeležena u Japanu. U siromašnim regionima sveta ovi patogeni agensi su retki uzročnici crevnih zaraza, a postotak izolacije VTEC je nizak: 0% u Brazilu, u Indiji i 1,1% u Tajlandu (Griffin i Tauxe, 1991).

I kod nas su slučajevi humanih infekcija ovim agensima izuzetno retki. U okviru ovog istraživanja ispitani su faktori virulencije VTEC sojeva poreklom iz goveda da bi se utvrdilo kolika je učestalost sojeva sa fenotipskim i genotipskim karakteristikama specifičnim za EHEC.

U skladu sa rezultatima drugih autora (Guth i sar., 2003; Zschock i sar., 2000), utvrđeno je da preko 80% VTEC izolata poreklom iz goveda proizvode enterohemolizin.

Adherencija *in vitro* nije se pokazala kao uobičajena karakteristika VTEC sojeva u ovoj studiji. Adherencija na ćelijama HEp-2 tkivne kulture manifestovala se kod svega 12 (11,4%) analiziranih VTEC sojeva, a da pritom nijedan soj nije ispoljio lokalizovanu adherenciju (LA). Ovakav nalaz mogao bi se objasniti i činjenicom da su neki autori dokazali da ovi patogeni agensi, poreklom iz životinja, retko poseduju adherentne piluse (bundle forming pili, BFP), kao i EAF plazmid (EPEC adherence factor – EAF), koji determiniše LA (Beutin i sar., 1995; WIELLER i sar., 1996).

Znatan procenat (40%) ispitivanih VTEC sojeva u ovoj studiji nije fermentovao sorbitol i pored činjenice da većina sojeva nije pripadala O157 serogrupi, za koju je inače karakteristično da ne fermentuje ovaj šećer. Ovakav rezultat u skladu je sa podacima iz jedne studije u Australiji (Đorđević i sar., 2001).

Rezistencija na antibiotike dokazana je kod 6 sojeva (5,7%) i pri tom nije registrovana rezistencija na gentamicin, amikacin i ceftriakson. Jedno istraživanje u Indiji pokazalo je da je čak 49,2% sojeva VTEC rezistentno na antibiotike (Kahan i sar., 2002), dok je u studiji objavljenoj u Francuskoj na ove lekove bilo rezistentno 4% izolata poreklom iz goveda (Pradel i sar., 2000).

Metodom PCR je dokazano da svi izolovani sojevi poseduju jednu ili više *vtx* genskih sekvenci. Naši podaci u skladu su sa onima koji su objavljeni u više različitih studija (Das i sar., 2005; Hornitzky i sar., 2005).

U vezi sa pripadnošću serogrupama karakterističnim za EHEC rezultati naše studije u saglasnosti su sa jednim ranijim domaćim istraživanjem (Čobeljčić i Dimić, 1998), ali i sa rezultatima studija drugih autora (Pradel i sar., 2000; Orden i sar., 1998; Orth i sar., 2009). Serogrupe karakteristične za EHEC dokazane su kod 6 sojeva (5,7%). Od toga 5 (4,7%) sojeva pripada serogrupi O157, dok je jedan soj pripadao serogrupi O26. Osim činjenice da su izolovani VTEC sojevi veoma retko pripadali serogrupi O157 pokazalo se da još manji procenat (3,8%)

ispitivanih sojeva poseduje takve fenotipske osobenosti po kojima se može svrstati u grupu enterohemoragijskih *E. coli* (EHEC).

Zaključak / Conclusion

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da većina VTEC izolovanih iz intestinalnog trakta goveda na našem geografskom području nema osobine sojeva patogenih za ljude – enterohemoragijskih *E. coli*, te su stoga oboljenja kod ljudi izazvana VTEC kod nas retka i pored toga što domaće životinje predstavljaju znatan rezervoar ovih agensa.

Literatura / References

1. Beutin L, Geier D, Zimmermann S, Karch H. Virulence markers of Shiga like toxin producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. J Clin Microbiol 1995; 33: 631-5.
2. Beutin L, Montenegro MA, Orskov IDA, Orskov F, Prada J, Zimmerman S & Stephan R. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1989; 27: 2559-64.
3. Birch M, Denning D W, Law D. Rapid genotyping of *Escherichia coli* O157 isolates by random amplification of polymorphic DNA. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15: 297-302.
4. Čobeljić M, Dimić B. Properties of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from feces of healthy bovines. Mikrobiologija 1998; 35: 93-101.
5. Das SC, Kahn A, Panja P, Sikdar A, Yamasaki S, Takeda Y, Bhattacharya SK, Ramamurthy T, Nair GB. Dairy farm investigation on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in Calcutta, India with emphasis on molecular characterization. Epidemiol Infect 2005 Aug;133(4): 617-26.
6. Đorđević SP, Hornitzky MA, Bailey G, Gill P, Vanselow B, Walker K, and Bettelheim A. Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian slaughter-age sheep. J Clin Microbiol 2001; 39: 2017-21.
7. Edwards PR, Ewing WH. Identification of enterobacteriaceae, 3rd ed. Burgess Publishing Co. 1976.
8. Griffin P, Tauxe R. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uraemic syndrome. Epidemiol Rev 1991; 13: 60-96.
9. Guth BE, Chinen I, Miliwebsky E, Cerqueira AM, Chillerni G, Andrade JR, Baschkier A, Rivas M. Serotypes and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from animals and food in Argentina and Brasil. Vet Microbiol 2003; 92: 335-49.
10. Hornitzky MA, Mercieca K, Bettelheim KA, Djordjevic SP. Bovine feces from animals with gastrointestinal infections are a source of serologically diverse atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* strains that commonly possess intimin. Appl Environ Microbiol 2005; 71(7): 3405-12.

11. Hussein HS. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. J Animal Science. Food safety symposium 2007; 85: E36-E72.
12. Kahn A, Yamasaki S, Sato T, Ramamurthy T, Pal A, Datta S, Chowdhury NR, Das SC, Tsukamoto T, Bhattacharya SK, Takeda Y, Nair GB. Prevalence and genetic profiling of virulence determinants of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, beef, and humans, Calcuta, India. Emerg Infect Dis 2002; 8: 54-62.
13. Lazić S, Čobeljić M, Dimić B, Opačić D, Stojanović V. Epidemiološki značaj ljudi i domaćih životinja kao rezervoara verocitotoksičnih *Escherichia coli*. Vojnosanit Pregl 2006; 63(6): 13-9.
14. Lazić S, Čobeljić M, Dimić B. Verotoksična *Escherichia coli* – patogeni agens koji ugrožava zdravlje ljudi i životinja. Veterinarski glasnik 2005; 59(5-6): 581-9.
15. March SB, Ratnam S. Sorbitol-MacConkey agar medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. J Clin Microbiol 1986; 23: 869-72.
16. Nataro JP. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*. In: Sussman M, editor. Molecular Medical Microbiology. San Diego: Academic Press 2002; 1463-503.
17. Nataro JP, Scaletsky IC, Kaper JB, Levine MM, Trabulsi L.R. Plasmid mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 1985; 48: 378-83.
18. Orden JA, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Cid D, Garcia S, Sanz R, de la Fuente R. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *eae*-positive non-VTEC in 1-30-days-old diarrhoeic dairy calves. Vet Microbiol 1998; 63: 239-48.
19. Orth D, Grif K, Zimmerhackl LB, Wurznner R. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in Austria. Wien Klin Wochenschr 2009; 121(3-4): 108-12.
20. Payne SM, Niesel DW, Peixotipo SS, Lawlor KM. Expression of hydroxamate and phenolate siderophores by *Shigella flexneri*. J Bacteriol 1983; 155: 949-55.
21. Pradel N, Livrelli V, De Champs C, Palcoux JB, Reynaud A, Scheuty F et al. Prevalence and characterization of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food and children during one-year prospective study in France. J Clin Microbiol 2000; 38: 1023-31.
22. Thorpe CM. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. Clin Infect Dis 2004; 38: 1298-303.
23. Zschock M, Hamman HP, Wolter W. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. Lett Appl Microbiol 2000; 31: 203-8.
24. Wieller LH, Vieler E, Erpenstein C, Schlapp T, Steinruck H, Bauerfeind R, Byomy A, Baljer G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes. J Clin Microbiol 1996; 34: 2980-4.

ENGLISH

**SOME TRAITS OF VEROTOXIN-PRODUCING STRAINS OF *ESCHERICHIA COLI*
ISOLATED FROM CATTLE**

**S. Lazić, N. Stajković, B. Dimić, Zorica Lepšanović, Milena Krstić, R. Čekanac,
J. Mladenović, Ž. Jadranić, Sonja Radaković, Slavica Rađen**

Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) is one of six pathogenicity groups of *Escherichia coli*. The reservoir for VTEC is the intestinal tract of domestic animals, primarily ruminants. Investigations in our geographic region have also demonstrated that domestic animals are a significant VTEC reservoir. In spite of this, sporadic diseases in humans caused by these agents are rare, and no epidemics have been registered so far. The question is, therefore, what percentage of VTEC isolated in our region have the characteristics of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) which cause intestinal diseases in humans. The aim of this study was to test the isolated bovine strains for some phenotypic and genotypic traits and to determine the percent of strains that belong to EHEC. A total of 105 VTEC strains isolated from cattle were tested for the presence of verotoxin (vtx) genes by PCR (polymerase chain reaction) method. All of them possessed one or more vtx genes. In accordance with our investigations, only four (3.8%) strains, of a total of 105 VTEC strains belong to groups of EHEC.

It may be concluded that the majority of strains isolated from cattle in this part of the world do not have phenotypic traits typical for EHEC. Therefore human VTEC-associated diseases in Serbia are rare, despite the fact that domestic animals frequently harbour VTEC.

Key words: Verotoxin, *Escherichia coli*, VTEC, EHEC, PCR, cattle

РУССКИЙ

**ХАРАКТЕРИСТИКИ ШТАММОВ ВЕРОЦИТОТОКСИН ПРОДУЦИРУЮЩИХ
ESCHERICHIA COLI, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

**С. Лазич, Н. Стайкович, Б. Димич, Зорица Лепшанович, Милена Крстич,
Р. Чеканац, Ж. Младенович, Ж. Јадранић, Соня Радакович, Славица Раджен**

Вероцитотоксическая *Escherichia coli* (ВЦЕС) одна из групп патогенных бактерий этого вида, возбудителя кишечных заразных болезней людей и животных. Бывшие до сих пор исследования в мире показали, что основной резервуар ВТЕС интестинальный тракт домашних животных, прежде всего жвачных животных. На наших пространствах домашние животные часто инфицированные этими патогенными агентами, но у нас эти бактериальные агенты редкий возбудитель спорадических этероколитов, пока эпидемические явления заболеваний, вызванных ВТЕС до сих пор не зарегистрированы. Вследствие этого ставится вопрос какой процент ВТЕС, изолированных из интестинального тракта домашних животных на нашей географической подведомственной области, имеет свойства энтерогеморрагических *E. coli*, то есть штаммов, патогенных для людей. Цель этого исследования была испытать фенотипические и генотипические характеристики ВТЕС, изо-

лированных из интестинального тракта крупного рогатого скота с нашей географической подведомственной области да на основе полученных результатов идентифицировать ЕНЕС и утвердить их редставленность в рамках группы, испытанных ВТЕС. Всего испытано 105 ВТЕС штаммов, изолированных из интестинального тракта крупного рогатого скота происхождением с ферм из пригородных и деревенских посёлков в окрестности Белграда и у всех ПЦР методом утверждено присутствие генов для веротоксин (vtx). Доказано, что эти штаммы обладают одной или больше vtx генными секвенциями. По нашему исследованию, всего четыре (3,8%) штамма из совокупно 105, испытанных ВТЕС штаммов, могут распределиться в группу ЕНЕС. На основе полученных результатов можно сделать вывод, что большинство ВТЕС, изолированных из интестинального тракта крупного рогатого скота на нашей географической подведомственной области, не имеет свойства штаммов, патогенных для людей-энтерогеморрагических *E. coli*, да оттого заболевания людей, вызваны ВТЕС у нас редкие и возле значительной редставленности домашних животных как резервуара этих агентов.

Ключевые слова: Вероцитотоксин, *Escherichia coli*, ВТЕС, ЕНЕС, ПЦР, крупный рогатый скот