

Mleko i produkty mleczne jako źródło zakażeń pokarmowych u ludzi powodowanych przez *Escherichia coli*

JOLANTA G. ROLA, JACEK OSEK

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Państwowy Instytut Weterynaryjny
– Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 01.10.2013

Zaakceptowano 18.12.2013

Rola J. G., Osek J.

Milk and milk products as a source of food-borne infections caused by *Escherichia coli*

Summary

Verotoxigenic *E. coli* (VTEC) can cause various diseases, from non-bloody diarrhoea, through haemorrhagic colitis, to haemolytic uraemic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura in humans, especially in young children and the elderly. Ruminants, particularly cattle, are the main natural reservoir for VTEC. These animals are asymptomatic carriers and excretors of this pathogen and visually are indistinguishable from uninfected animals. Outbreaks of VTEC infection in humans are associated mainly with the consumption of contaminated food. There is evidence that raw cow milk can be one of these sources of infection. Contamination of milk can occur during the milking process or after pasteurization due to poor hygiene practices. It has also been found that some strains of VTEC can survive during the cheese making process and cheeses manufactured from contaminated milk can be responsible for disease in humans. This review article discusses the problem of food-borne infections caused by milk and milk products contaminated with VTEC.

Keywords: milk, milk products, verotoxigenic *E. coli* VTEC

Mleko krowie stanowi ważny składnik diety wielu ludzi na całym świecie. Jest ono także surowcem do produkcji serów i przetworów mlecznych. Pozyskiwane od krów zdrowych, w prawidłowych warunkach higienicznych, charakteryzuje się niską ogólną liczbą drobnoustrojów oraz komórek somatycznych. Według aktualnie obowiązujących wymagań, surowe mleko krowie przeznaczone do skupu nie powinno zawierać więcej niż 100 tysięcy bakterii i do 400 tysięcy komórek somatycznych w 1 ml, w mleku mogą jednak występować drobnoustroje chorobotwórcze, odpowiedzialne za schorzenia pokarmowe u ludzi. W piśmiennictwie opisano przypadki zatruc pokarmowych związane z konsumpcją mleka surowego, mleka poddanego niewłaściwej obróbce termicznej lub mleka, które uległo kontaminacji po procesie pasteryzacji. Przyczyną zatruc były także sery wyprodukowane z mleka surowego zanieczyszczonego bakteriami z rodzaju *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Zakażenie werotoksycznymi szczepami *E. coli*, zwłaszcza serotypu O157:H7, może powodować u ludzi poważne konsekwencje zdrowotne. Celem artykułu jest przedstawienie danych na temat zatruc pokarmowych

związanych ze spożyciem mleka lub produktów mlecznych zanieczyszczonych szczepami *E. coli*.

Bakterie *E. coli* to Gram-ujemne, niezarodnikujące pałeczki należące do rodziny *Enterobacteriaceae*. Stanowią one naturalny składnik mikroflory przewodu pokarmowego człowieka oraz zwierząt, gdzie uczestniczą w utrzymaniu jego homeostazy poprzez udział w rozkładzie pokarmu i syntezie wielu istotnych dla organizmu składników. Drobnoustroje te mogą występować także w wodzie, glebie oraz mleku i innej żywności, która została wtórnie zanieczyszczona odchodami zwierząt. Stopień zanieczyszczenia mleka i jego przetworów przez *E. coli* jest, z jednej strony, odzwierciedleniem stanu zdrowotnego wymienia krów i higieny pozyskiwania mleka, a z drugiej – wskaźnikiem higieny procesów technologicznych stosowanych w przemyśle mleczarskim. Niektóre szczepy *E. coli* posiadają zdolność wytwarzania czynników patogenności i mogą wywoływać u ludzi choroby przewodu pokarmowego i zakażenia pozajelitowe. Aktualnie wśród chorobotwórczych *E. coli* (intestinal pathogenic *E. coli*, IPEC) wyróżnia się 6 różnych grup szczepów związanych z chorobami wywoływanymi przez zanieczyszczoną

żywność: werotoksyczne *E. coli* (verocytotoxin producing *E. coli*, VTEC), enterotoksyczne *E. coli* (enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), enteroinwazyjne *E. coli* (enteroinvasive *E. coli*, EIEC), enteropatogenne *E. coli* (enteropathogenic *E. coli*, EPEC), enteroagregacyjne *E. coli* (enteroaggregative *E. coli*, EAEC) i szczepy enteroadhezyjne charakteryzujące się rozszanym typem adhezji (diffusely adherent *E. coli*, DAEC).

Dotychczas stwierdzono ponad 400 serotypów *E. coli* zaliczanych do szczepów VTEC, które określane są także jako shigatoksyczne *E. coli* (Shigatoxin producing *E. coli*, STEC). Wspólną cechą szczepów należących do tej grupy jest zdolność produkcji werocytotoksyn (Verocytotoxins, VT), które działają silnie cytotoksycznie na komórki linii komórkowej Vero. Pierwotnie wyodrębniono dwie odmiany werocytotoksyny: VT1 i VT2. Obecnie w obrębie typu VT1 wyróżnia się 3 podtypy werocytotoksyn (VT1a, VT1c i VT1d), a w VT2 – 7 podtypów (VT2a, VT2b, VT2c, VT2d, VT2e, VT2f, VT2g) (31).

Spośród chorobotwórczych dla człowieka *E. coli* najważniejsze są szczepy serotypu O157:H7 (23). Posiadają one zdolność przeżywania w zamrożonej (-20°C) żywności przez kilka miesięcy. Charakteryzują się także wysoką opornością na działanie niskiego pH, dzięki czemu zachowują żywotność w kwaśnym środowisku żołądka oraz zdolność do kolonizacji dalszych odcinków układu pokarmowego (13). Dawka infekcyjna dla serotypu *E. coli* O157 jest niska i wynosi zaledwie żywych 10 komórek bakteryjnych (9). Niska dawka infekcyjna powoduje, że łatwo dochodzi do transmisji zakażenia poprzez bezpośredni kontakt z osobami chorymi, jak i za pośrednictwem zanieczyszczonej żywności, wody lub środowiska. Okres inkubacji choroby przy zakażeniu szczepami VTEC wynosi najczęściej 2-4 dni.

U ludzi werotoksyczne szczepy *E. coli* wywołują przede wszystkim krwotoczne zapalenie okrężnicy (hemorrhagic colitis – HC). Przebieg kliniczny choroby może być zróżnicowany, od bezobjawowego do krwawych biegunek o ciężkim przebiegu. U zakażonych osób choroba rozpoczyna się najczęściej od wodnistej biegunki, której towarzyszą: gorączka, silne bóle brzucha, nudności i wymioty. Po kilku dniach biegunka staje się krwista. W przebiegu choroby może dochodzić do powikłań w postaci zespołu hemolityczno-mocznicowego (hemolytic uremic syndrome – HUS) i małopłytkowej plamicy zakrzepowej (thrombotic thrombocytopenic purpura – TTP), które mogą być przyczyną śmierci chorego. Pierwsze z wymienionych powikłań występuje przede wszystkim u małych dzieci i osób starszych, i charakteryzuje je triada zaburzeń: mikroangiopatyczna niedokrwistość hemolityczna, trombocytopenia i ostra niewydolność nerek prowadząca do skąpomoczu. U chorych stwierdza się podwyższone stężenie mocznika i kreatyniny w surowicy krwi. Powikłanie to dotyczy 5-8% wszystkich przypadków krwotocznego zapalenia okrężnicy. W Irlandii, w latach 1999-2002, komplikację w postaci zespołu hemolityczno-mocznicowego stwierdzono u 9% dorosłych oraz

u 12,5% małoletnich pacjentów z HC (16). Według raportu EFSA (12), w 2010 r. w krajach członkowskich UE potwierdzono laboratoryjnie 222 przypadki powikłań w postaci zespołu HUS. Większość zachorowań związana była z zakażeniami na tle *E. coli* O157 (42,5% przypadków) i dotyczyła dzieci w przedziale wiekowym 0-4 lat (65,8% powikłań). W analogicznym raporcie za 2011 r. (11) liczba powikłań z zespołem HUS była wyraźnie wyższa niż w 2010 r. i wynosiła 1006 przypadków, jednak aż 318 z nich związana była z epidemią na tle O104:H4. Szczepy serotypu O157 były odpowiedzialne za zachorowania głównie u dzieci w wieku do lat 14, podczas gdy u osób w przedziale wiekowym powyżej 14 lat dominowały szczepy serotypu O104 (11). Powikłanie w postaci TTP stwierdzane jest rzadziej, dotyczy z reguły osób dorosłych i charakteryzuje się wyraźnym spadkiem liczby płytek krwi. U pacjentów z ciężkim przebiegiem krwotocznego zapalenia okrężnicy wykazywano najczęściej szczepy VTEC wytwarzające werocytotoksyny VT2 i VT2c.

Naturalnym rezerwuarem szczepów VTEC są przeżuwacze, przede wszystkim bydło. Zwierzęta te są najczęściej bezobjawowymi nosicielami i siewcami omawianych bakterii. Długość okresu siewstwa zależy między innymi od wieku zwierząt i pory roku. U cieląt siewstwo utrzymuje się dłużej niż u bydła dorosłego, a latem liczba wydalanych bakterii jest zdecydowanie wyższa niż w innych porach roku. Siewstwo może występować u różnego odsetka zwierząt w stadzie. W Wielkiej Brytanii obecność szczepów VTEC O157 stwierdzono w 4,7% i ponad 20% próbek pobranych od bydła (25). W badaniach przeprowadzonych przez Hussein i Sakuma (17) odsetek bydła mlecznego wydającego szczepy VTEC z kałem wahał się od 0,2% do 48,8%. Wyizolowane szczepy, które miały związek z zachorowaniami u ludzi należały do grup serologicznych O2, O22, O26, O113 i O145. Blanco i wsp. (3) po zbadaniu 514 izolatów VTEC pochodzących z kału bydła wykazującego objawy biegunki stwierdzili, że 20% szczepów posiadało gen *vtx1*, 54% – gen *vtx2*, a 26% szczepów zarówno *vtx1* jak i *vtx2*.

Na początku lat osiemdziesiątych XX w. szczepy VTEC O157:H7 zostały zidentyfikowane jako groźny czynnik zakaźny, który może być obecny w mleku krowim (4). Bakterie te występują w przewodzie pokarmowym bydła i jeśli nie są zachowane odpowiednie warunki sanitarno-higieniczne podczas udoju, mogą one przedostać się do mleka. Przyjmuje się, że najważniejszymi źródłami zanieczyszczenia mleka są: powierzchnia wymienia i strzyków, skóra i sierść krowy oraz urządzenia i naczynia używane do doju. Według raportu Komitetu Naukowego ds. Środków Weterynaryjnych dotyczących Zdrowia Publicznego w zakresie werotoksycznych szczepów *E. coli* w żywności (Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on Verotoxigenic *E. coli* in Foodstuffs), mleko surowe oraz produkty mleczne wytworzone z mleka surowego należą do środków spożywczych stanowiących największe ryzyko zaka-

żenia człowieka szczepami VTEC (10). Konsumpcja surowego mleka oficjalnie dozwolona jest tylko w niektórych krajach. W Anglii, Walii i Irlandii Pn. surowe mleko mogą sprzedawać konsumentowi końcowemu tylko gospodarstwa z zarejestrowaną produkcją mleka. Natomiast w Szkocji sprzedaż mleka surowego jest zakazana od 1983 r., kiedy to stwierdzono zachorowania u ludzi po spożyciu takiego mleka. Zgodnie z szacunkami Animal Health Dairy Hygiene Inspectorate w Wielkiej Brytanii konsumpcja surowego mleka krowiego wynosi 0,01% całości sprzedawanego mleka. W Anglii i Walii, w latach 1992-2000 52% wszystkich przypadków zatruc pokarmowych u ludzi z udziałem produktów mlecznych było spowodowanych spożyciem mleka surowego (15). Spośród drobnoustrojów izolowanych od chorych, szczepy VTEC O157 były przyczyną zachorowań w 37% przypadków. Inni autorzy (8) wskazują, że w Wielkiej Brytanii w latach 1992-1996 stwierdzono 20 zatruc pokarmowych związanych z mlekiem i produktami mlecznymi. W 16 przypadkach przyczyną zachorowań było mleko, z tego w 10 mleko niepasteryzowane. Z wymienionych przypadków najczęściej izolowano bakterie z rodzaju *Salmonella* (55%), *Campylobacter* (25%) i VTEC O157 (15%). Murphy i wsp. (23) badając mleko pochodzące z 97 irlandzkich gospodarstw hodowlanych, wyizolowali *E. coli* O157:H7 z 12% próbek. W Austrii opisano dwa przypadki zespołu hemolityczno-mocznicowego po spożyciu niepasteryzowanego mleka krowiego zanieczyszczonego szczepem VTEC O26 (1).

Źródłem zakażeń szczepami VTEC może być także mleko poddane niewłaściwej obróbce termicznej lub mleko, które po procesie pasteryzacji uległo wtórnemu zanieczyszczeniu bakteriami *E. coli*. Gillespie i wsp. (15) wykazali, że w Anglii i Walii między 1992 a 2003 rokiem 37% przypadków zatruc pokarmowych u ludzi było spowodowanych przez takie mleko. Jedno z największych masowych zakażeń ludzi, którego przyczyną było zanieczyszczone wtórnie mleko pasteryzowane odnotowano w 1994 r. w Szkocji. Zakażeniu szczepem *E. coli* O157:H7 uległo wówczas ponad 100 osób, w tym u dziewięciorga dzieci doszło do powikłań w postaci HUS, a u jednej osoby dorosłej w postaci TTP (33).

Zachorowania u ludzi stwierdzono także po konsumpcji sera zanieczyszczonego chorobotwórczymi szczepami *E. coli*. W USA, pierwszy dobrze udokumentowany tego typu przypadek zatrucia pokarmowego ludzi stwierdzono w 1971 r. Źródłem zakażenia był importowany z Francji miękki dojrzewający ser camembert zanieczyszczony szczepem EIEC O124. W trakcie dochodzenia epidemiologicznego ustalono, że bakterie *E. coli* przedostały się do łańcucha produkcyjnego w wyniku awarii systemu filtrującego wodę, która była używana do mycia urządzeń produkcyjnych (21). We Francji, w 1996 r. stwierdzono 4 przypadki zespołu hemolityczno-mocznicowego u dzieci wywołane przez szczep *E. coli* O157 VT2 po spożyciu sera przygotowanego z niepasteryzowanego mleka krowiego i koziego (7). W Szkocji, mimo obowiązującego zakazu

sprzedaży w handlu detalicznym surowego mleka krowiego, w latach 1994-1999 r. odnotowano 3 zatrucia pokarmowe na tle VTEC O157 po spożyciu sera wyprodukowanego z mleka niepasteryzowanego (27). W dochodzeniu epidemiologicznym ustalono, że warunki sanitarno-higieniczne w pomieszczeniach produkcyjnych zakładów wytwarzających te sery były zadowalające, jednakże w dwóch zakładach stwierdzono, że mleko surowe było przechowywane w temperaturze umożliwiającej namnażanie się bakterii. Ponadto ustalono, że w jednej z wytwórni do produkcji sera nie stosowano kultur starterowych, a w innym okresie dojrzewania sera był zbyt krótki, aby doszło do obniżenia pH do takiego poziomu, który hamowałoby namnażanie się bakterii w produkcie końcowym. W 1998 r. w Wisconsin (USA) doszło do masowego zakażenia ludzi szczepem *E. coli* O157:H7. Badaniem laboratoryjnym potwierdzono infekcję u 55 osób, której źródłem był świeży twaróg wyprodukowany w kadziach używanych wcześniej do produkcji sera z mleka niepasteryzowanego (5). Między 1982 r. a 2002 r. w USA odnotowano 4 masowe zachorowania związane z konsumpcją mleka surowego i 3 ze spożyciem produktów mlecznych przygotowanych z mleka surowego (26). Według innego opracowania, w latach 1993-2006, w 30 stanach USA odnotowano 122 przypadki zatruc pokarmowych spowodowanych przez produkty mleczne, z tego 73 (60%) przez produkty niepasteryzowane. W 46 przypadkach przyczyną zachorowań było niepasteryzowane mleko, a w 27 ser wyprodukowany z mleka niepasteryzowanego. Łącznie zachorowało 1571 osób, w tym 202 osoby hospitalizowano, z których 2 zmarły. Na podstawie wyników badań laboratoryjnych stwierdzono, że bakterie *E. coli* były odpowiedzialne za 9 (13%) przypadków zachorowań (19).

Zjawisko oporności niektórych szczepów *E. coli* O157:H7 na niskie pH skłoniło badaczy do podjęcia badań nad przeżywalnością tego patogenu w procesie produkcji serów dojrzewających wytwarzanych z mleka surowego. Jordan i wsp. (18) stwierdzili, że niektóre szczepy *E. coli* O157:H7 przeżywały nawet w pH 3. Reitsma i Henning (28) izolowali *E. coli* O157 z sera cheddar po 60 dniach jego dojrzewania. Gdy do produkcji sera użyto mleka zawierającego 10^3 cfu/ml *E. coli* O157 stwierdzono, że miano bakterii zmniejszyło się o 2 log po 60 dniach dojrzewania sera, jednakże izolowano ten szczep nawet po 158 dniach. Badania wykonane przez Schlessler i wsp. (31) potwierdziły, że 60-dniowy okres dojrzewania sera cheddar był niewystarczający do eliminacji *E. coli* O157:H7.

Mimo że mleko surowe oraz sery wyprodukowane z takiego mleka były przyczyną zakażeń ludzi bakteriami *E. coli*, to wyniki dotychczasowych badań wskazują, że patogen ten nie występuje często w wym. produktach. W Wielkiej Brytanii nie stwierdzono obecności *E. coli* O157 w żadnej z 1146 badanych próbek mleka surowego i miękkih serów oraz próbek z linii produkcyjnych i odchodów bydła (24). Autorzy innych badań przeprowadzonych w latach 1996-1997 na 1097 próbkach niepasteryzowanego mleka z 242 punktów

sprzedaży detalicznej w Anglii i Walii wykryli zaledwie 3 przypadki obecności *E. coli* O157 (20). W Hiszpanii, w badaniach, którymi objęto produkty z mleka krowiego i koziego, obecność szczepów VTEC wykryto w próbkach mleka zbiorczego, w świeżym twarogu oraz w serze (29). Według dostępnych danych stopień zanieczyszczenia produktów mlecznych szczepami zaliczanymi do VTEC nie jest wysoki. Foschino i wsp. (14) w próbce mleka koziego stwierdzili zanieczyszczenie szczepem *E. coli* O157 na poziomie 15 bakterii/10 ml. W badaniach D'Amico i wsp. (6) zanieczyszczenie próbek mleka tym samym szczepem wynosiło < 1 jtk/ml. Mimo że wyniki badań wskazują na niski stopień zanieczyszczenia produktów mlecznych szczepami VTEC, sugeruje się ostrożność w ich interpretacji, gdyż wykazano że bakterie *E. coli* O157 nie są równomiernie rozmieszczone w produktach i mogą występować w postaci skupisk, co może utrudniać ich wykrycie (2).

Przedstawione dane wskazują, że mleko surowe może być źródłem zakażenia ludzi bakteriami *E. coli*, w tym chorobotwórczymi dla człowieka szczepami werotoksycznymi, zwłaszcza serotypu O157. Ryzyko to zwiększa obserwowany w ostatnich latach wzrost popularności konsumenckiej mleka surowego i produktów wytwarzanych z tego mleka. Ponadto zdolność szczepów należących do serotypu O157 do przeżywania procesów produkcji (w tym dojrzewania) serów, stwarza dodatkowe zagrożenie dla zdrowia konsumentów. W celu ograniczenia ryzyka masowego zakażenia ludzi bakteriami *E. coli* za pośrednictwem mleka surowego i produktów wytwarzanych z mleka surowego, należy zapewnić wysoką jakość higieniczną surowca i przestrzegać zasad GHP w procesie produkcyjnym.

Piśmiennictwo

- Allerberger F., Friedrich A. W., Grif K., Dierich M. P., Dornbusch H. R., Mache C. J., Nachbaur E., Freilinger M., Rieck P., Wagner M., Caprioli A., Karch H., Zimmerhackl L. B.: Hemolytic-uremic syndrome associated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H infection and consumption of unpasteurized cow's milk. *Int. J. Infect. Dis.* 2003, 7, 42-45.
- Auty M. A. E., Duffy G., O'Beirne D., McGovern A., Gleeson E., Jordan K.: In situ localisation of *Escherichia coli* O157:H7 in food by confocal scanning laser microscopy. *J. Food Prot.* 2005, 68, 482-486.
- Balco M., Blanco J. E., Mora A., Dahbi G., Alonso M. P., Gonzalez E. A., Bernardez M. I., Blanco J.: Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae- ζ). *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 645-651.
- Bryan F.: Epidemiology of milk-borne diseases. *J. Food Prot.* 1983, 46, 637-649.
- Centers for Disease Control and Prevention: Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with heating fresh cruds-Wsconsin, June 1998. *J. Am. Med. Assoc.* 2000, 284, 2991-2992.
- D'Amico D. J., Groves E., Donnelly C. W.: Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. *J. Food Prot.* 2008, 71, 1580-1589.
- Deschênes G., Casenave C., Grimont F., Desenclos J. C., Benoit S., Collin M., Baron S., Mariani P., Grimont P. A., Nivet H.: Cluster of cases of haemolytic uraemic syndrome due to unpasteurised cheese. *Pediatr. Nephrol.* 1996, 10, 203-205.
- Djuretic T., Wall P. G., Nichols G.: General outbreaks of infectious intestinal disease associated with milk and dairy products in England and Wales: 1992 to 1996. *Commun. Dis. Rep.* 1997, 7, R41-R45.
- Doyle M., Zhao T., Meng J., Zhao S.: *Escherichia coli* O157:H7, [w:] Doyle M., Beuchat L., Montville T. (eds.): *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. Washington DC: American Society for Microbiology Press 1997, 171-191.
- European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General: Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on Verotoxigenic *E. coli* in Foodstuffs, 21-22 January 2003.
- European Food Safety Authority. Scientific report of EFSA and ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *The EFSA Journal* 2013, 11, 3129.
- European Food Safety Authority. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *The EFSA Journal* 2012, 10, 2597.
- Farrokh C., Jordan K., Auway F., Glass K., Oppegaard H., Raynaud S., Thevenot D., Condron R., De Reu K., Govaris A., Heggum K., Heyndrickx M., Hummerjohann J., Lindsay D., Miszczycha S., Moussiégt S., Verstraete K., Cerf O.: Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int. J. Food Microbiol.* 2013, 162, 190-212.
- Foschino R., Invernizzi A., Barucco R., Stradiotto K.: Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. *J. Dairy Res.* 2002, 69, 213-225.
- Gillespie I. A., Adak G. K., O'Brien S. J., Bolton F. J.: Milkborne general outbreaks of infectious intestinal disease, England and Wales, 1992-2002. *Epidemiol. Infect.* 2003, 130, 461-468.
- Health Protection Surveillance Centre Sub-Committee on Verotoxigenic *E. coli*: Epidemiology of Human VTEC in Ireland. 03 Jun, Edinburgh, Scotland 2003.
- Hussein H. S., Sakuma T.: Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *J. Dairy Sci.* 2005, 88, 450-465.
- Jordan K. N., Oxford L., O'Byrne C. P.: Survival of low pH stress by *Escherichia coli* O157:H7: correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 3048-3055.
- Langer A. J., Ayers T., Grass J., Lynch M., Angulo F. J., Mahon B. E.: Nonpasteurized dairy products, disease outbreaks and state laws – United States, 1993-2006. *Emerg. Infect. Dis.* 2012, 18, 385-391.
- Louvois J. de, Rampling A.: One fifth of samples of unpasteurised milk are contaminated with bacteria. *Br. Med. J.* 1998, 316, 625-627.
- Marier R., Wells J. G., Swanson R. C., Callahan W., Mehlman I. J.: An outbreak of enteropathogenic *Escherichia coli* foodborne disease traced to imported French cheese. *Lancet* 1973, 302, 1376-1378.
- Mathusa E. C., Chen Y., Enache E., Hontz L.: Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *J. Food Prot.* 2010, 73, 1721-1736.
- Murphy B. P., Murphy M., Buckley J. F., Gilroy D., Rowe M., McCleery D., Fanning S.: In-line milk filter analysis: *Escherichia coli* O157 surveillance of milk production holdings. *Int. J. Hyg. Environ. Microbiol.* 2005, 208, 407-414.
- Neaves P., Deacon J., Bell C.: A survey of the incidence of *Escherichia coli* O157 in the UK dairy industry. *Int. Dairy J.* 1994, 4, 679-696.
- Paiba G. A., Gibbens J. C., Pascoe S. J., Wilesmith J. W., Kidd S. A., Byrne C., Ryan J. B., Smith R. P., McLaren M., Futter R. J., Kay A. C., Jones Y. E., Chappel S. A., Willshaw G. A., Cheasty T.: Faecal carriage of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in cattle and sheep in Great Britain. *Vet. Rec.* 2002, 150, 593-598.
- Rangel J. M., Sparling P. H., Crowe C., Griffin P. M., Swerdlow D. L.: Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg. Infect. Dis.* 2005, 11, 603-609.
- Reid T. M. S.: A case study of cheese associated *E. coli* O157 outbreaks in Scotland, [w:] Duffy G., Garvey P., Mc Dowell D. A. (eds.): *Verocytotoxigenic E. coli*. Trumbull, Connecticut, USA: Food&Nutrition Press Inc. 2001, 201-212.
- Reitsma C. J., Henning D. R.: Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of Cheddar cheese. *J. Food Protect.* 1996, 59, 460-464.
- Rey J., Sánchez S., Blanco J. E., Hermoso de Mendoza J., Hermoso de Mendoza M., García A., Gil C., Tejero N., Rubio R., Alonso J. M.: Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, 107, 212-217.
- Scheutz F., Teel L. D., Beutin L., Piérard D., Buvens G., Karch H., Mellmann A., Caprioli A., Tozzoli R., Morabito S., Strockbine N. A., Melton-Celsa A. R., Sanchez M., Persson S., O'Brien A. D.: Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 2012, 50, 2951-2963.
- Schlessler J. E., Gerdes R., Ravishankar S., Madsen K., Mowbray J., Teo A. Y.: Survival of a five-strain cocktail of *Escherichia coli* O157:H7 during the 60-day aging period of cheddar cheese made from unpasteurized milk. *J. Food Prot.* 2006, 69, 990-998.
- Upton P., Coia J. E.: Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply [letter]. *Lancet* 1994, 344, 1015.