

samo jego powstanie, zakres, sposób realizacji, termin itp.” oraz że zamiar prawodawcy w takim przypadku musi „wynikać jednoznacznie z treści konkretnego przepisu upoważniającej do przyjęcia, że wybrany przepis działa *priorio vigore*, bez jakichkolwiek czynności podmiotu stosującego prawo bądź poprzedzających powstanie określonego skutku, bądź czynności następujących po tym skutku”.

Z sytuacją taką w ocenie Sądu Najwyższego na pewno nie mamy do czynienia w przypadku opłat z art. 36 ustawy o Państwowej Inspekcji Sanitarnej, który „jednocześnie wskazuje na konieczność określonych działań organu, których istotna treść (...) sprowadza się do czynności ustalających, ocennych i rozstrzygających”. Pomocniczo Sąd Najwyższy dodał przy tym, że „całokształt (...) stosunków zachodzących między organami inspekcji sanitarnej a podmiotami podlegającymi bieżącemu i zapobiegawczemu nadzorowi sanitarnemu jest znamieny dla stosunków zależności i podporządkowania, a sam obowiązek ponoszenia opłat ma cechy zdarzenia, o którego powstaniu, wysokości, terminie i sposobie uiszczenia rozstrzyga się w sposób właściwy lub wręcz »typowy« dla stosunków administracyjnych”.

Tezy te właściwie w całości można odnieść do opłat pobieranych z art. 30 ustawy o Inspekcji Weterynaryjnej.

Na wybranie formy decyzji administracyjnej jako formy właściwej przy ustaleniu wysokości opłaty z art. 30 ustawy o Inspekcji Weterynaryjnej wskazują także przepisy nowej ustawy o finansach publicznych. Chodzi tu normy artykułów 60, 61 i 67, które nie miały swojego odpowiednika w wcześniejszej ustawie.

Zgodnie z art. 60 środkami publicznymi, stanowiącymi niepodatkowe należności budżetowe o charakterze publicznoprawnym, są w szczególności dochody budżetu państwa pobierane przez państwowe i samorządowe jednostki budżetowe na podstawie odrębnych ustaw, w tym na podstawie ustawy o Inspekcji Weterynaryjnej.

Z kolei w myśl art. 61 jedyną formą działania administracji publicznej, o jakiej wspomina ustawa o finansach publicznych w kontekście ustalenia takiej należności jest decyzja. W świetle art. 67 ww. ustawy, zgodnie z którym do spraw dotyczących należności, o których mowa w art. 60 ustawy, nieregulowanych tą ustawą, stosuje się w pierwszej kolejności i to w sposób bezpośredni przepisy Kodeksu postępowania administracyjnego, nie powinno

być w sprawie wątpliwości, iż chodzi tu o decyzję w rozumieniu art. 104 tego Kodeksu, a więc o decyzję administracyjną.

Piśmiennictwo

1. DzU z 2010 r., nr 112, poz. 744 z późn. zm.
2. DzU z 2007 r. nr 2, poz. 15 z późn. zm.
3. DzU nr 157, poz. 1240 z późn. zm.
4. Kosikowski C.: *Nowa ustawa o finansach publicznych. Komentarz*, Warszawa 2010, s. 49.
5. Tamże, s. 43.
6. Jendroška J., Adamiak B.: *Glosa do wyroku NSA z dnia 27 kwietnia 1981 r. SA 767/81*, OSPiKA 1983, nr 5, poz. 109, s. 257; Jendroška J.: *Komentarz do art. 104. W: Kodeks postępowania administracyjnego. Komentarz*, red. J. Borkowski, Warszawa 1985, s. 186; Adamiak B.: *Zagadnienia domniemania formy...*, s. 7 i n.; Zimmermann J.: *Prawo administracyjne*, Zakamycze 2006, s. 293 i n.; Biernat S.: w: OSPiKA 1986, z. 9–10, poz. 176, s. 381; Chróścielewski W.: *Akty kończące postępowanie*, W: Chróścielewski W., Tarno J.: *Postępowanie administracyjne. Zagadnienia podstawowe*, Warszawa 2002, s. 120).
7. Sygn. II SA 2083/82.
8. Sygn. SA/Wr 430/84.
9. Sygn. II SA/Gd 468/09 i II SA/Gd 469/09.
10. Sygn. III SA/Lu 298/06.
11. Sygn. IV SA/Wa 1616/05.
12. DzU z 2006 r. nr 122, poz. 851.
13. Sygn. SAB/Wr 19/94.
14. Sygn. III AZP 11/94.
15. Sygn. III CZP 1/94/OSP 1994 r.
16. Sygn. II SA/Gd 468/09 i II SA/Gd 469/09.

Dr n. praw. Michał Rudy, Kancelaria Prawna Result K.Witkowski & Spółka – Spółka Komandytowa, ul. Wiśniowa 38, 02-520 Warszawa, e-mail: m.rudy@kancelaria-result.pl

Shigatoksynne enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* – nowe czy dobrze znane zagrożenie?

Marcin Weiner

z Zakładu Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Bakterie *Escherichia coli*, należące do rodziny Enterobacteriaceae, zostały odkryte przez Teodora Eschericha w drugiej połowie XIX wieku (1). Stanowią naturalny składnik mikroflory przewodu pokarmowego, jak również pełnią rolę saprofityczną, współdziałając w utrzymaniu homeostazy organizmu poprzez udział w syntezie wielu istotnych dla niego składników. Niektóre szczepy *E. coli* mają zdolność wytwarzania różnych czynników patogenności i mogą wywołać choroby przewodu pokarmowego lub zakażenia pozajelitowe, np. posocznice, kulawki u cieląt, zrebیات i jagniąt oraz zakażenia układu moczowego. Bakterie te mogą też być odpowiedzialne za choroby układu rozrodczego, gruczołu mlekowego, jak również o charakterze

autoimmunologicznym, np. choroba Leśniowskiego-Crohna u ludzi (1, 2, 3). *Escherichia coli* uznawana jest także za wskaźnik higieniczny żywności pochodzenia zwierzęcego, wskazujący na stopień jej zanieczyszczenia podczas procesu pozyskiwania i przetwórstwa (4).

Klasyfikacja *E. coli*, uwzględniająca strukturę antygenową, została opracowana przez Kauffmanna w 1944 r. i z pewnymi modyfikacjami stosowana jest do dzisiaj. Opiera się na trzech podstawowych antygenach powierzchniowych: ponad 170 somatycznych „O”, 90 otoczkowych „K” oraz 60 rzęskowych „H”. Ich wzajemna kombinacja determinuje przynależność drobnoustroju do danego serotypu (5, 6). W ostatnich latach, dzięki osiągnięciom biologii

molekularnej, określanie struktury antygenowej *E. coli* straciło nieco na znaczeniu na rzecz identyfikacji ich genotypowych markerów patogenności (2, 7).

Chorobotwórcze szczepy *E. coli*, uwzględniając mechanizmy ich patogenego działania i wytwarzane markery zjadliwości, podzielono na kilka grup (2, 8):

- enterotoksyczne *E. coli* (enterotoxigenic *E. coli* – ETEC), charakteryzujące się zdolnością wytwarzania toksyn ciepłochwyjnych (LT) oraz ciepłostajłych (ST),
- enteroinwazyjne *E. coli* (enteroinvasive *E. coli* – EIEC), przypominające mechanizmem działania pałeczki rodzaju *Shigella*. Bakterie te wnikają do komórek nabłonka jelitowego i uwalniają cytotoksyny,
- enteropatogenne *E. coli* (enteropathogenic *E. coli* – EPEC), cechujące się specyficzną adhezją do nabłonka jelitowego za pomocą białka intyminy oraz wytwarzaniem swoistego dla niego receptora TIR (translocated intimin receptor),
- enteroagregacyjne *E. coli* (enteroaggregative *E. coli* – EAEC), wyodrębnione na podstawie zdolności adhezji do komórek linii HEp-2, przy udziale fimbrii AAF (aggregative adherence fimbriae) oraz uwalniania enteroagregacyjnej ciepłostajłej enterotoksyny 1 (EAST1),

Shigatoxigenic enterohaemorrhagic *Escherichia coli* – a new or a well-known hazard?

Weiner M., Department of Microbiology, National Veterinary Research Institute in Pulawy

Shiga toxin – producing *Escherichia coli* (STEC) have been identified as a cause of serious human diseases – hemorrhagic colitis (HC), hemolytic uremic syndrome (HUS) and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Cattle and other ruminants are the main reservoirs of these bacteria. Food of animal origin (especially beef) is an important source of human infection with STEC belonging to serogroups O157, O26, O103, O111 and O113 but water and person-to-person transmission may play a significant role in the human infections. The large outbreaks connected to STEC can affect many people causing serious morbidity and mortality, making this bacteria one of the most important food-borne pathogens. In this paper several plasmid and chromosomal genes responsible for the expression of important virulence determinants of STEC have been described. Among them, Shiga toxin (Stx) encoded by the *stx* genes is the best characterized pathogenic marker. Current diagnostic procedures depend on pre- and/or enrichment followed by growing the bacteria in various media which contain supplements for the differentiation of STEC from other Gram-negative microorganisms. Universally applied procedure PN-EN ISO 16654:2002, which uses the immunomagnetic separation (IMS) technique, allows the identification of *E. coli* O157:H7 only and passes over the bacteria belonging to many other different groups. Isolation of individual STEC colonies is possible with the use of digoxigenin (DIG)-labeled DNA probe whereas characterization of their virulence markers i.e. Shiga toxin genes is performed with molecular biology-based assays, such as: PCR or multiplex PCR. This review should improve the knowledge on STEC and the function of the virulence markers described, but further studies are needed to evaluate the role of STEC genes in e.g. apoptosis or quorum sensing processes.

Keywords: shiga toxin-producing *E. coli*, VTEC, EHEC.

- martwicowe *E. coli* (necrotoxigenic *E. coli* – NTEC), posiadające zdolność wytwarzania cytotoksycznych czynników wywołujących martwicę CNF1 i CNF2 (cytotoxic necrotizing factor),
- shigatoksyczne *E. coli* (shigatoxigenic *E. coli* – STEC), wraz z podgrupą enterokrwotocznych *E. coli* (enterohemorrhagic *E. coli* – EHEC), wytwarzające toksynę Shiga (Stx).

Szczepy STEC zostały po raz pierwszy zidentyfikowane jako groźny czynnik zakażeń pokarmowych u ludzi na początku lat osiemdziesiątych XX wieku przez dwa niezależne zespoły badaczy. Riley i wsp. (9) odkryli, że przyczyną krwawej biegunki, która wystąpiła po spożyciu niedopieczonych

hamburgerów wołowych w USA, był rzadko wtedy izolowany szczep *E. coli* O157:H7. Autorzy ci wykazali, że badany drobnoustrój nie miał zdolności uwalniania enterotoksyn LT i ST, nie wytwarzał znanych fimbrii adhezyjnych, cechował się natomiast właściwościami toksycznymi określonymi mianem „efektu cytotatycznego” *in vitro* w stosunku do komórek linii Vero. W tym samym roku Karmali i wsp. (10) stwierdzili, że przyczyną zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS) u hospitalizowanego w Kanadzie pacjenta była cytotoksyna produkowana przez szczep *E. coli*, cechująca się, podobnie jak w przypadku szczepu amerykańskiego, analogicznymi właściwościami *in vitro*. Toksynę tę określono werotoksyną (verotoxin – VT), a grupę drobnoustrojów ją wytwarzających, jako „werotoksyczne *E. coli*” (verotoxigenic *E. coli* – VTEC). O'Brien i wsp. (11) oraz O'Brien i La Veck (12) wykazali, że przeciwciała anti-*Shigella dysenteriae* neutralizowały cytotoksyczne właściwości toksyny wero. Od tego czasu czynnik ten zaczęto określać również mianem toksyny shiga (Shiga toxin-Stx lub Shiga-like toxin – SLT), a szczepy je wytwarzające „shigatoksycznymi *E. coli*” (shigatoxigenic lub Shiga toxin-producing *E. coli*, STEC; 13). Pomimo podejmowania prób ujednoczenia nazewnictwa toksyn, jak też wytwarzających je drobnoustrojów, określenia STEC i VTEC dla bakterii oraz Stx, SLT, VT dla produkowanych przez nie czynników toksycznych, mają charakter synonimów i stosowane są w publikacjach według uznania autorów (14).

Określenie „szczepy enterokrwotoczne *E. coli*” (enterohemorrhagic *E. coli* – EHEC) zostało wprowadzone przez Levina (8) dla *E. coli* O157:H7 ze względu na wywołane przez ten serotyp krwotoczne zapalenie okrężnicy (HC) u ludzi. W latach późniejszych po stwierdzeniu, że nie tylko *E. coli* O157:H7, ale również inne STEC mogą wywołać HC, określenie rozszerzono na wszystkie STEC zawierające odcinek DNA o nazwie LEE (locus of enterocyte effacement) oraz posiadające plazmid pO157 (15).

W 2001 r. przedstawiono pełną sekwencję genomu *E. coli* O157:H7 (szczep EDL933), liczącą 5 528 445 par zasad, w obrębie której znajduje się 5453 genów kodujących 5324 białka (16). Mimo znaczącego postępu badań dokonanego w ostatnich 25 latach, poznano funkcję jedynie około 5% z tych genów, a mechanizmy regulujące przyleganie STEC do komórek, procesy zapalne i autoimmunologiczne, rolę w apoptozie oraz zjawisku chemicznej wymiany informacji sygnałów pomiędzy drobnoustrojami określonym mianem „quorum sensing” pozostają bardzo często w kwestii hipotez i są przedmiotem ciągłych prowadzonych badań (17, 18).

Zróźnicowanie grupy STEC

Dotychczas stwierdzono ponad 400 serotypów *E. coli* zaliczonych do grupy STEC, przy czym około 100 z nich izolowano z przypadków chorobowych u ludzi (19). Szczepy te mogą różnić się właściwościami biochemicznymi, fenotypowymi oraz genotypowymi, ale ich cechą wspólną jest zdolność wytwarzania toksyny Shiga. O zróźnicowaniu grupy STEC mogą świadczyć m.in. odmienności pomiędzy *E. coli* O157:H7 oraz *E. coli* O157:H- (NM). Te pierwsze nie fermentują sorbitolu i nie posiadają enzymu β -glukuronidazy, natomiast produkują enterohemolizynę (95% izolatów) i oba warianty toksyny Stx (Stx1 i Stx2). Przypadki kliniczne u ludzi po zakażeniu *E. coli* O157:H7 stwierdza się na całym świecie, przede wszystkim w miesiącach letnich. Dotyczą one osób w każdej grupie wiekowej i są następstwem spożycia żywności zanieczyszczonej STEC, kontaktów ze zwierzętami-nosicielami albo innymi ludźmi. Dawka zakaźna jest niska i wynosi poniżej 100 komórek bakteryjnych (20, 21). Z kolei *E. coli* O157:H- fermentują sorbitol, jedynie 10% szczepów wytwarza enterohemolizynę, a zdecydowana większość izolatów produkuje wyłącznie toksynę Stx2. Drobnoustrój ten stwierdza się w Europie i Australii, przede wszystkim w miesiącach chłodniejszych, od września do kwietnia. Zachorowania u ludzi dotyczą dzieci poniżej 3 roku życia, a dawka zakaźna nie jest określona (22, 23).

Występowanie STEC

Naturalnym rezerwuarem szczepów STEC są przeżuwacze, przede wszystkim bydło, a także owce i kozy, będące nosicielami i siewcami tych bakterii (24). Pomimo że nosicielstwo i siewstwo jest krótkotrwałe i wynosi około 1 miesiąca, bakterie mogą utrzymywać się w środowisku przez długi czas (od kilku tygodni do kilkunastu miesięcy), a tym samym stanowić potencjalne zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka (2, 14). Wiek zwierząt jest czynnikiem determinującym okres nosicielstwa i jest znacznie dłuższy u cieląt niż u bydła dorosłego. Co więcej, w niektórych przypadkach (stres, przebyte zakażenia wirusowe) nosicielstwo może przejść w postać kliniczną manifestującą się u cieląt objawami biegunkowymi (1).

STEC izolowane były również od koni, psów, kotów, drobiu, sporadycznie od zwierząt wolno żyjących (jelenie) i ptaków (drób, jaskółki i mewy; 25, 26).

Shigatoksyczne *E. coli*, produkujące toksynę Stx2e i występujące w jelicie cienkim świń, wywołują charakterystyczne zmiany histopatologiczne w przebiegu choroby obrzękowej (edema disease – ED)

oraz biegunkę u prosiąt, przede wszystkim w okresie odsadzania od macior (27, 28). W połowie lat 90. opisano u chartów wyścigowych skarmianych surowymi odpadkami rzeźnianymi objawy kliniczne przypominające zespół hemolityczno-mocznicowy u ludzi i określono je mianem „Alabama rot” lub „cutaneous and renal glomerular vasculopathy of greyhounds” (CRGV; 29). Szczepy STEC produkujące toksynę Stx2f biorą udział w patogenezie tzw. zakaźnego zespołu dużej głowy u drobiu (swollen head syndrome – SHS), wcześniej uznawanego za chorobę o etiologii wirusowej (30). Od 1982 r., kiedy zanotowano pierwsze przypadki zakażeń ludzi drobnoustrojami STEC, stwierdzono szereg epidemicznych i sporadycznych zakażeń wywołanych różnymi ich serotypami, przede wszystkim O157:H7. Najbardziej masowe zakażenie odnotowano w Japonii w 1996 r., które dotyczyło 8576 osób, z czego 606 hospitalizowano. Konsekwencją tej epidemii było 106 przypadków zespołu hemolityczno-mocznicowego oraz 3 zejścia śmiertelne (31). W Europie największe i najtragiczniejsze zachorowanie zanotowano w Szkocji w 1996 r. Objęło ono 501 osób, zakażonych po spożyciu wołowiny zanieczyszczonej *E. coli* serotypu O157:H7. Efektem epidemii był rozwój zespołu hemolityczno-mocznicowego u 27 osób, w konsekwencji którego 20 osób zmarło (32). Inne szeroko opisane masowe zatrucia po spożyciu żywności zawierającej STEC miało miejsce w Kanadzie w 1991 r. i dotyczyło 521 osób (33). W USA w 1992 r. po wypiciu wody zanieczyszczonej bakteriami zachorowały 243, a 4 osoby zmarły (34). W Australii w 1995 r. po zjedzeniu żywności zawierającej *E. coli* O113:H21 zachorowało ponad 100 osób (35). W USA stwierdza się rocznie ok. 80 masowych zakażeń bakteriami STEC, a liczba sporadycznych przypadków zachorowań obejmuje ok. 20 000 osób (20). W kraju tym dominującym serotypem izolowanym z żywności pochodzenia zwierzęcego (mięso, mleko) jest O157:H7. W Europie natomiast, za najbardziej istotny czynnik zakażeń na tle STEC uważa się szczepy grup serologicznych O26, O103, O111, O113 i O145 oraz, podobnie jak w USA, *E. coli* O157 (36, 37).

W Polsce notowano tylko pojedyncze przypadki zakażeń ludzi szczepami STEC grupy serologicznej O157 (38, 39) oraz O26 (40). Występowanie *E. coli* O157:H7 w żywności opisano w pracach Kwiatka i wsp. (4, 41). Z kolei występowanie STEC u zwierząt, przede wszystkim u prosiąt i cieląt, przedstawiono w publikacjach Oska i wsp. (27, 28, 42).

Ze względu na istotne zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi w przypadku zakażeń STEC, ustanowiono dyrektywę 2003/99/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z 17 listopada 2003 r. regulację prawne

nakazujące krajom członkowskim wprowadzenie działań monitoringowych w odniesieniu do szczepów shigatoksycznych *E. coli*. W Polsce to zagadnienie zostało uregulowane zapisami ustawy z 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt oraz rozporządzeniem ministra rolnictwa i rozwoju wsi z 25 listopada 2005 r. Efektem wdrożenia w życie wspomnianych aktów prawnych oraz dyrektywy 2003/99/WE są szeroko prowadzone badania monitoringu w krajach UE, których wyniki są zamieszczane w corocznym raporcie Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA). W ostatnim z nich stwierdzono, że w 2009 r. liczba przypadków zakażeń ludzi shigatoksycznymi *E. coli* była na czwartym miejscu, po pałeczkach z rodzajów *Campylobacter*, *Salmonella* oraz *Yersinia*. W 24 państwach Unii Europejskiej (z wyjątkiem Czech, Grecji oraz Portugalii) oraz trzech krajach spoza UE: Norwegii, Szwajcarii oraz Islandii – wykazano 3573 zakażenia ludzi na tle STEC, najwięcej w Wielkiej Brytanii, Niemczech, Holandii i Irlandii (odpowiednio 1339, 878, 313 oraz 237 przypadków). W Polsce nie odnotowano zachorowań. Udział serogrupy O157 wynosił 51,7% i stanowił nieznaczny spadek w stosunku do 2008 r. (53%). Zespół hemolityczno-mocznicowy, będący konsekwencją zakażenia STEC, stwierdzono w 242 przypadkach, co stanowi wzrost o 66% w stosunku do roku poprzedzającego.

Transmisja STEC

W transmisji szczepów STEC można wyróżnić 3 podstawowe elementy:

- żywności pochodzenia zwierzęcego, roślinnego oraz wodę,
- bezpośredni kontakt ludzi ze zwierzętami nosicielami,
- bezpośredni kontakt zakażonych osób.

Ponadto odnotowano drogę aerogenną zakażenia na tle STEC, która miała miejsce w USA i dotyczyła 23 osób (44).

Szczepy STEC mogą dostać się do łańcucha pokarmowego ludzi najczęściej po spożyciu surowego lub nieodpowiednio przetworzonego termicznie mięsa wołowego, zanieczyszczonego bakteriami podczas uboju i obróbki poubojowej tuszy, jak również niepasteryzowanego mleka (20, 43, 45).

Obserwowano również zachorowania ludzi po spożyciu prawidłowo przygotowanej (poddanej obróbce termicznej) wołowiny, mleka lub jego przetworów po pasteryzacji, co związane było z wtórnym zanieczyszczeniem gotowych produktów spożywczych szczepami STEC (32). Ze względu na wysoką tolerancję *E. coli* O157:H7 na niskie pH, jak również na wysuszenie, bakterie te stanowią poważne zagrożenie dla żywności uważanej dotąd za

bezpieczną, np. suszonej (liofilizowanej), przypraw oraz soków owocowych (46).

Elementem transmisji patogennych szczepów STEC mogą być też warzywa i owoce zanieczyszczone kałem bydlęcym lub owczym (47). Przyczyną największej do tej pory epidemii *E. coli* O157:H7, która miała miejsce w Japonii było spożycie warzyw zanieczyszczonych STEC (31).

Według raportu EFSA za 2009 r., próbki wołowiny w kierunku STEC zbadano w 20 krajach UE i Norwegii i stwierdzono 2,3% wyników dodatnich, przy czym należących do grupy O157–0,7% (na 9285 zbadanych próbek). Według tego raportu w Polsce stwierdzono występowanie STEC w 48,5% próbkach mięsa pochodzących od krów mlecznych. Należy przy tym zaznaczyć, że według danych zawartych w tym raporcie jedynie w Belgii i Polsce wykonano badania w odniesieniu do powierzchni, a nie masy zbadanej próbki (43).

Woda również może być źródłem zakażeń szczepami STEC. Stwierdzono rozwój krwotocznego zapalenia okrężnicy lub zespołu hemolityczno-mocznicowego po spożyciu zanieczyszczonej tymi drobnoustrojami wody spożywczej, jak również na skutek kontaktu z wodą jezior i basenów kąpielowych. Bakterie te mogą przeżywać i namnażać się w wodzie i ściekach przez co najmniej 4 miesiące (34).

Ważnym ogniwem łańcucha epidemiologicznego są też bezpośrednie kontakty człowiek–człowiek, zwłaszcza w dużych skupiskach ludzkich (przedszkola, szkoły, domy opieki) oraz mające miejsce w obrębie jednej rodziny (14, 17, 18). Możliwe są też zakażenia będące efektem kontaktów ludzi (zwłaszcza dzieci) ze zwierzętami będącymi nosicielami bakterii STEC, co ma miejsce głównie w gospodarstwach rolnych o charakterze edukacyjnym. Przypadki takie notowano w Japonii, Niemczech i Wielkiej Brytanii (31, 48, 49).

Choroby ludzi wywołane przez STEC

Shigatoksyczne szczepy *E. coli* odpowiedzialne są za wystąpienie groźnych schorzeń u ludzi, a zwłaszcza krwotocznego zapalenia okrężnicy (HC), którego konsekwencjami mogą być zespół hemolityczno-mocznicowy (HUS) i małopłytkowa płamica zakrzepowa (TTP). Ponadto stwierdzono, że STEC mogą być przyczyną martwiczego zapalenia okrężnicy oraz odgrywać pewną rolę w patogenezie cukrzycy (14).

Krwotoczne zapalenie okrężnicy (hemorrhagic colitis – HC)

Choroba cechuje się występowaniem biegunki sekrecyjnej w początkowej fazie choroby, następnie przechodzącej w krwawą, trwającą od 3 do 7 dni i połączoną z bólami

brzucha i gorączką (9, 50). Gdy infekcja dotyczy *E. coli* O157:H7 wytwarzających toksynę Stx2, często dochodzi do powikłań objawiających się krwawieniami z żołądka, niedokrwieniem mózgu oraz wystąpienia zespołu hemolityczno-mocznicowego lub małopłytkowej plamicy zakrzepowej (9, 14).

Zespół hemolityczno-mocznicowy (hemolytic-uremic syndrome – HUS)

Występuje przede wszystkim u dzieci i osób starszych jako powikłanie HC (od 2–7%) i cechuje się niewydolnością i uszkodzeniem nerek na skutek zmian zakrzepowych w ich naczyniach oraz rozwojem niedokrwistości hemolitycznej (14, 51). Śmiertelność związana z tym zespołem wynosi od 3 do 10%, przy czym wartości wyższe dotyczą przypadków infekcji szczepami STEC wytwarzającymi toksynę Stx2. W badaniach wykonanych w USA i Kanadzie wykazano, że zachorowania mają charakter sezonowy i występują najczęściej w miesiącach letnich (czerwiec-sierpień) i wiążą się z sezonowym występowaniem *E. coli* O157:H7 (24, 43).

Małopłytkowa plamica zakrzepowa (thrombotic thrombocytopenic purpura – TTP)

Przeważnie stanowi powikłanie zespołu HUS (51). Dotyczy przede wszystkim osób dorosłych, w wyjątkowych przypadkach występuje u dzieci. Choroba cechuje się objawami neurologicznymi (na skutek uszkodzenia układu nerwowego) i dysfunkcją nerek. Charakterystyczne zmiany zakrzepowe mają charakter rozsiarny (w przeciwieństwie do zmian w przebiegu HUS dotyczących głównie nerek) i występują w obrębie naczyń krwionośnych trzustki, nadnerczy, nerek, serca i mózgu. Śmiertelność jest znacznie wyższa niż w przypadku HUS i może sięgać 30%, przede wszystkim u osób starszych (20, 23, 24).

Genotypowe markery patogenności STEC

Materiał genetyczny szczepów STEC zawiera geny zlokalizowane w obrębie chromosomu oraz plazmidów, których produkty odgrywają szereg funkcji w patogenie HC, HUS i TTP poprzez wytwarzanie i uwalnianie substancji toksycznych, elementów biorących udział w adhezji bakterii do komórek nabłonkowych oraz markerów wpływających na regulację czynników kolonizacyjnych (2, 10, 14, 18, 37).

Chromosomalne markery patogenności

Najważniejszym czynnikiem patogenności szczepów STEC jest kodowana przez gen *stx* toksyna Shiga (Stx), występująca

w dwóch podstawowych odmianach: Stx1 oraz Stx2, różniących się między sobą składem aminokwasowym, strukturą antygenową i aktywnością biologiczną. Shiga-toksyczne szczepy *E. coli* mogą wytwarzać tylko Stx1, tylko Stx2 lub obie toksyny równocześnie (52). Toksynę Shiga ze względu na budowę zalicza się do grupy toksyn AB5, składających się z jednej, aktywnej biologicznie podjednostki A o masie 32 kDa, oraz 5 podjednostek B o masie 7,7 kDa każda (14, 53). Stx1 jest praktycznie identyczna (99% homologii na poziomie DNA) z toksyną wytwarzaną przez szczepy *Shigella dysenteriae* 1, natomiast Stx2 wykazuje z nią tylko 55% pokrewieństwa aminokwasowego na poziomie podjednostki A i 57% w sekwencji podjednostek B (13, 14). Szczepy STEC wytwarzające wyłącznie toksynę Stx2 są bardziej patogenne od tych, które uwalniają toksynę Stx1, co wynika ze zwiększonej transkrypcji Stx2 *in vivo* w porównaniu z Stx1, której synteza zależna jest od jonów żelaza obecnych zwykle w niewystarczającej ilości w środowisku przewodu pokarmowego. Toksyna Stx1 uznawana była za jednorodną, dopiero w ostatnich latach odkryto jej dwa nowe warianty, Stx1c oraz Stx1d; różnice między nimi dotyczą zaledwie kilku aminokwasów i nie mają klinicznego znaczenia (54). Z kolei odmiana Stx2 występuje w kilku wariantach, oznaczonych, jako: Stx2c (55), Stx2d (56), Stx2f (57), Stx2g (58) i Stx2e (59), różniących się toksycznością *in vitro* w odniesieniu do różnych linii komórkowych. Pomimo że wszystkie są cytotoksyczne dla komórek Vero, to w przypadku linii HeLa taki efekt wykazują wyłącznie odmiany podstawowe Stx1 oraz Stx2. Toksyny Stx2c oraz Stx2d wykazują 100-krotnie, a odmiany Stx2e oraz Stx2f, 10 000-krotnie mniejszą toksyczność. Zależność odwrotną obserwuje się w odniesieniu do linii komórkowej MDBK, gdzie najbardziej cytotoksyczne są odmiany Stx2e i Stx2f. Wynika to między innymi z powinowactwa poszczególnych Stx do odmiennych receptorów molekularnych: Stx2f i Stx2e przyczepiają się do struktur GB4, występujących głównie u świń i ptaków, natomiast pozostałe odmiany toksyny Stx wykazują powinowactwo do receptorów GB3 (14). Pewne doniesienia wskazują, że szczepy STEC produkujące toksynę Stx2e i uważane dotychczas za patogenne wyłącznie dla świń, izolowane były również z przypadków HUS lub biegunki sekrecyjnej u ludzi (17). Po przełamaniu bariery nabłonkowej Stx dostaje się do krwiobiegu i podjednostką B swoicie łączy z receptorem GB3, a następnie drogą endocytozy wnika do wnętrza komórki gospodarza. Toksyna Shiga może wiązać się między innymi z limfocytami B, monocytami oraz lipoproteinami i być przenoszona

z jelit do odległych tkanek i narządów, np. mózgu, wywołując tam ogólnonarządowe zmiany chorobowe. Po wnikięciu do komórki następuje rozdzielanie się toksyny na podjednostki A i B, a następnie podjednostka A rozpada się na dwa fragmenty oznaczone jako A1 i A2. Uwolniona w ten sposób cząstka A1 łączy się z podjednostką 60S rybosomu i dzięki właściwościom proteolitycznym usuwa adeninę z łańcucha 28S rRNA komórki eukariotycznej, przez co blokuje syntezę białka. Prowadzi to do zaburzeń funkcji komórki, a następnie całkowitej jej degradacji (14, 17). Według najnowszych doniesień, toksyna Stx bierze również udział w apoptozie komórek eukariotycznych (60).

Do grupy chromosomalnych czynników patogenności zalicza się również markery zlokalizowane w odcinku DNA o masie 35-43 kDa, określonym terminem „locus of enterocyte effacement” (LEE). Ten fragment DNA nie występuje u normalnej flory jelitowej *E. coli* ani też u ETEC i dlatego został nazwany „wyspą patogenności” (pathogenicity island). LEE charakteryzuje się stosunkowo niską zawartością cytozyny (C) i guaniny (G), wynoszącą 38,3%, podczas gdy dla całego chromosomu *E. coli* odsetek C+G jest w granicach 50,8%. Wynika to z horyzontalnego transferu LEE do szczepów z grupy STEC (jak również do enteropatogennych *E. coli*) od bakterii innych rodzajów niż *Escherichia* (2, 61). Do wspomnianych markerów wyspy LEE zalicza się geny *eaeA*, *tir* oraz odcinki DNA kodujące białka regulatorowe.

Intymina, determinowana przez gen *eaeA*, jest najważniejszym markerem patogenności odcinka LEE. Występuje w wielu wariantach (do chwili obecnej znanych jest 15), określanych literami alfabetu greckiego (α - ξ ; 19, 62). Klinicznie najważniejsze znaczenie mają odmiany oznaczone jako α , β , γ , ϵ (63). Intymina α obecna jest przede wszystkim u szczepów EPEC, intymina γ występuje u STEC grup serologicznych O157, O111, O145 oraz O113, odmianę ϵ stwierdzono u *E. coli* O103 oraz O121, natomiast intyminę β wykazano u szczepów EPEC i STEC, przede wszystkim grupy O26. Produkt genu *eaeA* warunkuje przyczepność *E. coli* do nabłonka jelitowego oraz odpowiada za wystąpienie zmian histopatologicznych określanych jako „attaching-effacing”, (A-E). Zalicza się do nich zanik rąbka szczoteczki enterocytów, zaburzenia w transporcie wapnia oraz nagromadzenie białka aktyny, co w końcowym efekcie prowadzi do destrukcji komórek (2, 14).

Produkt chromosomalnego genu *rfbO157* – lipopolisacharyd (LPS) O157 jest markerem świadczącym o przynależności *E. coli* do grupy serologicznej O157 (2). Wykazano, że LPS O157, jak również

inne LPS (*rfbE*), zwiększając efekt cytopatyczny Stx w odniesieniu do komórek śródbłonka naczyń krwionośnych. Ponadto mogą być czynnikami regulującymi proces zapalny w przypadku zakażenia ludzi szczepami STEC (64).

Oprócz wspomnianych wyżej markerów chorobotwórczości bakterii z grupy STEC, opisano również produkty genów *iha*, *efa1* oraz *lpfA*, których rola w patogenezie HC, HUS i TTP nie jest jednoznacznie wyjaśniona (65, 66). Białko Iha, kodowane przez gen *iha*, wykazuje homologię do IrgA, proteiny o masie 67-kDa występującej u *Vibrio cholerae*. Czynnik ten bierze udział w przyleganiu *E. coli* O157:H7 do komórek linii HeLa (67). U większości STEC nie-O157 stwierdza się geny *efa1/lifA*, zlokalizowane w wyspie patogenności oznaczonej jako PAI O#122 (68). Produkty genów *efa1/lifA* zbliżone są właściwościami do czynnika determinowanego przez gen *toxB*, obecnego w materiale genetycznym plazmidu. Cechują się dużą masą wynoszącą 365 kDa i biorą udział w przyleganiu STEC do komórek linii CHO. Z kolei Tarr i wsp. (67) postawili hipotezę, że nie są one *sensu stricto* adhezynami, ale czynnikami wspomagającymi ekspresję innych markerów adhezyjnych w laboratoryjnych szczepach *E. coli*.

W adhezji STEC do komórek nabłonka jelitowego dużą rolę mogą pełnić fimbrie LPF stwierdzone po raz pierwszy u bakterii z rodzaju *Salmonella* (69), a u pałeczek *E. coli* opisane szczegółowo w ostatnich latach (70). Toma i wsp. (65) i Torres i wsp. (66) odkryli nowe czynniki adhezyjne kodowane przez geny *lpfAO157/OI-141* oraz *lpfAO157/OI-154*, związane z grupą serologiczną O157, zarówno u szczepów *E. coli* O157:H7, jak również u O157:H-. Z kolei Doughty i wsp. (2002) opisali gen *lpfAO113* kodujący fimbrie adhezyjne *E. coli* O113, jednocześnie sugerując, że zarówno *lpfAO113*, *lpfAO157/OI-141* oraz *lpfAO157/OI-154* znajdują się na tym samym odcinku DNA. Osek i wsp. wykazali zależność pomiędzy fimbriami LpfA_{O113} a brakiem genu kodującego intyminę u szczepów Stx2e-dodatnich wyizolowanych od świń (71).

Plazmidowe markery patogenności STEC

Plazmid pO157 o masie 60 MDa, stwierdzony u wszystkich *E. coli* O157:H7 oraz wielu bakterii innych serotypów należących do STEC, zawiera w granicach 93,6–104 tysięcy par zasad (kb) (72, 73). Zawarte są w nim m. in. geny *ehlyA*, *katP*, *toxB*, oraz inne, kodujące ok. 35 białek o różnych funkcjach.

Za ekspresję enterohemolizyny (Ehx) odpowiedzialny jest fragment DNA, w postaci genu *ehlyA* o wielkości 3,4 kb, który

został opisany przez Levina i wsp. (8). Z kolei Beutin i wsp. [74] stwierdzili, że blisko 100% szczepów *E. coli* grupy O157 po 18 h inkubacji posiadało zdolność wytwarzania wąskiej strefy hemolizy β na agarze zawierającym płukane krwinki owcze. Izolaty takie równocześnie nie były hemolityczne po inkubacji na standardowych pożywkach agarowych zawierających krew. W przeciwieństwie do hemolizyny α powszechnie wytwarzanej przez inne niż STEC *E. coli*, enterohemolizyna jest czynnikiem uwalnianym tylko w niewielkim stopniu poza komórkowo i dlatego wytwarzana przez szczepy *ehlyA*-dodatnie strefa hemolizy jest bardzo mała (74). Marker *ehlyA* występuje też w wielu (22–88%) szczepach STEC innych niż O157 grup serologicznych, izolowanych od ludzi chorych na HC i HUS (14, 17). Badania na poziomie molekularnym pozwoliły stwierdzić, że operon *ehlyA* składa się z czterech otwartych ramek odczytu (open reading frames – ORF), oznaczonych A, B, C i D, które wykazują 62% homologii nukleotydowej z operonem hemolizyny α *E. coli* oraz operonami cytolizyn grupy RTX (repeats in toxins) szczepów *E. coli* odpowiedzialnych za zakażenia pozajelitowe, np. układu moczowego (75). Ze względu, że Ehx należy do wspomnianej grupy białek RTX, posiadających zdolność tworzenia w błonach komórkowych por o średnicy ok. 2,6 nm, uważa się, że głównym miejscem jej oddziaływania są krwinki czerwone, które ulegając lizie uwalniają hemoglobinę i hem, wpływające dodatkowo (poprzez obecność jonów żelaza) na wzrost i namnażanie się bakterii *E. coli* O157. W przypadku innych niż O157 STEC, rola tej hemolizyny w patogenezie schorzeń nie została dokładnie wyjaśniona (74, 76).

W 1996 r. Brunder i wsp. (77) opisali obecność w plazmidzie pO157 genu o wielkości 2,2 kb, który oznaczyli jako *katP* (P od plazmid), celem odróżnienia go od innych katalaz *E. coli* – KatG i KatE, kodowanych przez materiał genetyczny chromosomu. Gen ten determinuje wytwarzanie przez *E. coli* O157 enzymu o podwójnej aktywności – katalazy i peroksydazy (KatP). Stwierdzono, że KatP posiada zdolność przemieszczania się przez błony komórkowe, jednak rola tego białka w patogenezie chorób wywołanych szczepami STEC nie jest ustalona (8, 14, 17).

Produkt genu *toxB*, białko ToxB, bierze udział w kolonizacji nabłonka jelitowego gospodarza, wpływając na system wydzielniczy typu III oraz działa hamująco na odpowiedź immunologiczną typu komórkowego, a jego właściwości zbliżone są, jak wspomniano wcześniej, do produktów genów *efa1/lifA*, zlokalizowanych w wyspie patogenności PAI O#122 chromosomalnego odcinka *selC* (68).

W 2001 r. Paton i wsp. (78) odkryli białko Saa o właściwościach autoagutyny, kodowane przez plazmidowy gen *saa*. Czynnik ten został po raz pierwszy wyizolowany ze szczepu *E. coli* O113:H21, odpowiedzialnego za wystąpienie HUS podczas epidemii w Australii w 1998 r. Ponadto stwierdzono je u innych szczepów STEC niezawierających wyspy patogenności LEE, a izolowanych od ludzi z przypadków klinicznych HUS, np. *E. coli* O48:H21 oraz O91:H21. Wskazuje to na znaczącą rolę tego białka w patogenezie HUS, jednak dokładny mechanizm działania nie jest jeszcze wyjaśniony. Wykazano również, że produkt genu *saa* wykazuje podobieństwo na poziomie 24 i 27% z adhezyjnym białkiem YaDA (*Yersinia adhesion protein*) występującym u *Yersinia enterocolitica* i EiBD (*E. coli* immunoglobulin-binding protein). Stwierdzono też, że znacząco zwiększa przyleganie referencyjnego szczepu 98NK2 (*E. coli* O113:H21) do komórek linii HEp-2.

Identyfikacja STEC

Oznaczenie *E. coli* O157 za pomocą selektywnych pożywek bakteriologicznych

Shigatoksyczne *E. coli* są typowymi, Gram-ujemnymi pałeczkami, posiadającymi większość cech charakterystycznych dla wszystkich szczepów gatunku *E. coli*. Występują u nich jednak pewne odmienności, dotyczące przedstawicieli serotypu O157:H7, które umożliwiają dość łatwe ich różnicowanie od innych pałeczek okrężnicy, w tym saprofitycznej mikroflory przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt. Do najistotniejszych różnic można zaliczyć między innymi: brak zdolności fermentacji D-sorbitolu w czasie 24 godzin oraz brak β -glukuronidazy (79). Wiele szczepów zaliczanych do STEC charakteryzuje się zdolnością wytwarzania enterohemolizyny, której efekt hemolityczny można wykazać na pożywce agarowej z płukankami krwinkami owczymi. Wymienione cechy ułatwiają szybką identyfikację shigatoksycznych szczepów *E. coli* przy użyciu selektywnych pożywek mikrobiologicznych, dostępnych na rynku komercyjnym. Najbardziej znana jest pożywka MacConkey'a z 1% D-sorbitolem (Sorbitol-MacConkey Agar, SMAC). Drobnoustroje niemające zdolności fermentacji sorbitolu rosną na niej w postaci małych, okrągłych, gładkich i bezbarwnych kolonii, natomiast szczepy stanowiące mikroflorę niechorobotwórczą (saprofityczną), wykazują wzrost w postaci kolonii o kolorze różowym (79, 80). Niektóre jednak szczepy mogą posiadać zdolność do szybkiego (18–24 godzin) rozkładu D-sorbitolu, np. *E. coli* O157:H- co może być przyczyną wyników fałszywie

dotadnich (81). Zmodyfikowanie SMAC przez dodanie cefeksimu i/lub tellurytu potasu (CT-SMAC), umożliwiło łatwiejszą selekcję *E. coli* poprzez zahamowanie wzrostu innych bakterii zaliczanych do Enterobacteriaceae (*Proteus*, *Hafnia*, *Enterobacter*), a także *Plesiomonas*, *Aeromonas*, *Morganella* i *Providencia*. Z drugiej strony użycie tellurytu potasu wiąże się z ryzykiem zahamowania wzrostu niektórych wrażliwych szczepów O157:H- (82). Kolejne modyfikacje pożywki SMAC polegały na dodaniu 4-metylo-umbelliferylo- β -D-glukuronidu (MUG). Bakterie nienależące do grupy O157 rosną na niej w postaci fluorescencyjnych kolonii. Efektem dalszych prac było też użycie 5-bromo-4-chloro-3-indoksylo- β -D-glukuronidu; BCIG (pożywka MSA-BCIG), co umożliwiło różnicowanie sorbitolo- i β -glukuronidazo-ujemnych, białych kolonii STEC od sorbitolo-ujemnych, a β -glukuronidazo-dodatnich zielononiebieskich kolonii *E. coli* mikroflory saprofitycznej (83). Mimo wprowadzonych zmian w składzie pożywek bakteriologicznych poprawiających wykrywalności *E. coli* O157:H7, większość STEC należących do innych grup serologicznych wykazuje znaczną wrażliwość na zawarte w nich dodatki. Z tego też względu izolację STEC poprzedza się przednamnażaniem (pre-enrichment) i/lub namnażaniem właściwym (enrichment), których celem, zarówno w odniesieniu do materiału uzyskiwanego od ludzi i zwierząt, jak też ze środków spożywczych (mięso, mleko), jest zwiększenie liczby drobnoustrojów w badanym materiale. Stwierdzono, że liczba patogenych komórek STEC może być bardzo niska, poniżej 1 jtk/g (jtk – jednostek tworzących kolonie), przy bardzo dużej ilości bakterii saprofitycznych (10^6 – 10^8). W tym celu stosuje się najczęściej bulion tryptozowo-sojowy (TSB), zmodyfikowany bulion tryptozowo-sojowy (mTSB) z nowobiocyną (mTSB-N) lub akrylawiną (dmTSB-CA). Często używana jest też buforowana woda peptonowa z dodatkiem wankomycyny i cefeksimu (pożywka BPW-VCC).

Separacja immunomagnetyczna

Znaczącą poprawę wykrywalności STEC grupy O157 w badanym materiale stanowiło połączenie metody wstępnego namnażania z separacją immunomagnetyczną komórek bakteryjnych (immunomagnetic separation – IMS). Używa się do tego cząstek lateksu opłaszczonych przeciwciałami skierowanymi przeciwko antygenowi somatycznemu O157 (IMS, Dynabeads, Dyna, Norwegia). Po ich dodaniu do hodowli bakteryjnej tworzą się łatwe do oddzielenia w polu magnetycznym kompleksy. Metoda ta pozwala na znacznie skuteczniejsze wykrycie bakterii w porównaniu

z bezpośrednią hodowlą na pożywkach mikrobiologicznych i została użyta w uznanej za referencyjną w odniesieniu do identyfikacji *E. coli* O157:H7 procedurze zawartej w normie PN-EN ISO:16654:2002 (84). Wyniki uzyskane przez Karcha i wsp. (85) wskazują na bardzo wysoką czułość techniki immunoseparacji, umożliwiającą wykrycie 10^2 komórek bakteryjnych w 1 g materiału biologicznego, przy jednoczesnej obecności 10^7 komórek bakterii tworzących.

Identyfikacja antygeny O157 *E. coli*

Do identyfikacji wyizolowanych na pożywkach selektywnych *E. coli* O157 używa się testu aglutynacji z surowicami anti-O157 i anti-H7 lub odczynu lateksowego z przeciwciałami anti-O157. Surowice poliklonalne anti-O157 mogą wykazywać jednak krzyżowe reakcje z bakteriami *Brucella abortus*, *B. melitensis* lub *Yersinia enterocolitica*. W przypadku użycia przeciwciał monoklonalnych (MAB) anti-O157 swoistość reakcji wzrasta. Celem podniesienia czułości metod serologicznych umożliwiających identyfikację *E. coli* O157, wprowadzono testy immunoenzymatyczne (ELISA), pozwalające na szybkie i skuteczne oznaczenie tych bakterii. Odczyn te wykorzystują opłaszczone na mikroplatkach przeciwciała poliklonalne anti-O157, stanowiące swoiste receptory dla oznaczanych STEC. Identyfikacja dodatnich kompleksów antygen-przeciwciała odbywa się następnie za pomocą przeciwciał monoklonalnych anti-O157, znakowanych bezpośrednio enzymem, np. peroksydazą chrzanową lub alkaliczną fosfatazą. Metoda ta jest wysoce swoista, jednak umożliwia, jak wspomniano wyżej metoda IMS, identyfikację wyłącznie bakterii grupy O157, nie ma zaś zastosowania do wykrywania pozostałych serotypów *E. coli* należących do STEC (85).

Identyfikacja markerów patogenności STEC metodami biologii molekularnej

Wprowadzenie metod opartych na biologii molekularnej, przede wszystkim amplifikacji określonych genów za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (polymerase chain reaction – PCR), znacznie usprawniło proces swoistej i szybkiej diagnostyki drobnoustrojów należących do STEC oraz istotnych z klinicznego punktu widzenia ich genotypowych markerów patogenności. Możliwe jest także oznaczenie kilku wybranych markerów genotypowych jednocześnie przy użyciu reakcji multiplex PCR (mPCR), co w znaczący sposób obniża czas i koszt wykonywanej analizy (86, 87, 88). W ostatnim okresie wprowadzono do diagnostyki molekularnej drobnoustrojów real-time PCR z użyciem barwników (SYBR

Green) oraz znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi sond molekularnych: TaqMan, fluorescence resonance energy transfer (FRET) oraz molecular beacons (MB), co skróciło czas prowadzonych badań do kilkudziesięciu minut oraz umożliwiło wysoce swoistą i dającą się określić ilościowo identyfikację materiału genetycznego w badanych próbkach. Z drugiej strony bardzo wysoki koszt aparatury i odczynników ogranicza znacznie możliwość zastosowania tej metody w rutynowej diagnostyce STEC (89; 90). Testy oparte na PCR są niezwykle czułe, jednak ich wyniki uzależnione są od rodzaju matrycowego DNA, obecności inhibitorów polimerazy oraz parametrów czasowo-temperaturowych poszczególnych etapów amplifikacji. Ponadto szczepy STEC, występujące w niewielkiej liczbie w produktach żywnościowych, są zazwyczaj zdominowane przez mikroflorę saprofityczną, a obecność w badanym materiale czynników hamujących, takich jak mioglobina, hemoglobina czy NaCl stwarza ryzyko uzyskania wyników fałszywie ujemnych. Użycie PCR do bezpośredniej identyfikacji STEC w badanym materiale biologicznym, np. żywności, ma charakter orientacyjny, ponieważ nie pozwala na identyfikację wybranych markerów patogenności u poszczególnych izolatów bakteryjnych. Możliwość taką stwarza zastosowanie sond molekularnych i techniki hybrydyzacji DNA do identyfikacji pojedynczych komórek zawierających poszukiwane geny chorobotwórczości. W odróżnieniu od reakcji PCR, nie następuje tu amplifikacja odcinka DNA stanowiącego dany gen, tylko przyłączenie (hybrydyzacja) komplementarnego fragmentu oligonukleotydowego znakowanego enzymem, np. digoksygeniną (DIG). Technika hybrydyzacji jest bardzo czuła i swoista, ponadto umożliwia analizę od kilkudziesięciu do kilkuset kolonii obecnych na płycie bakteriologicznej. Ma to istotne znaczenie, bo jak wspomniano wcześniej, STEC występują w niewielkich ilościach w badanym materiale, a ich obecność maskowana jest często występowaniem innych drobnoustrojów (91).

Identyfikacja toksyny Stx i/lub genu stx

Ze względu na zróżnicowanie biochemiczne i funkcjonalne szczepów bakteryjnych należących do STEC, jedynym miarodajnym sposobem na ocenę ich przynależności do tej grupy jest wykrycie toksyny Stx lub kodujących ją genów. Metody identyfikacji używane do tego celu można podzielić na 3 rodzaje, polegające na:

- wykazaniu efektu cytotopycznego w komórkach linii Vero,
- wykrywaniu uwolnionej przez bakterie toksyny Stx metodami serologicznymi,

– oznaczaniu obecności genu *stx*, kodującego wytwarzanie toksyn Stx za pomocą metod biologii molekularnej.

Pierwsze testy w kierunku wykrywania toksyny Shiga zostały wykonane przez Konovalchuk i wsp. (92), przy użyciu linii komórkowej Vero, w której Stx1 i Stx2 wywołują charakterystyczny efekt cytotatyczny. Metoda ta jest bardzo czuła i swoista, jednak ze względu na czas jej trwania, trudności w standaryzacji, pracochłonność i konieczność wyposażenia laboratorium w odpowiedni sprzęt, nie znajduje szerszego zastosowania w rutynowych badaniach diagnostycznych. Do serologicznych metod wykrywania Stx zalicza się odczynny oparte na metodzie ELISA. Czułość tych testów jest niższa od metody z użyciem linii komórkowej Vero. Zastosowanie mitomycyny C zwiększa 100-krotnie *in vitro* ekspresję toksyny Stx, dzięki czemu umożliwia łatwiejszą jej identyfikację (93). W badaniach rutynowych znalazły szerokie zastosowanie komercyjne testy ELISA, np. Premier EHEC (Meridian Diagnostic, Inc., USA), LMD (LMD Laboratories, USA) lub RIDASCREEN verotoxin (R-Biopharm, Niemcy; 94). Innym sposobem identyfikacji Stx jest test odwrotnej aglutynacji lateksowej, np. VTEC-RPLA (Oxoid, Wielka Brytania), który umożliwia wykrycie toksyn Shiga w supernatantach lub ekstraktach polimiksynowych komórek *E. coli* (95). Oznaczenie genów kodujących wytwarzanie toksyn Shiga może opierać się, podobnie jak w przypadku innych markerów analizowanych metodami molekularnymi, np. na PCR lub hybrydyzacji DNA z sondami molekularnymi znakowanymi DIG, pozwalającymi na różnicowanie poszczególnych odmian toksyny Stx2: Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f (96).

Podsumowanie

Jak pokazują ostatnie wydarzenia w Niemczech i innych krajach europejskich, szeroko komentowane w prasie, radio i telewizji i dotyczące masowych zachorowań po spożyciu zanieczyszczonej STEC żywności pochodzenia roślinnego (ogórki i kiełki roślin), shigatoksyczne szczepy *E. coli* stanowią groźny dla ludzi czynnik etiologiczny krwotocznego zapalenia okrężnicy, zespołu hemolityczno-mocznicowego oraz małopłytkowej plamicy zakrzepowej. Ze względu na istotne zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi w przypadku zakażenia STEC, ustanowiono dyrektywą 2003/99/WE obowiązek prowadzenia badań monitoringowych w odniesieniu do tych szczepów. Identyfikacja STEC, polegająca na oznaczeniu bakterii z użyciem pożywek selektywnych, określaniu przynależności gatunkowej testami biochemicznymi oraz wykryciu toksyn Shiga jest

czaso- i pracochłonna, a rezultaty badań nie zawsze jednoznaczne. Wynika to z różnic pomiędzy poszczególnymi szczepami należącymi do STEC, a także z małej liczby tych bakterii obecnych w badanym materiale i występowania mikroflory towarzyszącej. Powszechnie używana normatywna metoda PN-EN ISO 16654:2002 pozwala na identyfikację w żywności wyłącznie *E. coli* O157:H7, nieuwzględniając STEC innych grup serologicznych ani charakterystycznych dla nich markerów chorobotwórczości, co często utrudnia właściwą interpretację wyników badań. Wprowadzenie nowoczesnych testów opartych na biologii molekularnej, takich jak hybrydyzacja DNA ze znakowanymi sondami genetycznymi oraz amplifikacja DNA metodą PCR, znacznie usprawniło swoista i szybką diagnostykę drobnoustrojów należących do STEC.

Piśmiennictwo

- Naylor S.W., Gally D.L., Low J.C.: Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *Int. J. Food Microbiol.* 2005, **295**, 419-441.
- Nataro J.P., Kaper J.B.: Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, **11**, 142-201.
- Nayar D.M., Vetrivel S., McElroy J., Pai P., Koerner R.J.: Toxic megacolon complicating *Escherichia coli* O157 infection. *J. Infect.* 2006, **52**, 103-106.
- Kwiatk K., Róžańska H.: *Escherichia coli*, serotyp O157:H7 – czynnik etiologiczny zatruc pokarmowych u ludzi. *Medycyna Wet.* 1996, **52**, 29-32.
- Edwards P.R., Ewing W.H.: Identification of *Enterobacteriaceae*. Burgess Publishing Co., Minneapolis, USA, 1972. s. 22-58.
- Kauffmann E.: Zur serologie der *Coli*-Gruppe. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1944, **21**, 20-45.
- Whittam T.S., Wolfe M.L., Wachsmuth I.K., Orskov F., Orskov L., Wilson R.A.: Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect. Immun.* 1993, **61**, 1619-1629.
- Levine M.M.: *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohaemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 1987, **155**, 377-389.
- 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.
- Karmali M.A., Steele B.T., Petric M., Lim C.: Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1983, **1**, 619-620.
- O'Brien A.D., La Veck G.D., Thompson M.R., Formal S.B.: Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 1982, **146**, 763-769.
- O'Brien A.D., La Veck G.D. 1983. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 40:675-683.
- O'Brien A.D., Holmes R.K.: Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 1987, **51**, 206-220.
- Paton J.C., Paton A.W.: Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, **11**, 405-479.
- Mainil J.G., Daube G.: Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods, who's who? *J. Appl. Microbiol.* 2005, **98**, 1332-1344.
- Perna N.T., Plunkett G., Burland V., Mau B., Glasner J.D., Rose D.J., Mayhew G.F., Evans P.S., Gregor J., Kirkpatrick H.A., Posfai G., Hackett J., Klink S., Boutin A., Shao Y., Miller L., Grotbeck E.J., Davis N.W., Lim A.: Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 2001, **409**, 529-533.
- Karch H., Friedrich A.W., Gerber A., Zimmerhackl L.B., Schmidt M.A., Bielaszewska M.: New aspects in the pathogenesis of enteropathic hemolytic uremic syndrome. *Semin. Thromb. Hemost.* 2006, **32**, 105-112.

- Karch H., Tarr P.L., Bielaszewska M.: Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* 2005, **295**, 405-418.
- Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Gonzalez E.A., Bernardez M.I.: Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: Prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Exp. Biol. Med.* 2003, **228**, 345-351.
- Karch H., Bielaszewska M., Bitzan M., Schmidt H.: Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1999, **34**, 229-243.
- Tozzi A.E., Caprioli A., Minelli F., Gianviti A., De Petris L., Edefonti A., Montini G., Ferretti A., De Palo T., Gaido M., Rizzoni G.: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000. *Emerg. Infect. Dis.*, 2003, **9**, 106-108.
- Bielaszewska M., Schmidt H., Liesegang A., Prager R., Rabsch W., Tschape H., Cizek A., Janda J., Blahova K., Karch H.: Cattle can be a reservoir of sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H-strains and a source of human diseases. *J. Clin. Microbiol.* 2000, **38**, 3470-3473.
- Karch H., Bohm H., Schmidt H., Gunzer F., Aleksic S., Heesemann J.: Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-. *J. Clin. Microbiol.* 1993, **31**, 1200-1205.
- Karmali M.A.: Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1989, **2**, 15-38.
- Bielaszewska M., Janda J., Blahova K., Minarikova H., Jikova E., Karmali M.A., Laubova J., Sikulova J., Preston M.A., Khakhria R., Karch H., Klazarova H., Nyc O.: Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidemiol. Infect.* 1997, **119**, 299-305.
- Heuvelink A.E., Zwartkruis-Nahuis J.T., van den Biggelaar F.L., van Leeuwen W.J., de Boer E.: Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *Int. J. Food Microbiol.* 1999, **52**, 67-75.
- Osek J.: Prevalence of Shiga toxin genes among *Escherichia coli* strains isolated from pigs. *Vet. Rec.* 1999, **145**, 557-558.
- Osek J.: Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning. *Vet. Microbiol.* 1999, **68**, 209-217.
- Hertzke D.M., Cowan L.A., Schoning P., Fenwick B.W.: Glomerular ultrastructural lesions of idiopathic cutaneous and renal glomerular vasculopathy of greyhounds. *Vet. Pathol.* 1995, **32**, 451-459.
- Perreira V.R., Yano T.: Cytotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from chickens with swollen head syndrome (SHS). *Vet. Microbiol.* 1998, **62**, 111-119.
- Watanabe H., Wada A., Inagaki Y., Itoh K., Tamura K.: Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan 1996. *Lancet* 1996, **348**, 831-832.
- Ahmed S., Donaghy M.: An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in Central Scotland. W: Kaper J.B., O'Brien A.D.: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington D.C., USA, 1998, ss. 59-65.
- Orr P., Lorencz B., Brown R.: An outbreak of diarrhea due to verotoxin-producing *Escherichia coli* in the Canadian Northwest Territories. *Scand. J. Infect. Dis.* 1994, **26**, 675-684.
- Swerdlow D.L., Woodruff B.A., Brady R.C.A.: Waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann. Intern. Med.* 1992, **117**, 812-819.
- 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.
- Beutin L., Krause G., Zimmermann S., Kaulfuss S., Glier K.: Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J. Clin. Microbiol.* 2004, **42**, 1099-1108.
- Caprioli A., Tozzi A.E., Rizzoni G., Karch H.: Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 1997, **3**, 578-579.
- Paciorek J.: Virulence properties of *Escherichia coli* faecal strains isolated in Poland from healthy children and strains belonging to serogroups O18, O26, O44, O86, O126 and O127 isolated from children with diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* 2002, **51**, 548-556.

39. Szych J, Paciorek J, Cieślak A, Kałużewski S: Charakterystyka szczepów *E. coli* O157 izolowanych w Polsce z próbek materiałów klinicznych i z żywności. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 1999, **50**, 179-96.
40. Sobieszczanska B.M., Gryko R., Kuzko K., Dworniczek E.: Prevalence of non-O157 *Escherichia coli* strains among shiga-like toxin-producing (SLTEC) isolates in the region of Lower Silesia, Poland. *Scand. J. Infect. Dis.* 2004, **36**, 219-221.
41. Kwiatek K., Różańska H.: The comparative evaluations of methods for the detection of verocytotoxic strains of *Escherichia coli* O157:H7 in food. *W: Hygiene alimentorum XIX*, Koszyce 26-28.10.1998, Materiały konferencyjne, ss. 112-114.
42. Osek J., Gallien P., Protz D.: Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from calves in Poland. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 2000, **23**, 267-276.
43. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFA Journal*, 2011, **3**, 2090.
44. Varma J.K., Greene K.D., Reller M.E., DeLong S.M., Trotter J., Nowicki S.E., DiOrio M., Koch E.M., Bannerman T.L., York S.T., Lambert-Fair M., Wells J.G., Mead P.S.: An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to a contaminated building. *J. Am. Med. Assoc.* 2003, **290**, 2709-2712.
45. Armstrong G.L., Hollingsworth J., Morris J.G. Jr.: Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiol. Rev.* 1996, **18**, 29-51.
46. Olsen S.J., Miller G., Breuer T., Kennedy M., Higgins C., Walford J., McKee G., Fox K., Bibb W., Mead P.: A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems. *Emerg. Infect. Dis.* 2002, **8**, 370-375.
47. Sivapalasingam S., Friedman C.R., Cohen L., Tauxe R.V.: Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J. Food Prot.*, 2004, **67**, 2342-2353.
48. Crump J.A., Sulka A.C., Langer A.J., Schaben C., Crielly A.S., Gage R., Baysinger M., Moll M., Withers G., Toney D.M., Hunter S.B., Hoekstra R.M., Wong S.K., Griffin P.M., Van Gilder T.J.: An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *N. Engl. J. Med.* 2002, **347**, 555-560.
49. Shukla R., Slack R., George A., Cheasty T., Rowe B., Scutter J.: *Escherichia coli* O157 infection associated with a farm visitor center. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* 1995, **5**, 86-90.
50. Bell B.P., Griffin P.M., Lozano P., Christie D.L., Kobayashi J.M., Tarr P.I.: Predictors of hemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Pediatrics* 1997, **100**, 212.
51. Griffin P.M., Tauxe R.V.: The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 1991, **13**, 60-98.
52. Scheutz F., Beutin L., Pierard D., Smith H.R.: Nomenclature of Verocytotoxins. *W: Duffy G., Garvey P., McDowell D.: Verocytotoxinigenic Escherichia coli*, Food & Nutrition Press Inc., Trumbull, USA, 2001. ss. 447-452.
53. Calderwood S.B., Acheson D.W.K., Keusch G.T., Barrett T.J., Griffin P.M., Strockbine N.A., Swaminathan B., Kaper J.B., Levine M.M., Kaplan B.S., Karch H., O'Brien A.D., Obrig T.G., Takeda Y., Tarr P.L., Wachsmuth I.K.: Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News* 1996, **62**, 118-119.
54. Friedrich A.W., Borell J., Bielaszewska M., Fruth A., Tschape H., Karch H.: Shiga toxin 1c-producing *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic characterization and association with human disease. *J. Clin. Microbiol.* 2003, **41**, 2448-2453.
55. Schmitt C.K., McKee M.L., O'Brien A.D.: Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect. Immun.* 1991, **59**, 1065-1073.
56. Pierard D., Muyldermans G., Moriau L., Stevens D., Lauwers S.: Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 3317-3322.
57. Morabito S., Dell'omo G., Agrimi U., Schmidt H., Karch H., Cheasty T., Caprioli A.: Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. *Vet. Microbiol.* 2001, **82**, 275-283.
58. Leung P.H.M., Peiris J.S.M., Ng W.W.S., Robins-Brown R.M., Bettelheim K.A., Yam W.C.: A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxinigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, **69**, 7549-7553.
59. Weinstein D.L., Jackson M.P., Samuel J.E., Holmes R.K., O'Brien A.D.: Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J. Bacteriol.* 1988, **170**, 4223-4230.
60. Cherala R.P., Lee S.Y., Tesh V.L.: Shiga toxins and apoptosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003, **228**, 159-166.
61. Frankel G., Phillips A.D., Rosenshine I., Dougan G., Kaper J.B., Knutson S.: Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol. Microbiol.* 1998, **30**, 911-921.
62. 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.
63. Oswald E., Schmidt H., Morabito S., Karch H., Marches O., Caprioli A.: Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect. Immun.* 2000, **68**, 64-71.
64. Rashid R.A., Tabata T.A., Oatley M.J., Besser T.E., Tarr P.L., Moseley S.L.: Expression of putative virulence factors of *Escherichia coli* O157:H7 differs in bovine and human infections. *Infect. Immun.* 2006, **74**, 4142-4148.
65. Toma C., Higa N., Iyoda S., Rivas M., Iwanaga M.: The long polar fimbriae genes identified in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are present in other diarrheagenic *E. coli* and in the standard *E. coli* collection of reference (ECOR) strains. *Res. Microbiol.* 2006, **157**, 153-161.
66. Torres A.G., Giron J.A., Perna N.T., Burland V., Blattner F.R., Avelino-Flores F., Kaper J.B.: Identification and characterization of *lpfABCDEF*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 2002, **70**, 5416-5427.
67. Tarr P.L., Bilge S.S., Vary J.C., Jelacic S., Habeeb R.L., Ward T.R., Baylor M.R., Besser T.E.: Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect. Immun.* 2000, **68**, 1400-1407.
68. 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* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*. *Infect. Immun.* 2003, **71**, 3343-3348.
69. Baumler A.J., Tsois R.M., Heffron E.: The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, **93**, 279-283.
70. Jordan D.M., Cornick N., Torres A.G., Dean-Nystrom E.A., Kaper J.B., Moon H.W.: Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in vivo. *Infect. Immun.* 2004, **72**, 6168-6171.
71. Osek J., Weiner M., Hartland E.L.: Prevalence of the *lpfO113* gene cluster among *Escherichia coli* O157 isolates from different sources. *Vet. Microbiol.* 2003, **96**, 259-266.
72. Schmidt H., Beutin L., Karch H.: Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* 1995, **63**, 1055-1061.
73. Schmidt H., Karch H., Beutin L.: The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* α -hemolysin family. *FEMS Microbiol. Lett.* 1994, **117**, 189-196.
74. Beutin L., Stroehrer U.H., Manning P.A.: Isolation of enterohemolysin (Ehly2)-associated sequences encoded on temperate phages of *Escherichia coli*. *Gene* 1993, **132**, 95-99.
75. Schmidt H., Karch H.: Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 1996, **34**, 2364-2367.
76. Fratamico P.M., Bhaduri S., Buchanan R.L.: Studies on *Escherichia coli* serotype O157:H7 strains containing a 60-MDa plasmid and on 60-MDa plasmid-cured derivatives. *J. Med. Microbiol.* 1993, **39**, 371-381.
77. Brunder W., Schmidt H., Karch H.: KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* 1996, **142**, 3305-3315.
78. Paton A.W., Srimanote P., Woodrow M.C., Paton J.C.: Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxinigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect. Immun.* 2001, **69**, 6999-7009.
79. March S.B., Ratnam S.: Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* 1986, **23**, 869-872.
80. Farmer J.J. III, Davis B.R.: H7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single-tube screening method for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* 1985, **22**, 620-625.
81. Gunzer F., Bohm H., Russmann H., Bitzan M., Aleksic S., Karch H.: Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 1992, **30**, 1807-1810.
82. Zadik P.M., Chapman P.A., Siddons C.A.: Use of tellurite for the selection of verocytotoxinigenic *Escherichia coli* O157. *J. Med. Microbiol.* 1993, **39**, 155-158.
83. Thompson J.S., Hodge D.S., Borczyk A.A.: Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. *J. Clin. Microbiol.* 1990, **28**, 2165-2168.
84. PN-EN ISO 16654:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horzontalna metoda wykrywania *Escherichia coli* O157, PKN, Warszawa.
85. Karch H., Janetzki-Mittmann C., Aleksic S., Datz M.: Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture. *J. Clin. Microbiol.* 1996, **34**, 516-519.
86. Gannon V.P.J., D'Souza S., Graham T., King R.K., Rahn K., Read S.: Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity and identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 1997, **35**, 656-662.
87. Paton A.W., Paton J.C.: Direct detection and characterization of Shiga toxinigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. *J. Clin. Microbiol.* 2002, **40**, 271-274.
88. Wang G., Clark C., Rodgers G.: Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002, **40**, 3613-3619.
89. Bhagwat A.A.: Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, **84**, 217-224.
90. Sharma V.K., Dean-Nystrom E.A.: Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 by using a multiplex real-time PCR assay for genes encoding intimin and Shiga toxins. *Vet. Microbiol.* 2003, **93**, 247-260.
91. Osek J., Gallien P.: Zastosowanie specyficznych dla toksyn Shiga sond DNA znakowanych digoksygeniną do oznaczania w kale bydła shigatoksycznych szczepów *Escherichia coli* (STEC). *Medycyna Wet.* 2002, **58**, 863-866.
92. Konovalchuk J., Speirs J.L., Stavric S.: Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1977, **18**, 775-779.
93. Law D., Ganguli L.A., Donohue-Rolfe A., Acheson D.W.: Detection by ELISA of low numbers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures after growth in the presence of mitomycin C. *J. Med. Microbiol.* 1992, **36**, 198-202.
94. Mackenzie A.M., Lebel P., Orrbine E., Rowe P.C., Hyde L., Chan F., Johnson W., McLaine P.N.: Sensitivities and specificities of Premier *E. coli* O157 and Premier EHEC enzyme immunoassays for diagnosis of infection with verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 1608-1611.
95. Beutin L., Zimmermann S., Gleier K.: Rapid detection and isolation of Shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. *J. Clin. Microbiol.* 1996, **34**, 2812-2814.
96. Osek J., Weiner M.: Opracowanie testów multiplex PCR do identyfikacji odmian toksyn Shiga wytwarzanych przez *Escherichia coli*. *Medycyna Wet.* 2004, **60**, 207-210.

Dr Marcin Weiner, Zakład Mikrobiologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, e-mail: mpweiner@piwet.pulawy.pl