

Enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* (EHEC) – zagrożeniem dla zdrowia publicznego

PIOTR CIEŚLIK, MICHAŁ BARTOSZCZE

Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii,
ul. Lubelska 2, 24-100 Puławy

Cieślik P., Bartoszcze M.

Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections: A threat to public health

Summary

Escherichia coli O157:H7 (EHEC – enterohemorrhagic *Escherichia coli*) is one of the most important foodborne and waterborne human pathogens. EHEC O157:H7 was described for the first time in 1977. Pathogenic *E. coli* can be classified into 4 main groups: diarrheagenic *E. coli*, uropathogenic *E. coli*, meningitis/sepsis *E. coli* and avian *E. coli*. The most important are the first three groups, which can cause human illness. The processes of genome dynamics, such as gene transfer, genome reduction and point mutations, contribute to the adaptation of bacteria to different environments. The genome of EHEC consists of prophage sequences (mobile elements such as transposon, pathogenicity islands (PAI) and genomic islands (GEI)). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* possesses specific virulence factors, such as Shiga toxins (Stx1 and Stx2), LEE motif, intimin (adhesion protein), enterohemolysin and others, which have not been fully described. PCR-based methods and PCR modifications (e.g. real time PCR) are usually used for rapid and specific detection of this pathogen in different samples and are often used in epidemiological investigation. Each pathogenic group contains specific serogroups, which in specific conditions may acquire pathogenicity factors, such as Shiga toxins. EHEC may be transmitted not only by various animal species, but also by insects present on vegetables and fruits. Infection is manifested by diarrhea (bloody diarrhea), fever, stomach pain and renal failure. Use of antibiotics in the treatment of EHEC infections is controversial. Therapy is based on dialysis, hemofiltration and the transfusion of packed erythrocytes — sometimes a renal transplant is needed. There is no vaccine against EHEC, and therefore good hygiene and prevention is necessary to avoid EHEC infections. EHEC O157:H7, responsible for many outbreaks around the world, is a serious threat to public health. One of the described prevention methods is the maintenance of good hygiene by both manufactures and restaurants.

Keyword: EHEC O157:H7, pathogenic *Escherichia coli*

Escherichia coli jest powszechnie występującym mikroorganizmem zasiedlającym przewód pokarmowy człowieka i zwierząt, tworzącym naturalną mikroflorę jelita. Wśród niepatogennych szczepów *E. coli* mogą jednak pojawić się bakterie zdolne do wywołowania ciężkich infekcji u ludzi. Szczepy *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC – enterohemorrhagic *Escherichia coli*) nazywane również VTEC (Verocytotoxin-producing *E. coli*) (24) są czynnikami wywołującymi zoonozy o etiologii pokarmowej. Serogrupa O157:H7 została opisana po raz pierwszy w 1977 r. przez Konowalchuka i wsp. (26), a w 1982 r. szczep O157:H7 był powiązany z dwoma epidemiami, które miały miejsce w USA, w stanach Oregon i Michigan (48). W 1983 r. bakterie te wyizolowano od pacjentów z syndromem hemolityczno-mocznicowym (HUS, haemolytic-uremic syndrome) (63). *Escherichia coli*

O157:H7 jest dominującym serotypem, występującym w USA, Argentynie, Wielkiej Brytanii oraz Japonii (14). Najczęstszymi serogrupami EHEC wywołującymi ciężkie objawy chorobowe u ludzi są: O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28, O157:H- oraz O157:H7 (11). Progowa dawka infekcyjna dla patogenych szczepów EHEC serogrupy O111:H- i O157:H7 wynosi od 1 do 100 jtk (jednostek tworzących kolonie) (17, 43).

Ostatnia epidemia w Niemczech zasygnalizowana przez system EWORS wywołana została przez nietypowy szczep Shiga producing *E. coli* (STEC), serogrupy O104:H4, zdefiniowany jako enteroagregacyjny verocytotoksyczny szczep *Escherichia coli* O104:H4 (enteroaggregative verocytotoxin-producing *Escherichia coli* – EAggEC VTEC) (www.who.int). Jak dowiedziano, źródłem zakażenia były kiełki fasoli. Do

połowy czerwca 2011 r. zgłoszonych zostało 3255 przypadków zachorowań oraz 35 zgonów wywołanych przez ten nietypowy szczep. Choroba dotknęła w 69% procentach kobiety, w większości (88%) osoby powyżej dwudziestego roku życia. W 2006 r. infekcje szczepem serogrupy O104:H4 stwierdzono u 29-letniej kobiety z krwawą biegunką i bólami brzucha (2). Do enterokrwotocznych szczepów *E. coli* należy również zaliczyć szczepy non-O157, wśród których wyodrębniono serogrupy: O26, O91, O103, O104, O111, O113, O117, O118, O121, O128 i O145. Mogą one wywołać zapalenia jelit oraz HUS. Wiele zakażeń EHEC może przebiegać bezobjawowo, przy czym szczepy non-O157 u młodych zwierząt mogą być przyczyną ciężkich infekcji układu pokarmowego (16).

Podział patogennych szczepów *Escherichia coli*

W oparciu o wywoływane przez *E. coli* objawy kliniczne można je podzielić na 4 główne grupy: a) biegunkowe (diarrheagenic), b) wywołujące choroby układu moczowego (uropathogenic *E. coli*), c) powodujące meningitis/sepsis oraz d) będące przyczyną chorób ptaków (22, 34). Biorąc pod uwagę objawy chorobowe, czynniki zjadliwości, mechanizmy patogenyzy oraz zróżnicowanie serogrup w obrębie patogennych *E. coli*, wyróżnia się 6 podgrup: 1) enterotoksyczne *E. coli* (ETEC – enterotoxigenic *E. coli*), 2) enteropatogenne *E. coli* (EPEC – enteropathogenic *E. coli*), 3) enterokrwotoczne *E. coli* (EHEC – enterohemorrhagic *E. coli*), 4) enteroagregacyjne *E. coli* (EAEC – aggregative *E. coli*), 5) enteroinwazyjne *E. coli* (EIEC – enteroinvasive *E. coli*) oraz 6) dyfuzyjnie przylegające *E. coli* (DAEC – diffusely adherent *E. coli*) (22, 34).

Szczepy ETEC wywołują biegunki u dzieci oraz odpowiadają za tzw. biegunkę podróżnych, występującą najczęściej w krajach rozwijających się. Mogą także wywoływać choroby gołębi, owiec oraz cieląt (11, 34). Po przedostaniu się do układu pokarmowego ETEC kolonizują jelito, wykorzystując w tym celu jedną lub więcej fimbrii adhezyjnych, rozpoczynając produkcję dwóch enterotoksyn: ciepłochwiennej LT (LT heat-labile toxin) i ciepłostabilnej ST (ST heat-stable enterotoxin) (7, 34). Najczęstszymi serogrupami ETEC są: O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O85, O115, O128ac, O148, O159 oraz O167 (11).

EPEC mogą sporadycznie wywoływać biegunki u dzieci i być przyczyną lokalnych epidemii, co ma miejsce najczęściej w krajach rozwijających się (11, 30, 34). W wyniku infekcji EPEC w jelicie pojawiają się charakterystyczne struktury patologiczne, nazwane zmianami A/E (attaching and effacing lesions), prowadzące do zniekształcenia usieciowienia szkieletu aktywnego komórek epitelialnych jelita (11, 30, 34). Najczęstszymi serogrupami EPEC wywołującymi choroby u ludzi są: O55, O86, O111ab, O119, O125ab oraz O142, przy czym ludzie są głównym rezerwuarem tej bakterii (11, 34).

EAEC są przyczyną przewlekłych biegunek dzieci i dorosłych notowanych na całym świecie (11, 34). Bakterie te nie wytwarzają toksyn LT i ST. W trakcie infekcji dochodzi do wytwarzania charakterystycznych skupisk bakteryjnych (które ulegają adhezji *in vitro* do komórek Hep-2), skutkiem czego pojawiają się zmiany zwane AA – aggregative adherence (35). W ich tworzeniu pośredniczą fimbrie typu I kodowane przez geny zlokalizowane na plazmidach (34). Najczęstszymi serogrupami EAEC o potencjale chorobotwórczym są: O3, O15, O44, O77, O86, O92, O111 i O127 (11).

EIEC wywołują u ludzi zarówno bezkrwawe, jak i krwawe biegunki podobne do czerwonki (11, 34). Są zdolne do przenikania oraz proliferacji w komórkach epitelialnych okrężnicy. Geny niezbędne do rozpoczęcia infekcji zlokalizowane są w plazmidzie pInV o wielkości 140 MDa (34). Do najczęściej spotykanych serogrup EIEC należą: O28ac, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164 oraz O167 (11). Ludzie są głównym rezerwuarem szczepów EIEC, jednakże zakażenia pomiędzy ludźmi są sporadyczne ze względu na wysoką progową dawkę infekcyjną patogenu (19, 34).

DAEC są główną przyczyną biegunek u dzieci w wieku między 1. a 5. rokiem życia (11, 30, 34). Wiedza dotycząca patogenności szczepów tej grupy jest niepełna (11, 30, 34). Nie produkują toksyn ST i LT i nie posiadają czynników adhezji (34). Mimo to podczas infekcji w komórkach Hep-2 pojawiają się charakterystyczne zmiany, pozwalające odróżnić je od zmian AA wywoływanych przez EAEC (11, 34). Najczęstszymi serogrupami DAEC są: O1, O2, O21 oraz O75 (11).

Spośród wielu patogennych *E. coli* odpowiedzialnych za infekcje pokarmowe u ludzi (22) największe znaczenie mają szczepy EHEC, które wywołują ostre, krwawe biegunki, zapalenie jelita oraz syndrom hemolityczno-mocznicowy będący dużym zagrożeniem dla zdrowia i życia ludzi (6). Typowe szczepy EHEC produkują toksyny Shiga (Stx1 oraz Stx2), kodowane, odpowiednio, przez geny stx1 oraz stx2, posiadają wyspę patogenności LEE (Locus of Enterocyte Effacement) oraz plazmid z obecnym na nim m.in. genem kodującym hemolizynę (6). Motyw LEE spotykany jest również u enteropatogennych szczepów *E. coli* (EPEC) oraz w genomie *Citrobacter rodentium*. Najczęstszymi serogrupami chorobotwórczymi są: O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28, O157:H-, O157:H7 (11).

Aspekty genetyczne i czynniki wirulencji EHEC

Genomy *E. coli* cechują się strukturą mozaikową, zawierającą część konserwatywną, zwaną również rdzeniem genomu oraz część zmienną, specyficzną dla określonego szczepu, z genami „obcymi”, tj. zawierającymi czynniki wirulencji, nabyte prawdopodobnie poprzez HTG (horyzontalny transfer genów) (62). W skład genów „obcych” wchodzi mobilne i dodat-

kowe elementy genetyczne (transpozony, integrony, elementy insercyjne), jak również wyspy genomowe (GEIs – genomic islands) oraz wyspy patogeniczności (PAIs – pathogenicity islands) (15, 37, 46, 58).

Czynniki wirulencji patogennych szczepów *E. coli* zlokalizowane są często na ruchomych elementach genetycznych, w związku z czym mogą być efektywnie wymieniane pomiędzy bakteriami i replikować się niezależnie od chromosomu bakteryjnego (plazmidy), funkcjonować jako episomy lub ulegać integracji z chromosomem gospodarza (profagi). Klastery genów kodujących czynniki wirulencji mogą być umiejscowione chromosomalnie lub plazmidowo (9). Nabywanie poprzez horyzontalny transfer genów wysp patogeniczności oraz spokrewnionych z nimi wysp genomowych ma znaczący wpływ na ewolucję tych bakterii (31). Wyspy patogeniczności (PAIs) oraz wyspy genomowe (GEIs) tworzą odmienną grupę mobilnych elementów genetycznych, których mechanizm transferu nadal nie jest znany, mimo że zostały one zidentyfikowane i scharakteryzowane (10).

W genetycznej bazie danych (NCBI) dostępne są 2 pełne genomy EHEC O157:H7 (20, 46). Szczep O157 Sakai w swoim genomie zawiera 18 sekwencji profagowych (Sp1-Sp18), 6 sekwencji integracyjnych (SpLE1-SpLE6) oraz 2 plazmidy. Obecność powyższych elementów w genomach tych bakterii determinuje ich potencjał chorobotwórczy. Sekwencje profagowe niosą geny *stx1* i *stx2* oraz geny kodujące składowe białka trzeciego typu systemu sekrecji (type III secretion system), a motywy LEE są klasyfikowane jako jedna z sekwencji integracyjnych (SpLE4) (38). Poza serotypem *E. coli* O157:H7 także inne szczepy *E. coli* określane jako non-O157 EHEC posiadają duży potencjał chorobotwórczy (38). Mimo że szczepy non-O157 posiadają wiele wspólnych czynników wirulencji ze szczepami O157:H7 (12, 37), to pełny zestaw genów ze szczepami non-O157:H7 nie został jeszcze opisany (38).

Analiza genomu EHEC O157:H7 wykazała, że chromosom bakteryjny składa się w 20% z obcego DNA, nabytego prawdopodobnie w wyniku horyzontalnego transferu genów. Niektóre PAI mogą pojawić się u szczepów *E. coli* należących do innych grup zdolnych do wywołania biegunki (33). Przykładem może być PAI O#122, której obecność stwierdzono w genomach większości szczepów EHEC oraz EPEC (33). Na wyspie O#122 zlokalizowane są geny uczestniczące w hamowaniu odpowiedzi immunologicznej gospodarza oraz w procesie adhezji bakterii do komórek nabłonka jelit. Opisano również wyspę PAI, pierwotnie występującą u gatunków *Yersinia*, której obecność wykryto u szczepów EHEC należących do serogrupy O26, przy czym nie występowała ona wśród serogrup O157, O103, O111 (23). Zdolność bakterii do wytwarzania Shiga-toksyn jest kluczowym, chociaż nie jedynym warunkiem wywołania objawów chorobowych. Szczepy EHEC zdolne są do kolonizacji jelita, co

w konsekwencji prowadzi do powstania charakterystycznych zmian A/E w nabłonku jelita. Opisano wiele innych czynników wirulencji ułożonych głównie na mobilnych elementach genetycznych (PAI, plazmidy) (18).

Toksyny Shiga

Toksyny Stx są głównymi czynnikami wirulencji enterokrwotocznych szczepów *E. coli* (EHEC) (6). Wyróżnia się toksynę Stx1, wykazującą wysoką homologię do toksyny typu 1 *S. dysenteriae* oraz toksynę Stx2 o 60% podobieństwie z toksyną Stx1 na poziomie aminokwasowym (6). Geny toksyn Stx zlokalizowane są w genomie w postaci profaga. Różnica pomiędzy obydwoma toksynami wynika z występowania różnych postaci (alleli) genów kodujących, przy czym gen *stx1* wykazuje mniejszą zmienność sekwencji w porównaniu do genów kodujących toksynę Stx2 (65). Zmiany te dotyczą różnic we właściwościach antygenowych oraz biologicznych powstałych białek. Wyróżnia się kilka wariantów toksyny Stx2: Stx2c, Stx2d, Stx2e oraz Stx2f (51). W zależności od typu toksyny objawy chorobowe mogą być silniejsze lub słabsze (32). U pacjentów z syndromem hemolityczno-mocznicowym (HUS) często izolowano szczepy EHEC posiadające wariant Stx2c, natomiast wariant Stx2d wykrywano u szczepów bakteryjnych wywołujących biegunki o lekkim przebiegu (6). Inne warianty toksyny Stx2 (Stx2e i Stx2f) wykryto u bakterii wyizolowanych od zwierząt (53), a Stx2e zidentyfikowano u szczepów EHEC, które wywołały odmę u świń (57). Typ Stx2d jest aktywowany przez enzym elastazę (57). Toksyny Shiga należą do rodziny białek AB₅, zbudowanych z jednej, aktywnej enzymatycznie podjednostki A oraz pięciu homologicznych podjednostek B, determinujących wiązanie się z receptorami glikolipidowymi występującymi na powierzchni komórek nabłonkowych człowieka. Geny kodujące wszystkie podjednostki toksyny zlokalizowane są w pojedynczym transkrypcie, będącym częścią sekwencji profagowej, z wyjątkiem genów kodujących wariant toksyny Stx2e zlokalizowanych na chromosomie (44). Towarzyszące infekcjom EHEC zmiany chorobowe powstają w wyniku przedostawania się toksyny Stx ze światła jelita do krwiobiegu. Mechanizmy tego procesu nie są dokładnie poznane (11, 34, 44). Toksyny Shiga powodują uszkodzenia naczyń krwionośnych okrężnicy, a LPS wchodzący w skład ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych może dodatkowo wywoływać miejscowy proces zapalny podczas infekcji *E. coli* O157:H7 (54). W trakcie choroby w stolcu osób chorych pojawiają się leukocyty (57).

Receptorami dla toksyn Shiga są glikolipidy Gb3 (globotriaosylceramide) i Gb4 (globotetraosylceramide) zawierające reszty [Gal- α 1,4-Gal] (11, 34, 46). Pierwszy z nich występuje na powierzchni komórek nabłonkowych i śródbłonowych ludzi i zwierząt. Stx1 i Stx2 wiążą się z receptorem Gb3, natomiast wariant

Stx2e wiąże się z receptorem Gb4. Po połączeniu się toksyny (lub toksyn) z receptorem dochodzi do endocytozy i przemieszczania się ich z aparatu Golgiego do retikulum endoplazmatycznego (ER – endoplasmatic reticulum) (49). Podczas transportu w aparacie Golgiego podjednostka A toksyny związana jest z furyną, białkiem będącym proteazą serynową wrażliwą na wapń. Sądzi się, że w ER mostki dwusiarczkowe podjednostki A zostają zredukowane, w wyniku czego do cytoplazmy uwalniany jest fragment A1 toksyny (39), posiadający właściwości N-glikozydazy, dzięki czemu następuje nieodwracalne usunięcie adeniny w pozycji 4324 z 28S rRNA dużej podjednostki rybosomu, co prowadzi do zablokowania miejsca przyłączania się czynnika elongacyjnego do podjednostki 60S rybosomu, zahamowania syntezy białka i w konsekwencji śmierci komórek gospodarza (36).

Motyw LEE

Enterokrwotoczne szczepy *E. coli* O157:H7 zasiedlają śluzówkę jelita, niszcząc komórki nabłonkowe, co jest główną przyczyną wystąpienia charakterystycznych zmian w obrazie histopatologicznym – A/E (6). Geny kodujące białka uczestniczące w mechanizmie A/E zlokalizowane są na dużej wyspie patogeniczności PAI nazwanej miejscem przyłączania enterocytów (Locus of Enterocyte Effacement – LEE) (34). Szczepy posiadające ten element wywołują poważne objawy chorobowe u ludzi (4). Motyw LEE składa się z trzech modułów, z których pierwszy koduje białka wchodzące w skład trzeciego typu systemu sekrecji (TTSS – type three secretion system), uczestniczące w eksporcie białek na zewnątrz komórki. Drugi moduł koduje białka sekrecyjne EspA, EspB i EspD, będące składowymi TTSS, a trzeci białka o właściwościach adhezyjnych, intyminę oraz receptor Tir (translocated intymin receptor). Białko Tir przy współudziale TTSS jest umieszczane w błonie komórkowej enterocytów. Intymina jest białkiem adhezyjnym, kodowanym przez gen *eaeA* (6), umożliwiającym bakteriom EHEC oraz EPEC przyłączanie się do powierzchni enterocytów (34). Ze względu na różnice w C-końcowym fragmencie aminokwasowym tego białka wyróżnia się 4 główne grupy intyminy: α , β , ϵ , γ (6). Pierwsza z nich występuje najczęściej u szczepów EPEC, a γ charakteryzuje serogrupy EHEC: O157, O111, i O45, podczas gdy intymina ϵ – serogrupy O103 oraz O121. Intymina β wykrywana jest u szczepów EHEC i EPEC, najczęściej wśród szczepów serogrupy O26 (66). Gen kodujący białko Tir znajdujące się na motywie LEE wykorzystuje TTSS do transportu białek efektorowych do komórek eukariotycznych. Opisano jak dotąd siedem molekuł występujących u EPEC oraz EHEC eksportowanych do komórek gospodarza. Pięć białek efektorowych kodowanych jest przez LEE: Tir/EspE, Map, EspF, EspG oraz EspH. Dwa białka efektorowe kodowane są przez sekwencje profagowe: Cif oraz NleA/EspI. Rola białek efektorowych w mecha-

nizmach patogenyzy, kodowanych przez motyw LEE nie jest szczegółowo poznana (6).

Plazmid pO157

Szczepy EHEC O157 posiadają w swoim genomie plazmid pO157 o wielkości do 92 Kb. Koduje on 35 białek, z których część zaangażowana jest w proces patogenyzy (6). Operon *hly* zbudowany jest z czterech otwartych ramek odczytu (ORF – open reading frames), kodujących białka niezbędne do syntezy oraz transportu enterohemolizyny (52). Plazmid pO157 jest strukturą dynamiczną. W jego skład wchodzi ruchome elementy genetyczne: transpozony, profagi oraz części innych plazmidów, które połączyły się w wyniku rekombinacji. Na plazmidach mogą znajdować się także inne czynniki wirulencji, jak np. gen katalazy-peroksydazy *katP* oraz gen proteazy serynowej *espP* (6).

Ważnym czynnikiem wirulencji szczepów EHEC jest gen *tox*B uczestniczący w procesie kolonizacji jelita gospodarza. Może on również stymulować ekspresję białek trzeciego typu sekrecji (TTSS) zlokalizowanego na motywie LEE oraz hamować aktywację limfocytów w organizmie gospodarza. Plazmid pO157 zawiera 100 otwartych ramek odczytu (ORF), wśród których są geny kodujące: białka wchodzące w skład drugiego typu sekrecji (*etpC-etpO*), enterohemolizynę (*hlyA-D*), enzym katalazę – peroksydazę (*katP*), proteazę serynową (*espP*), czynnik hamujący limfocyty (lymphocyte inhibitory factor – *lifA/efa*), białko *tox*B (przypuszczalna adhezyna) oraz opisaną ostatnio C1 esterazę (*StcE*) (63).

Uwarunkowania środowiskowe EHEC

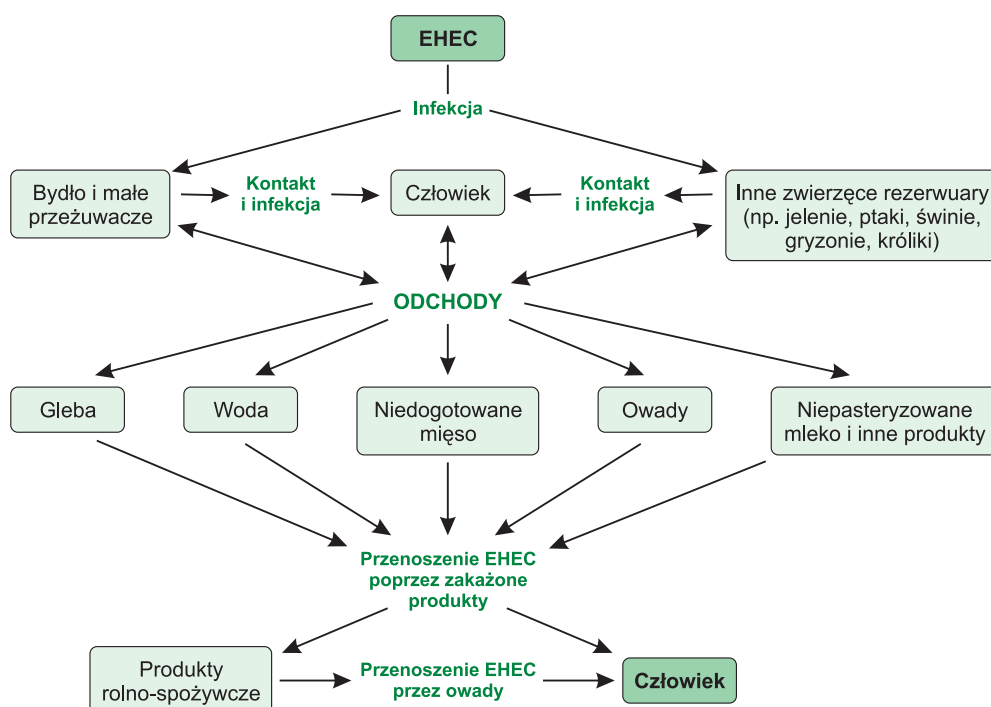
Escherichia coli O157:H7 poza przewodem pokarmowym u ludzi i zwierząt występuje w glebie, ściekach i ekosystemach wodnych. EHEC O157:H7 są zdolne do przetrwania przez długi czas w zimnej wodzie oraz przechodzenia w stan zmniejszonej aktywności metabolicznej, nazwany VBNC (viable but non-culturable state) (60). Szczepy *E. coli* O157:H7 przeżywały 8 miesięcy w ściekach gospodarczych, nie tracąc przy tym zdolności zakaźnych (29). EHEC serogrupy O157 mogą przetrwać w odchodach krowich i owczych (nie kompostowanych) nawet do 21 miesięcy, zachowując m.in. zdolności do wytwarzania toksyn Stx (27). *E. coli* O157:H7 posiadają zdolność przeżycia i namnażania się w pierwotniaku środowiskowym *Acanthamoeba polyphaga* (3), co z uwagi na jego powszechne występowanie w glebie, wodzie i odchodach sprawia, że jest on istotnym czynnikiem transmisji *E. coli* O157:H7 w środowisku (63). Dla zasiedlenia jelita szczepy EHEC muszą pokonać barierę kwaśnego środowiska żołądka. W tym procesie zaangażowane są trzy systemy indukowane obecnością kwasu: oksydacyjny (acid-induced oxidative system), zależny od argininy (acid-induced arginine dependent system) oraz system zależny od glutaminianu (gluta-

mate-dependent system). System oksydacyjny jest mniej efektywny w ochronie przed kwaśnym pH niż pozostałe dwa (63). Alternatywny czynnik sigma, RpoS, jest konieczny do prawidłowego funkcjonowania systemu oksydacyjnego, ma on jednak mniejsze znaczenie dla sprawnego działania pozostałych systemów. Indukcja tego czynnika pozwala przetrwać komórkom powyżej 28 dni w temperaturze 4°C (11). Bakterie znajdujące się w stacjonarnej fazie wzrostu są około tysiąca razy bardziej odporne na niskie pH niż bakterie znajdujące się w fazie ekspotencjalnej. Zwiększająca się oporność bakterii na obniżone pH wiąże się także z opornością na inne czynniki fizykochemiczne, jak np. tolerancja na wysoką temperaturę, promieniowanie jonizujące i substancje przeciwbakteryjne (5).

Oporność na niskie pH wiąże się z mutacjami, jakie pojawiły się w genie *rpoS* (61), co może być dodatkowo przyczyną zmiennych zdolności infekcyjnych pałeczek *E. coli* (44). Tolerancja na różne warunki środowiska często wymaga zmian w systemach ekspresji genów. Zmiany topologiczne DNA mogą tłumaczyć zróżnicowany poziom ekspresji genów, szczególnie w odpowiedzi na ekstremalne temperatury, pH, osmolarność oraz dostępność tlenu (13). Operon *ecf* zlokalizowany na plazmidzie pO157 podlega termoregulacji poprzez zmienione topologicznie DNA, nazwane BNT2 (64).

Rezerwuary i źródła zakażenia *E. coli* O157:H7

Głównym rezerwuarem szczepów VTEC (EHEC) są przeżuwacze, a zwłaszcza bydło i owce. Oprócz przeżuwaczy również inne zwierzęta, takie jak: świnie, psy, drób, konie, jelenie, szczury i dzikie ptactwo mogą być nosicielami EHEC (11, 18, 27). Rezerwuary szczepów non-O157 są słabo poznane. Serogrupę O26 wykryto u bydła, świń, owiec, kóz, królików oraz kur, jednak nie wszystkie wyizolowane szczepy należały do EHEC (16). VTEC O103 został wykryty u bydła, owiec, kóz, jak również u zdrowych i chorych ludzi. EHEC O145 rzadziej niż O26 może pojawić się u bydła (16). Jeden serotyp EHEC, O145:H- wyizolowany od kota był przyczyną infekcji dziecka, jednak niejasna była droga transmisji tego serotypu (16). Udomowione króliki mogą być rezerwuarem szczepów EHEC serogrupy O153:H- i O153:H7 (16). Stwierdzono, że źródłem zakażenia mogą być również muchy (25), zdolne do przenoszenia bakterii EHEC O157, za-



Ryc. 1. Schemat przedstawiający możliwe drogi transmisji EHEC (za zgodą Alexis Garcia i wsp., 16)

również na pokrojone, jak i na uszkodzone mechanicznie jabłka (21) oraz na zwierzęta (1). Muchy mogą również przenosić *E. coli* O157 nawet na odległe od ferm tereny (55). Do zakażenia człowieka dochodzi poprzez spożycie żywności pochodzenia zwierzęcego (niedogotowanej wołowiny, niepasteryzowanego mleka) lub bezpośredni kontakt ze zwierzętami (17, 24). Źródłem infekcji mogą być także ludzie chorzy, którzy mogą wydalać zarazek w okresie od kilku dni do trzech tygodni od wystąpienia objawów chorobowych. Do innych źródeł zakażenia zalicza się zanieczyszczoną wodę, żywność pochodzenia roślinnego, tj. sałatę, szpinak, sok jabłkowy (24). Źródłem zakażenia mogą być także ludzie chorzy. Do zakażeń ludzi może dojść w miejscach o zwiększonym kontakcie bezpośrednim m.in. w ośrodkach pomocy społecznej, domach opieki (24). Możliwe jest także zakażenie człowieka drogą wziewną z odległości około trzech metrów (16) (ryc. 1).

Objawy kliniczne i leczenie

Według WHO, do objawów klinicznych infekcji EHEC należy zaliczyć: kurcze i bóle brzucha, krwawą biegunkę, gorączkę oraz wymioty. Czas inkubacji wynosi od 3 do 8 dni, średnio około 4 dni. Większość pacjentów po 10 dniach wraca do zdrowia, jednak u dzieci i osób starszych z obniżoną odpornością infekcja może dać groźne dla życia powikłania m.in. w postaci syndromu hemolityczno-mocznicowego. Mogą pojawić się też objawy ze strony układu nerwowego (napady, śpiączka). Kluczowe znaczenie dla wyboru odpowiedniej strategii terapeutycznej ma identyfikacja czynnika etiologicznego oraz charakter objawów chorobowych (44). Obecnie stosowane meto-

dy leczenia HUS polegają na dializie, hemofiltracji, transfuzji oraz przetaczaniu płytek krwi. Często stosuje się leczenie podtrzymujące, polegające na podawaniu elektrolitów oraz specjalnej diecie (16). U niektórych pacjentów, u których wskutek infekcji doszło do nieodwracalnych zmian nerek, może być konieczne wykonanie przeszczepu (34).

Stosowanie antybiotyków przy zakażeniach bakteriami EHEC budzi wiele kontrowersji, gdyż w trakcie ich podawania naturalna flora jelitowa zostaje wyeliminowana, co może prowadzić do niekontrolowanej ekspansji *E. coli* O157:H7 w jelicie. Antybiotyki takie jak trimetoprim – sulfometoksazol i ciprofloksacyna (hamujące syntezę bakteryjnego DNA) powodują lizę komórek bakteryjnych, w efekcie czego uwalniają się wolne toksyny Stx (44). Są jednak wyniki badań wskazujące, że wczesne podanie fosfomycyny chorym znacznie obniża wystąpienie u nich HUS (34). Wczesne podanie myszom EHEC antybiotyków – fosfomycyny (FOM) oraz norfloksacyny (NFLX) zapobiegało powikłaniom i chroniło zwierzęta przed śmiercią. Leczenie antybiotykami powinno być rozpoczęte niezwłocznie po infekcji (50). U enterokrwotocznych szczepów *E. coli* serogrupy O26 wykryto transpozon Tn21 zlokalizowany na plazmidzie pO26-CRL, zawierający geny oporności na trimetoprim, streptomycynę, sulfotiazol, kanamycynę, neomycynę, β -laktamy oraz chlorek rtęci (59). W celu hamowania wystąpienia syndromu hemolityczno-mocznicowego zastosowano preparat Synsorb-Pk, oparty o oligosacharydowy komponent receptora Gb3, jednak bez dobrych rezultatów (63).

Zidentyfikowano bakteriofagi aktywne wobec *E. coli* O157:H7 (28) i próbowano wykorzystać je w leczeniu zwierząt (24). Ponieważ ekspresja genów znajdujących się na motywie LEE jest uruchamiana w odpowiedzi na adrenalinę i noradrenalinę (28), możliwe jest wykorzystanie tego mechanizmu do opracowania nowej klasy związków przeciwbakteryjnych, które łącząc się z receptorem QseC, hamują szlak sygnałowy oraz kolonizację jelita (47). Postęp w zrozumieniu mechanizmów zakażenia *E. coli* O157:H7 będzie pomocny w opracowaniu nowych terapii i immunizacji. Prowadzi się badania nad szczepionkami zawierającymi komponenty białkowe systemu TTSS (Tir, EspA i EspB) pod kątem ich zastosowania u zwierząt (24).

Badania nad opracowaniem szczepionek dla ludzi skupiają się na wykorzystaniu analogów receptora Gb3 oraz uzyskaniu przeciwciał monoklonalnych przeciwko toksynom Stx (16). W dalszej perspektywie planuje się stworzenie szczepionek przeciwko EHEC, a w tym przeciwko intyminie, LPS (lipopolisacharyd) oraz podjednostkom toksyny Stx (34).

Diagnostyka laboratoryjna

Konwencjonalne metody diagnostyki laboratoryjnej szczepów VTEC (EHEC) opiera się na wykorzystaniu podłoży różnicujących, np. SMAC. Szczepy EHEC

w większości nie rozkładają sorbitolu, co na pożywce obserwuje się w postaci bezbarwnych kolonii i dzięki temu można odróżnić je od innych gatunków z rodzaju *Enterobacteriaceae*, które są różowe. Jedną z technik używaną przy hodowli bakteryjnej jest metoda separacji immunomagnetycznej (IMS – immunomagnetic separation). Kulki magnetyczne opłaszczone przeciwciałami antyO157 łączą się z antygenem powierzchniowym komórki, co pozwala na odseparowanie bakterii i ich zagęszczenie. Opracowano kilka selektywnych pożywek dla szczepów EHEC non-O157. Jednym z nich jest podłoże MacConkeya z ramnozą zawierające cefeksym i telluryn (CT-RMAC (16). Jedną z najszybszych metod wykrywania *E. coli* O157:H7 jest łańcuchowa reakcja polimeryzacji (PCR) (34). Metoda serotypowania wykorzystująca technikę PCR została zaadaptowana do określania serotypu różnych patogennych *E. coli* (45). Dotychczas opisano 173 warianty antygeny somatycznego O, 80 wariantów antygeny otoczkowego K oraz 56 wariantów antygeny rzęskowego H (56). Po określeniu serogrupy przystępuje się do wykrywania metodą PCR czynników zjadliwości EHEC, tj.: genów stx1 i/lub stx2, kodujących toksyny Shiga, genu kodującego intyminę eaeA, oraz genu hlyA kodującego enterohemolizynę (40-42). Do serotypów obejmujących szczepy EHEC zalicza się *E. coli* O157:H7, O157:H-, oraz O26, O103, O111, O145, O91, O104, O113, O117, O118, O121, O128 (16). Dodatkowo, dostępne są testy biochemiczne pozwalające odróżnić *E. coli* od innych bakterii. Analizę biochemiczną można wykonać przy użyciu testów API, które pozwalają w ciągu 4 godzin po wstępnej hodowli, zidentyfikować gatunki bakterii. Uzupełnieniem powyższych testów mogą być również testy lateksowe, które są szybkie i łatwe w wykonaniu, przygotowane do wykrywania obecności określonych antygenów w badanym materiale (8).

Profilaktyka zakażeń

Opracowano szczegółowe procedury dotyczące postępowania z zakażonymi przez bakterie EHEC zwierzętami oraz przygotowano procedury kontroli nad odchodami gromadzącymi się podczas trwania choroby (6, 16). Zapobieganie infekcjom *E. coli* O157:H7 jest najlepszym podejściem do zahamowania szerzenia się zakażeń i wystąpienia HUS; rekomendacje dotyczące minimalizowania możliwości zachorowań dostępne są w National Association of State Public Health Veterinarians (NASPHV) (16).

Miejszem newralicznym, w którym może dojść do zanieczyszczenia mięsa bakteriami EHEC, są rzeźnie. Obserwowano korelację pomiędzy obecnością *E. coli* O157 w odchodach zwierzęcych a ich występowaniem w tuszach wołowych, co w konsekwencji prowadzi do obecności bakterii EHEC w produktach mięsnych. Jednym z kluczowych rozwiązań dla bezpieczeństwa żywności jest wprowadzenie systemu HACCP (hazard analysis and critical control point). Uwzględnia się

w nim procedury m.in. sterylizacji i dezynfekcji (autoklawowanie, mycie, pasteryzacja parowa, promieniowanie gamma). Ważnym punktem w zapobieganiu rozprzestrzeniania się infekcji EHEC u ludzi jest higiena przygotowywania posiłków w restauracjach, sieciach fast-food oraz w zapleczu domowym. Mycie owoców i warzyw przed przygotowaniem posiłków, mycie rąk, narzędzi oraz powierzchni, na której przygotowywane były surowe produkty, jest niezbędne w procesie profilaktyki (24). Do dezynfekcji należy stosować sprawdzone i skuteczne środki dezynfekcyjne, jak np. Virkon.

Piśmiennictwo

- Ahmad A., Nagaraja T. G., Zurek L.: Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 to cattle by house flies. *Prev. Vet. Med.* 2007, 80, 74-81.
- Bae W. K., Lee Y. K., Cho M. S., Ma S. K., Kim S. W., Kim N. H., Choi K. C.: A case of hemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O104:H4. *Yonsei Medical J.* 2006, 47, 437-439.
- Barker J., Humphrey T. J., Brown M. W.: Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999, 173, 291-295.
- Boerlin P., McEwen S. A., Boerlin-Petzold F., Wilson J. B., Johnson R. P., Gyles C. L.: Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37, 497-503.
- Buchanan R. L., Edelson S. G., Boyd G.: Effects of pH and acid resistance on the radiation resistance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 1999, 62, 219-228.
- Caprioli A., Morabito S., Brugere H., Oswald E.: Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: Emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* 2005, 36, 289-311.
- Cassels F. J., Wolf M. K.: Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. *J. Ind. Microbiol.* 1995, 15, 214-226.
- Deisingh A. K., Thompson M.: Strategies for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *J. Appl. Microbiol.* 2004, 96, 419-429.
- Dobrindt U.: (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2005, 295, 357-371.
- Dobrindt U., Giedam Chowdary M., Krumbholz G., Hacker J.: Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. *Med. Microbiol. Immunol.* 2010, 199, 145-154.
- Doyle M. P., Beuchat L. R., Montville T. J.: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington DC 2001, 171-191.
- Eklund M., Scheut F., Siitonen A.: Clinical isolates of non-O157 Shiga-toxin producing *Escherichia coli*: Serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 2829-2834.
- Falconi M., Colonna B., Prosseda G., Micheli G., Gualerzi C. O.: Thermo-regulation of Shigella and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of virF promoter to transcriptional repressor H-NS. *EMBO J.* 1998, 17, 7033-7043.
- FoodNet Surveillance Report for 2004 (Final Report) FoodNet Foodborne Diseases Active Surveillance Network CDC's Emerging Infections Program 2004.
- Gal-Mor O., Finlay B. B.: Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol.* 2006, 8, 1707-1719.
- Garcia A., Fox J. G., Besser T. E.: Zoonotic enterohemorrhagic *Escherichia coli*: a one health perspective. *IRAL J.* 2010, 51, 221-232.
- Griffin P. M., Bell B. P., Cieslak P. R., Tuttle J., Barrett T. J., Doyle M. P., Haines R. J.: Farm to fork; a strategy for meat safety in Ontario. [w:] Report of the meat regulatory and inspection review, Ministry of the Attorney General, Ontario Publications, Toronto, Canada 2004.
- Hancock D. D., Besser T. E., Kinsel M. L., Tarr P. I., Rice D. H., Paros M. G.: The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. *Epidemiol. Infect.* 1994, 113, 199-207.
- Harris J. R., Mariano J., Wells J. G., Payne B. J., Donnell H. D., Cohen M. L.: Person-to-person transmission in an outbreak of enteroinvasive *Escherichia coli*. *Am. J. Epidemiol.* 1985, 122, 245-252.
- Hayashi T. et al.: Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* 2001, 8, 11-22.
- Janisiewicz W. J., Conway W. S., Brown M. W., Sapers G. M., Fratamico P., Buchanan R. L.: Fate of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut apple tissue and its potential for transmission by fruit flies. *Appl. Env. Microbiol.* 1999, 65, 1-5.
- Kaper J. B., Nataro J. P., Mobley H. L.: Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004, 2, 123-140.
- Karch H., Schubert S., Zhang D., Zhang W., Schmidt H., Olschlager T., Hacker J.: A genomic island, termed high-pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infect. Immun.* 1999, 67, 5994-6000.
- Karmali M. A., Gannon V., Sargeant J. M.: Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet. Microbiol.* 2010, 140, 360-370.
- Kobayashi M., Sasaki T., Saito N., Tamura K., Suzuki K., Watanabe H., Agui N.: Houseflies: not simple mechanical vectors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999, 61, 625-629.
- Konowalchuk J., Speirs J. I., Stavric S.: Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1977, 18, 775-779.
- Kudva I. T., Blanch K., Hovde C. J.: Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64, 3166-3174.
- Kudva I. T., Jelacic S., Tarr P. I., Hovde C. J.: Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-specific bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 3767-3773.
- LeJeune J. T., Besser T. E., Hancock D. D.: Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 3053-3057.
- Levine M. M.: *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 1987, 155, 377-389.
- Malek W., Wdowiak-Wróbel S., Kalita M., Studzińska B., Szlachetka M., Bartoszcze M., Gryko R.: Wyspy patogeniczności. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 1026-1029.
- Meyer-Brosset S., Bastian S. N., Arne P. D., Cerf O., Sanaa M.: Review of epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with *Escherichia coli* serogroup O157:H7. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2001, 203, 347-361.
- Morabito S., Tozzoli R., Oswald E., Caprioli A.: A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 2003, 71, 3343-3348.
- Nataro J. P., Kaper J. B.: Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11, 142-201.
- Nataro J. P., Kaper J. B., Robins-Brown R., Prado V., Vial P., Levine M. M.: Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1987, 6, 829-831.
- O'Brien A. D., Tesh V. L., Donohue-Rolfe A., Jackson M. P., Olsnes S., Sandvig K., Lindberg A. A., Keusch G. T.: Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1992, 180, 65-94.
- Ogura Y., Ooka T., Asadulghani, Terajima J., Nougayrède J. P., Kurokawa K., Tashiro K., Tobe T., Nakayama K., Kuhara S., Oswald E., Watanabe H., Hayashi T.: Extensive genomic diversity and selective conservation of virulence-determinants in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serotypes. *Genome Biol.* 2007, 8, R138.
- Ogura Y., Ooka T., Iguchi A., Toh H., Asadulghani M., Oshima K., Kodama T., Abe H., Nakayama Z., Kurokawa K., Tobe T., Hattori M., Hayashi T.: Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *PNAS* 2009, 106, 17939-17944.
- O'Loughlin E. V., Robins-Browne R. M.: Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes Infect.* 2001, 3, 493-507.
- Osek J.: Detection of cytolethal distending toxin genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from different sources. *Bull. Vet. Inst. Puławy* 2005, 49, 153-156.
- Osek J.: Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. *J. Appl. Microbiol.* 2003, 95, 1217-1225.
- Osek J.: Rapid and specific identification of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in feces by multiplex PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 2002, 34, 304-310.
- Paton A. W., Ratcliff R., Doyle R. M., Seymour-Murray J., Davos D., Lanser J. A., Paton J. C.: Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 1622-1627.
- Paton J. C., Paton A. W.: Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin – producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11, 450-479.

45. Perelle S., Dilasser F., Grout J., Fach P.: Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol. Cell. Probes* 2004, 18, 185-192.
46. Perna N. T., Plunkett G. III, Burland V. et al.: Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 2001, 409, 529-533.
47. Rasko D. A., Moreira C. G., Li D. R., Reading N. C., Ritchie J. M., Waldor M. K., Williams N., Taussing R., Wei S., Roth M., Hughes D. T., Huntley J. F., Fina M. W., Falck J. R., Sperandio V.: Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. *Science* 2008, 321, 1078-1080.
48. Riley L. W., Remis R. S., Helgerson S. D., McGee H. B., Wells J. G., Davis B. R., Hebert R. J., Olcott E. S., Johnson L. M., Hargrett N. T., Blake P. A., Cohen M. L.: Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 1983, 308, 681-685.
49. Sandvig K., van Deurs B.: Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett.* 2002, 529, 49-53.
50. Sawamura S., Tanaka K., Koga Y.: Therapeutic effects of antibiotics against enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 (O157) infection: in vivo analysis using germfree mice. *Kansenshogaku Zasshi.* 1999, 73, 1054-1063.
51. Scheut F., Beutin L., Pierard D., Smith H. R.: Nomenclature of Verocytotoxins, [w:] Duffy G., Garvey P., McDowell D. (eds.): Verocytotoxigenic *Escherichia coli*. Food & Nutrition Press Inc. Trumbull, 2001, 447-452.
52. Schmidt H., Bitzan M., Karch H.: Pathogenic aspects of Shiga toxin-producing *E. coli* infections in humans, [w:] Duffy G., Garvey P., McDowell D. (eds.): Verocytotoxigenic *Escherichia coli*. Food & Nutrition Press Inc., Trumbull 2001, 241-262.
53. Schmidt H., Scheef J., Morabito S., Caprioli A., Wieler L. H., Karch H.: A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons, *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 1205-1208.
54. Siegler R. L., Pysher T. J., Lou R., Tesh V. L., Taylor F. B. Jr.: Response to Shiga toxin-1, with and without lipopolysaccharide, in a primate model of hemolytic uremic syndrome. *Am. J. Nephrol.* 2001, 21, 420-425.
55. Talley J. L., Wayadande A. C., Wasala L. P., Gerry A. C., Fletcher J., DeSilva U., Gilliland S. E.: Association of *Escherichia coli* O157:H7 with filth flies (Muscidae and Calliphoridae) captured in leafy greens field and experimental transmission of *E. coli* O157:H7 to spinach leaves by house flies (Diptera; Muscidae). *J. Food Prot.* 2009, 72, 1547-1552.
56. Tenaillon O., Skurnik D., Bertrand P., Denamur E.: The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010, 8, 207-217.
57. Thorpe C. M.: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Clin. Infect. Dis.* 2004, 38, 1298-1303.
58. Tobe T., Beatson S. A., Taniguchi H. et al.: An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 14941-14946.
59. Venturini C., Beatson S. A., Djordjevic S. P., Walker M. J.: Multiple antibiotic resistance gene recruitment onto the enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence plasmid. *FASEB J.* 2010, 24, 1160-1166.
60. Wang G., Doyle M. P.: Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *J. Food. Prot.* 1998, 61, 662-667.
61. Waterman S. R., Small P. L.: Characterization of the acid resistance phenotype and rpoS alleles of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1996, 64, 2808-2811.
62. Welch R. A., Burland V., Plunkett G. 3rd et al.: Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 17020-17024.
63. Yoon J. W., Hovde C. J.: All blood, no stool: enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *J. Vet. Sci.* 2008, 9, 219-231.
64. Yoon J. W., Minnich S. A., Ahn J. S., Park Y. H., Paszczynski A., Hovde C. J.: Thermoregulation of the *Escherichia coli* O157:H7 pO157 ecf operon and lipid A myristoyl transferase activity involves intrinsically curved DNA. *Mol. Microbiol.* 2004, 51, 419-435.
65. Zhang W., Bielaszewska M., Kuczius T., Karch H.: Identification, characterization and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx1c) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 1441-1446.
66. Zhang W. L., Kohler B., Oswald E., Beutin L., Karch H., Morabito S., Caprioli A., Suerbaum S., Schmidt H.: Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 4486-4492.

Adres autora: mgr inż. Piotr Cieřlik, ul. Lubelska 2, 24-100 Puławy;
e-mail: pcieslik@wihe.pulawy.pl