

## Enterohemoragični sevi *Escherichia coli* in onesnaženost hrane od polja do mize

Anamarija Zore<sup>1,2</sup>, Peter Zabukovnik<sup>3</sup>, Alenka Andlovic<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Univerza v Ljubljani, Visoka šola za zdravstvo, Oddelek za zdravstveno nego

<sup>2</sup>Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

<sup>3</sup>Univerzitetni klinični center, Ginekološka klinika

### IZVLEČEK

*Escherichia (E.) coli* je stalen prebivalec črevesne flore pri človeku in največkrat za človeka koristna bakterijska vrsta. V zadnjih desetih letih pa smo spoznali tako imenovano novo, porajajočo se diarealno bolezen, ki jo povzroča enterohemoragični sev *E. coli* (EHEC) serotipa O157, ki se pojavlja tudi v Sloveniji. Omenjeni sev lahko proizvaja toksine, ki so podobni toksinom šigel in jih vključujemo v STEC (angl. Shiga toxin – producing *E. coli*) skupino *E. coli*. Ti sevi so pomembni povzročitelji zastrupitev s hrano. Sevi EHEC povzročajo krvavo drisko, hemoragični kolitis, katerega možna zapleta sta hemolitični uremični sindrom (HUS) in trombotična trombocitopenična purpura. Najpogostejši rezervoar sevov STEC in EHEC je govedo, lahko pa je preko kontaminiranih iztrebkov okužena tudi zelenjava. Virulenco določajo toksini, ki so podobni toksinom šigel (STX), adhezin intimin (EaeA) in enterohemolizin (EhxA). Analizirali smo 122 sevov *E. coli*, ki smo jih izolirali s koprokulturo pri hospitaliziranih bolnikih s krvavo drisko v obdobju od 1993-2002. Izolirane seve smo testirali z »multiplex« veržno reakcijo s polimerazo (PCR), pri kateri smo hkrati pomnoževali dele odsekov DNK na štirih genih: *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eaeA* in *ehxA*. Med 122 analiziranimi sevi smo pri 16 našli iskane gene. Večina (15) je imela gene za *stx*<sub>2</sub> in *ehxA*. V Sloveniji je okužba z visoko patogenim sevom *E. coli* sicer redka in še nismo zasledili večjih epidemij. Najdeni serotipi so potencialno možen izvor epidemij s katerimi se že srečujejo po svetu in pomembno je, da pri pridelavi, proizvodnji in pripravi hrane pomislimo tudi na enterohemoragično *E. coli*.

### IZHODIŠČA

Incidenca nalezljivih boleznih zaradi oporečne hrane narašča tudi v razvitem svetu. Danes že veliko vemo o povzročiteljih in imamo izdelane varnostne ukrepe za preprečevanje okužb, saj je želja in dolžnost zagotoviti zdravo, neoporečno hrano. Število prijavljenih okužb pa se kljub temu povečuje. Delno zaradi bolj doslednega prijavljanja, izpopolnjene mikrobiološke diagnostike in tudi zaradi prilagajanja mikroorganizmov na nova okolja, oziroma zaradi sposobnosti bakterij pridobivati nove gene za patogenost.

Najpogostejši povzročitelji mikrobnih okužb in zastrupitev s hrano so med bakterijami *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* O157:H7. Med njimi jih je kar nekaj, ki so se

pojavi se šele v zadnjih 25 letih (Taxe RV, 2002) in jih imenujemo “porajajoči se” patogeni mikroorganizmi (angl. emerging pathogens). V Sloveniji je incidenca prijavljenih infekcij z enterohemoragično *E. coli* okoli 4/ 100 000 prebivalcev na leto (IVZ RS, letopisi 2002-2006). Med zbolelimi pa pogosteje zbole vajo otroci mlajši od 5 let (IVZ RS, letopisi 2002-2006).

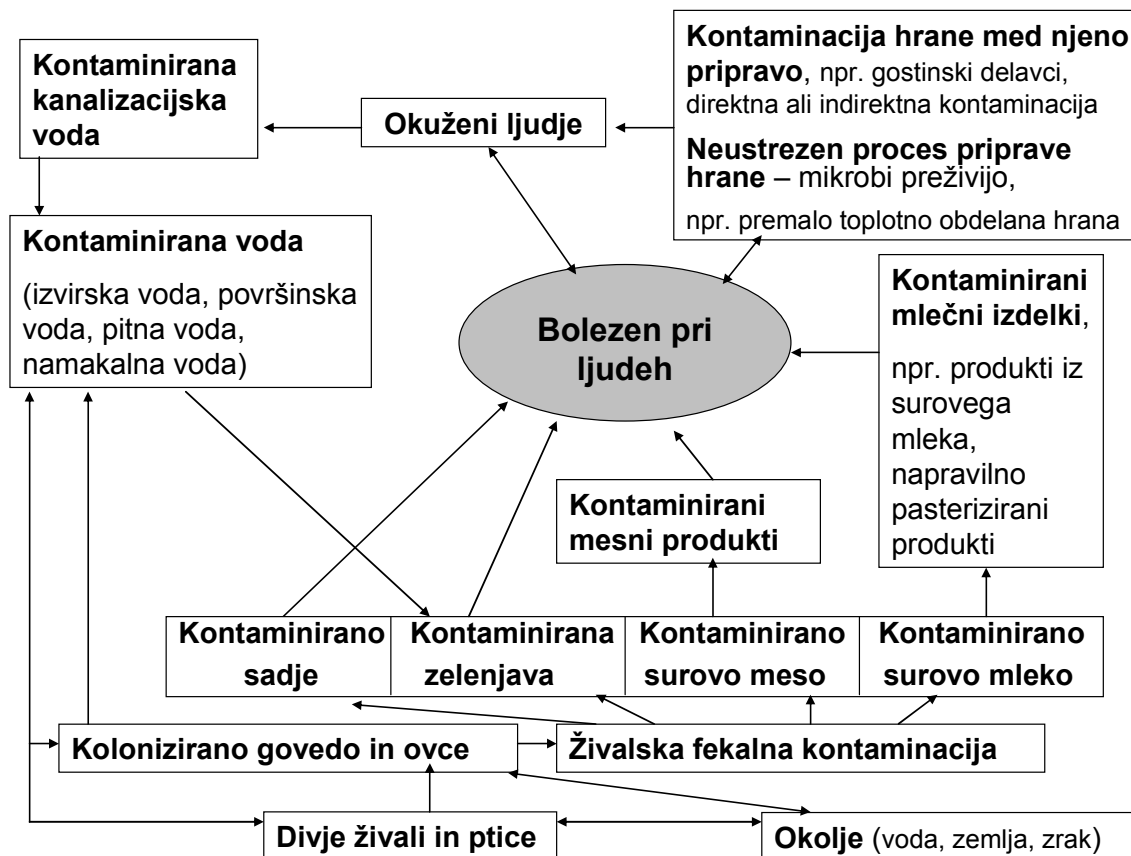
Preučevali smo skupino enterohemoragičnih sevov *E. coli* (EHEC), ki proizvajajo toksine, podobne citotoksinu bakterije *Shigella dysenteriae* tip 1. Zato jih imenujemo s skupnim imenom STEC (angl. Shiga toxin – producing *E. coli*). Toksine imenujemo lahko tudi verotoksini, ker so citotoksični za Vero celice (ledvične celice afriške zelene opice) ali pa se zanje uporablja okrajšava SLT (angl. Shiga-like toxin). V zadnjem času uporabljamo večinoma okrajšavo STX. Ločimo dve skupini STX toksinov. Stx1 je zelo podoben citotoksinu šigele. Stx2 je pomembnejši in bolj heterogen. Geni za STX so pri *E. coli* na lambdoidnih bakteriofagih. Toksini se sprostijo iz celice, ko bakterija propade (Unkmeir A, 2000). Pri zastrupitvah s hrano s STEC se pri ljudeh zaradi toksinov pojavijo krvave driske, hemolitični uremični sindrom (HUS) in trombotična trombocitopenična purpura in se lahko končajo tudi s smrtnim izidom. Povezavo med toksinom STX in boleznijo HUS so ugotovili šele leta 1983 po dveh večjih epidemijah v ZDA (Sandkvist M, 2001).

Posebnost serotipa O157:H7 je, da večina sevov ne fermentira sorbitola. Ta lastnost je omogočila izdelavo selektivnih gojišč za izolacijo tega serotipa (Strockbine NA, 1998). O157:H7 serotip ima okvarjen sistem za popravljanje mutacij, zato sprejema dele tuje DNK hitreje kot druge *E. coli* (LeClerc JE, 1996). Ta serotip je odporen proti različnim organskim kislinam. Preživi in razmnožuje se lahko tudi pri pH okoli 4, odvisno od temperature in tipa organske kisline. Zato je bil npr. nepasteriziran jabolčni sok že vir epidemije v ZDA, saj njegova naravna kislost ni preprečila razmnoževanja *E. coli* O157:H7 (Taxe RV, 2002, Conner DE, 1995). Ta serotip se pojavlja najpogosteje v govejem mesu (mleto meso, hamburgerji), lahko tudi v svežem mleku, kalčkih in sveži zelenjavi (Taxe RV, 2002, Rangel JM, 2006).

Med STEC sevi je za epidemije v ZDA, Kanadi, Angliji in na Japonskem najpomembnejši serotip O157:H7. V kontinentalni Evropi, Avstraliji in Južni Ameriki pa prevladujejo drugi serotipi npr. O111, O26, O103 (WHO, 1998). V Evropi so postali izbruhi infekcij STEC pogostejši šele po letu 1990. To nas opozarja, da lahko postanejo infekcije STEC resen zdravstveni problem tudi pri nas (Caprioli A, 1998, Rangel JM, 2006).

Toksigeno serološko skupino *E. coli* najdemo v hrani največkrat zaradi ljudi, ki so kolonizirani s takim tipom bakterije in sodelujejo pri pripravi hrane. Vir infekcije je lahko voda, kontakt z živalmi, ki nosijo EHEC, ali pa se bakterije prenesejo iz človeka na človeka (Slika 1) (Bettelheim KA, 2005, Rangel JM, 2006). Naravni rezervoar EHEC je govedo in druge živali, ki jih uporabljamo za hrano. Tovrstne bakterije je skoraj nemogoče popolnoma odstraniti iz verige pridelave hrane. Živalska trupla so splošno kontaminirana z *E. coli* iz črevesja umrle živali, kljub ustreznim pogojem za preprečevanje kontaminacije. Tudi če z močnimi curki bakterije odstranjujejo, se jih del razprši po mesu in so lahko vir infekcije. Tudi voda, ki jo uporabljajo v te namene, je lahko rezervoar bakterij EHEC. Tudi pri pripravi piščancev je lahko voda vir okužbe. Bakterije so že našli v rezervoarju vode, ki jo uporabljajo pri čiščenju in hlajenju oziroma zamrzovanju perutnine (Slika 1). Bakterija celo preživi zamrzovanje in je lahko vir okužbe za človeka oziroma njegovo kolonizacijo. Znano je, da infekcijo povzroči že zelo nizka infektina doza, manj kot 100 celic EHEC. Zlasti pogosto v razvitih deželah kot tudi v deželah v razvoju najdejo v hrani patogeno *E.*

*coli* ali enterotoksigeno *E. coli* na surovem mesu, ki je direktno izpostavljeno okužbi z EHEC zaradi fekalne kontaminacije ali posredno s fekalnimi bakterijami okuženi vodi (Slika 1). Število EHEC lahko zmanjšamo ali bakterijo odstranimo iz hrane z normalno, dobro vodeno proizvodnjo hrane, npr. s postopki čiščenja in pasterizacijo. Pri okuženih živalih, ki izločajo z iztrebki patogeno *E. coli*, se lahko s to bakterijo okuži tudi mleko.



Slika 1: Shematski prikaz glavnih poti in prenosa EHEC od polja do mize (povzeto po poročilu o kontroli enterohemoragične *E. coli* (EHEC), (ILSI Europe Report 2001).

Ko so naredili poizkus na prostovoljcih, ki so zaužili hrano z različno velikim inokulom *E. coli*, so dokazali, da so serotip, ki ga je prostovoljec pojedel, izolirali tudi iz njegovega iztrebka in da so pri posameznikih iz blata lahko izolirali bakterijo še več kot mesec dni. Pri prostovoljcih je prišlo do kolonizacije zaužite bakterije.

EHEC seve najdemo pri prašičih, govedu, ovcah, odraslih pticah in kokoših. Večinoma živali ne zbolijo za diarealno boleznijo in predstavljajo le rezervoar za EHEC (Bettelheim KA, 2005).

Za izvajanje stalne kontrole prisotnosti EHEC je potrebno pri proizvodnji hrane stalno:

- izboljševati dobro higiensko prakso pri reji živine,
- izboljševati nadzor nad človeškimi in živalskimi fekalijami in nadzor nad vodo,
- izboljševati dobro higiensko prakso v klavnicah,
- omogočiti dobro higiensko prakso v poljedelstvu in vodenje nadzora pri proizvodnji hrane od polja do mize, ki sloni na sistemu HACCP,

- izobraževanje delavcev v proizvodnji hrane in javnosti o odgovornosti za varno in higiensko neoporečno rokovanje s hrano.

Cilja in namen naše raziskave sta bila določitev pogostosti izolatov STEC pri EHEC med izoliranimi sevi *E. coli* pri bolnikih z vodeno in/ali krvavo drisko in njihova uvrstitev v serološke skupine. Želeli smo razviti hitro molekularno metodo, multipleks PCR, s katero bi ugotavljali hkrati gene za toksine (*stx<sub>1</sub>* in *stx<sub>2</sub>*) in gene za pomožna virulenca dejavnika adhezin intimin (*eaeA*) in enterohemolizin (*ehxA*). Tako smo želeli opredeliti virulencne dejavnike naših izolatov.

## METODE

Analizirali smo bakterije, ki so pripadale vrsti *E. coli* STEC iz 122 izolatov iz blata bolnikov, hospitaliziranih z vodeno in/ali krvavo drisko, ki smo jih shranili na trajnih gojiščih na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, v letih 1993-2002 in pri katerih smo sumili, da lahko pripadajo skupini STEC. Testirali smo štiri virulencne dejavnike. Izolati so pripadali 15 serološkim skupinam. Večina izolatov je pripadala skupinam O26, O157, O113, O111 in O55, nekaj pa smo jih izbrali naključno, glede na pogostnost STEC med določenimi serotipi (Report of a WHO, 1998). Iz čistih kultur posameznega izolata smo pripravili suspenzijo celic s koncentracijo  $1,7 \times 10^9$  celic/ml in iz bakterij najprej ekstrahirali DNK, tako da smo suspenzijo segrevali 15 minut pri temperaturi 99°C. Ostanke celic smo s centrifugiranjem odstranili in DNK predstavili v svežo epruveto. 5 µl vzorca smo uporabili v reakciji PCR, preostanek smo shranili pri – 20°C.

Reakcijo PCR smo izvajali v 35 ciklih, pri čemer smo uporabili 4 pare začetnih oligonukleotidov, za vsak gen enega. Preglednica 1 opisuje začetne oligonukleotide, ki smo jih uporabili za detekcijo določenega gena. Vsak par začetnih oligonukleotidov je pomnoževal različno dolg odsek DNK. Tako smo na genu za toksin STX1 - *stx<sub>1</sub>* pomnoževali 180 baznih parov dolg del, na genu za toksin STX2 - *stx<sub>2</sub>* 255 baznih parov, na genu za adhezin intimin – *eaeA* 384 baznih parov in na genu za enterohemolizin – *ehxA* 534 baznih parov dolg del DNK (Paton AW, 1998).

Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo (10).

Ime	Sekvenca oligonukleotida (5' - 3')	Mesto na genu	Dolžina pomnožka (bp)
Stx1F Stx1R	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC AGAACGCCCACTGAGATCATC	Nukleotidi od 454 do 633 podenote A gena <i>stx<sub>1</sub></i>	180
Stx2F Stx2R	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC GCCTCAGTTATCTGACATTCTG	Nukleotidi od 603 do 857 podenote A gena <i>stx<sub>2</sub></i>	255
EaeAF EaeAR	GACCCGGCACAAGCATAAGC CCACCTGCAGCAACAAGAGG	Nukleotidi od 27 do 410 gena <i>eaeA</i>	384
HlyAF HlyAR	GCATCATCAAGCGTACGTTCC AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	Nukleotidi od 70 do 633 gena <i>ehxA</i>	534

V produktu PCR reakcije smo dobili mešanico štirih različno dolgih odsekov DNK, če je izolirani sev vseboval vse štiri iskane gene. Produkti PCR so bili različno dolgi. Zato smo pri detekciji produkta PCR za posamezne gene lepo ločili z elektroforezo v električnem polju (pri 70 V, 45 minut) na agaroznem gelu. Pasove (namnožene dele) DNK smo nato obarvali z etidijevim bromidom in jih opazovali v UV svetlobi. Velikost produktov reakcije PCR smo določili s primerjavo njihove lege glede na masni označevalec in jih dokumentirali s polaroidno kamero. Pri vsaki reakciji PCR smo vključili tudi pozitivno in negativno kontrolo. Pozitivna kontrola je bil sev STEC pri katerem smo našli vse štiri gene, za negativno kontrolo pa smo namesto vzorca izolirane DNA uporabili 5 µl destilirane vode (Slika 1).

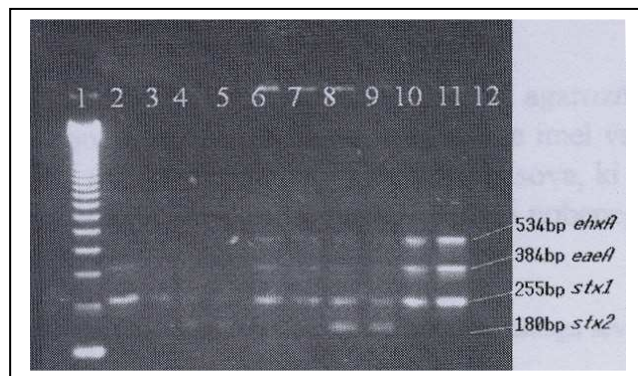
## REZULTATI IN RAZPRAVA

Rezultate reakcij PCR prikazuje preglednica 2, slika 1 pa sliko agaroznega gela z nanešenimi vzorci. 48 (39,3 %) izolatov ni imelo nobenega od iskanih genov. To so bili naključno izbrani izolati, med katerimi jih je bilo nekaj iz pomembnih seroloških skupin. Gen za intimin (*eaeA*) smo dokazali pri 31 (25,5 %) izolatih, gen za intimin in heterohemolizin (*ehxA*) pa pri 26 (21,5 %) izolatih, med katerimi jih je večina pripadala serološki skupini O26. Tri gene, *eaeA*, *ehxA* in gen za STX2 (*stx<sub>2</sub>*), je imelo 8 (6,6 %) izolatov. Ti trije geni so se pojavljali tako pri serološki skupini O26, kot pri skupini O157. Vse štiri gene pa so imeli štirje sevi (3%) in vsi štirje so pripadali serološki skupini O157. Vsi izolati STEC, razen enega, so imeli gen *stx<sub>2</sub>*. Prav tako so imeli vsi izolati STEC, razen enega, gen za heterohemolizin *ehxA*.

Šest izolatov (38 % vseh STEC) je imelo gena za oba toksina, gen *stx<sub>2</sub>* pa skoraj vsi (94 % vseh STEC) izolati STEC. Skupina toksinov STX2 velja za bolj toksično (Melton-Celsa AR, 1998). To pojasnjujemo s tem, da v Laboratorij za diagnostiko črevesnih infekcij dobimo vzorce hospitaliziranih bolnikov, pri katerih so boleznijo povzročili bolj toksični sevi, kot jih najdemo v naravi ali pri živalih.

Našli smo 16 izolatov STEC, pri katerih smo dokazali vsaj en gen za STX. Med njimi smo dokazali gena *stx<sub>2</sub>* in *ehxA* pri 15 sevih. Najpogostejša serološka skupina med izolati STEC je bila O157 (10 izolatov), sledila je O26 s tremi izolati. Po en izolat STEC pa je pripadal serološkim skupinam O17, O111 in O113. Skoraj vsi izolati STEC so imeli tudi gen za intimin *eaeA* (81 % vseh STEC) in enterohemolizin *ehxA* (94 % vseh STEC), kar je v skladu z drugimi študijami, ki so pokazale pomembno povezavo med prisotnostjo genov *stx<sub>2</sub>*, *eaeA* in *ehxA* pri izolatih STEC, izoliranih iz iztrebkov pri ljudeh (Boerlin P, 1999). Zanimivih je tudi šest O157 izolatov, ki so imeli le gen za intimin. Pri teh lahko sumimo, da so z razmnoževanjem v laboratorijskih razmerah izgubili plazmid pO157 in gene za STX. To je precej pogost pojav, saj so geni za STX večinoma na bakteriofagih (Bettelheim KA, 2005). Za potrditev te domneve bi morali spremljati te izolate od prve izolacije in ugotoviti, pri kateri pasaži se ti izgubijo.

Več kot polovica (62 %) naših izolatov STEC je pripadala serološki skupini O157. Delež serološke skupine O157 pri izolatih STEC je verjetno precenjen, saj je glede na njihove metabolne posebnosti njihova izolacija precej lahka (v primerjavi z izolacijo izolatov STEC iz ostalih seroloških skupin). To pomeni, da je delež izolatov STEC, ki niso O157, podcenjen. To sta ugotovila tudi Caprioli in Tozzi (Caprioli A, 1998), ko sta preučevala infekcije STEC v Srednji Evropi.



Slika 1: Produkti PCR se na agaroznem gelu zaradi različnih dolžin med seboj lepo ločijo. Na mesto 1 smo nanegli masni označevalec, katerega velikosti so večkratniki 123 bp (najnižji pas). Na zadnje mesto smo nanegli negativno kontrolo. Na mestu 9 je pozitivna kontrola – sev z vsemi štirimi geni. Vzorca 2 in 3 imata le *eaeA* in *stx1* gen. Vzorec 4 in 5 imata gena za *stx1* in *stx2*, vzorci 6, 7, 10, 11 imajo gene za *ehxA*, *eaeA* in *stx1*, vzorec 8 pa ima vse štiri gene.

Letno število izolatov STEC, ki smo jih izolirali v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko črevesnih infekcij, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, je nihalo v letih 1993 do 2002 med 0 in 3 na leto. V teh letih nismo opazili naraščanja ali padanja njihovega števila. Na prvi pogled je število okuženih sicer majhno, vendar se moramo zavedati, da smo dobili v laboratorij le najhujše primere in nemalokrat se je bolezen zaključila usodno. V letu 1997 in leta 2002 smo izolirali v avgustu po dva izolata STEC serološke skupine O157 z enakim PCR profilom. Leta 1997 s PCR profilom *stx1*, *stx2*, *eaeA*, *ehxA*, leta 2002 pa s PCR profilom *stx2*, *eaeA*, *ehxA*. Sorodnost po genotipu, določena s PCR sicer še ne pomeni, da gre dejansko za enake seve, omogoča pa nam, da v to posumimo. Za potrditev bi morali uporabiti kako genetsko epidemiološko metodo, kot je na primer PFGE (elektroforeza v utripajočem električnem polju), s katero bi lahko z gotovostjo trdili ali gre za enake seve ali ne. Za ugotavljanje epidemiološke povezanosti bi potrebovali več informacij o bolnikih, ki so bili okuženi. Ugotoviti bi morali, kaj je bil vir okužbe, na primer ista hrana ali kopanje v isti bazenski vodi.

Preglednica 2: Značilnosti sevov *E. coli*, analiziranih z metodo PCR

Genotip	Seznam seroloških skupin O in v oklepaju število izolatov določenega serotipa.	Skupno število izolatov
<i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eaeA</i> , <i>ehxA</i>	O157 (4)	4
<i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>ehxA</i>	O113 (1)	1
<i>stx1</i> , <i>stx2</i>	O17 (1)	1
<i>stx1</i> , <i>eaeA</i> , <i>ehxA</i>	O111 (1)	1
<i>stx2</i> , <i>eaeA</i> , <i>ehxA</i>	O157 (5), O26 (3)	8
<i>stx2</i> , <i>ehxA</i>	O157 (1)	1
<i>eaeA</i> , <i>ehxA</i>	O26 (25), O145 (1)	26
<i>eaeA</i>	O157 (6), O26 (19), O55 (4), O113 (1), O115 (1)	31
<i>ehxA</i>	O113 (1)	1
Nobeden od iskanih genov	O157(4), O26(6), O55(8), O111(3), O111(6), O17(8), O1(4), O6(1), O78(1), O18ac(2), O101(1), O75(3), NT(1)	48
Vseh izolatov skupaj:		122

Mnogokratna (t.i. "Multiplex") metoda PCR, ki smo jo uporabili v naši študiji, smo pri preiskovanih bakterijah vedno uporabili po predhodni namnožitvi bakterije v čisti kulturi, kar je bila velika prednost, saj smo količino izhodiščnega vzorca določili sami. Test smo optimizirali na manj kot  $1,7 \times 10^7$  kopij določenega dela gena STEC v mililitru vzorca. Želimo pa si to metodo uporabiti kar v vzorcu pacienta, v hrani ali pri vzorcu živali, ali pa vsaj na mešani kulturi. Zavedamo se, da smo še pred večjim izzivom. V navedenih vzorcih bo zaradi interakcije z določenimi snovmi v vzorcu lahko prišlo do inhibicije same reakcije, oziroma encima polimeraze, kar pomeni, da bo potrebno reakcijo optimizirati za vsako vrsto vzorca posebej. Le na ta način bomo dobili zanesljive rezultate. Kljub tako dobljenim pozitivnim rezultatom pa je potrebno izvesti tudi klasično izolacijo zaradi kasnejše epidemiološke študije.

Majhno število pozitivnih vzorcev pojasnjujemo tudi s pomembnostjo pravilnega odvzema vzorca, saj je največje število bakterij enterohemoragične *E. coli* v prvem vzorcu, ko se diareja pojavi, pri vsakem naslednjem izločanju pa je število bakterij že pomembno manjše. Ob takih primerih moramo uporabiti posebne tehnike z obogatitvenimi mikrobiološkimi gojišči ali pa novejšo metodo imunomagnetne izolacije.

## SKLEP

Boljše razumevanje ekologije in načinov prenosa mikrobnih povzročiteljev bolezni, kakor tudi njihovih virulenčnih dejavnikov, bo omogočilo hitrejše obvladovanje novih patogenov v prihodnosti. Pomembno je, da poznamo stanje pogostosti infekcije z enterohemoragično *E. coli* in njene virulenčne dejavnike. Trenutno zasledimo pri nas sporadične primere okužbe, kar pa ne pomeni, da se ne bomo morali v bližnji prihodnosti spopadati tudi z občasnimi epidemijami.

## LITERATURA

1. Bettelheim KA (2005) *Escherichia coli*. <http://www.microbionet.com.au/topics/escherichia.htm> <20.10.2005>
2. Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL (1999). Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *E. coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol* 37 (3): 497-503.
3. Caprioli A, Tozzi AE (1998). Epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in continental Europe. V: *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin – producing *E. coli* strains. 1<sup>st</sup> ed. Kaper JB, O'Brien AD (eds.). Washington: ASM, 38-48.
4. Conner DE, Kotrola JS (1995). Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Appl Environ Microbiol* 61 (1): 382-5.
5. ILSI Europe Report (2001). Approach to the control of entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) ILSI Europe Emerging Pathogen Task Force, ILSI Press.
6. IVZ RS, letopisi (2002-2006), <http://www.sigov.si/ivz/>.
7. LeClerc JE, Li B, Payne WL, Cebula TA (1996). High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science* 274 (5290): 1208-11.

8. Melton-Celsa AR, O'Brien AD (1998). Structure, biology, and reative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. V: *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin – producing *E. coli* strains. 1<sup>st</sup> ed. Kaper JB, OBrien AD (eds.). Washington: ASM Press: 1-11.
9. Paton AW, Paton JC (1998). Detection and characterization of Shiga toxigenic *E. coli* by using multiplex PCR assays for *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb*<sub>O111</sub>, and *rfb*<sub>O157</sub>. *J Clin Microbiol* 36 (2): 598-602.
10. Rangel JM, Sparling PH, Crow C, Griffin PM, Swerdlow DL (2006). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7, United States, 1982-2002. *Clin Infect Dis* 43:1587-95.
11. Sandkvist M (2001). TZpe II secretion and pathogenesis. *Inf Immun* 69 (6): 3523-35.
12. Strockbine NA, Wells JG, Bopp CA, Barret TJ (1998). Overview of detection and subtyping methods. V: *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin – producing *E. coli* strains. 1<sup>st</sup> ed. Kaper J.B., OBrien A.D. (eds.). Washington: ASM Press: 331-56.
13. Tauxe RV (2002). Emerging foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 78: 31-41.
14. Unkmeir A, Schmidt H (2000). Structural analysis of phage-borne *stx* genes and their flanking sequences in shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1 strains. *Inf Immun* 68 (9): 4856-64.
15. Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO scientific working group meeting (1998). Geneve: World Health Organization. <http://www.who.int/emc-documents/zoonoses/whocsraph988c.html> <11.7.2002>