

Jolanta Kutkowska^{1*}, Małgorzata Michalska-Szymaszek², Renata Matuszewska³,
Elżbieta Chmiel¹, Teresa Urbanik-Sypniewska¹

¹Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, UMCS

²Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Rzeszowie, Oddział Laboratoryjny w Tarnobrzegu

³Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Zakład Higieny Środowiska

Wpłynęło we wrześniu 2013 r.

1. Wstęp. 2. Występowanie w środowisku i źródła zakażenia bakteriami EHEC *E. coli* O157. 3. Patogeneza. 3.1. Objawy kliniczne zakażenia *E. coli* EHEC. 4. Czynniki wirulencji kodowane na plazmidach. 5. Antygen O; struktura, biosynteza, znaczenie w chorobotwórczości i jako markera w diagnostyce. 6. Antygeny H serotypu O157. 7. Identyfikacja *E. coli* O157. 8. Epidemie EHEC *E. coli* przenoszące się drogą wodną. 9. Zapobieganie. 10. Podsumowanie

Cell-surface antigens and virulence factors of *Escherichia coli* O157

Abstract: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains are commensal bacteria in cattle with high potential for transmission to humans. The serotype *E. coli* O157:H7 is the main cause of hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome. *E. coli* O157 synthesizes an O-antigen containing a repeating tetrasaccharide with the structure (4-N-acetyl-perosamine →3-fucose →3-glucose →3-N-acetyl-galactosmine). The presence of a common epitope consisting of 2-substituted N-acyl-perosamine is responsible for the serological cross-reactions with *Yersinia enterocolitica* O9 or *Vibrio cholerae* O1. The sequence homology indicates that the O157:H7 *rfbE* gene encoding perosamine synthetase may have originated in a species other than *E. coli*. The peculiarity of O157 repeat unit biosynthesis is a new pathway performed by epimerase Gnu that catalyses the reversible epimerization of N-acetyl-glucosamine-P-P-undecaprenol to N-acetyl-galactosmine-P-P-undecaprenol. The potential of the bacterial epimerase as a new target for antimicrobial agents is discussed. O157 and H7 antigens seem to be accessory virulence factors implicated in the pathogenesis of human diseases. The O157 antigen is important in the animal and plant host immune response and plays a role in the adherence of this organism to epithelial cells. One of the sources of epidemic outbreaks is water from the municipal water supply and other reservoirs. Survival of O157 bacteria in water environments has been recorded. The comparative analysis of nucleotide sequences within the *rfb* O antigen gene cluster and of other genes in the genome among STEC strains will elucidate the genetic basis of the evolution and virulence of these enteric pathogens.

1. Introduction. 2. Environmental occurrence and sources of EHEC *E. coli* O157 infections. 3. Pathogenesis. 3.1. Clinical symptoms of *E. coli* EHEC infection. 4. Plasmid-encoded virulence factors. 5. The O-antigen; the structure, biosynthesis and the role in pathogenesis and as a diagnostic marker. 6. H antigens of the O157 serotype. 7. *E. coli* O157 identification. 8. Waterborne EHEC outbreaks. 9. Prevention. 10. Summary

Słowa kluczowe: antygen O, czynniki wirulencji, *E. coli* O157:H7, perozamina

Key words: O antigen, virulence factors, *E. coli* O157:H7, perosamine

1. Wstęp

Escherichia coli O157 należy do patotypu EHEC (Enterohemorrhagic *E. coli*) enterokrwtocycznych *E. coli*, które mogą powodować biegunki. Infekcje często mają charakter bezobjawowy, co sprzyja rozprzestrzenianiu patogenów [95].

Grupa szczepów EHEC określana terminem STEC (Shiga Toxin-producing *E. coli*, Shigatoksyniczne *E. coli*) obejmuje szczepy wytwarzające toksyny Shiga tzw. werotoksyny, białka działające cytotosycznie na komórki linii Vero nerek małpy zielonej. Najlepiej poznano szczepy STEC należące do grupy serologicznej O157. Na podstawie charakterystyki antygenów somatycznych O, rzęskowych H i otoczkowych K zidentyfikowano dotychczas ~400 serotypów, w tym ok. 100 związanych z infekcjami ludzi i ponad 200 serotypów

(~70 serogrup) innych niż O157 tzw. nie-O157 STEC (non-O157 STEC) [18, 59].

Główną siłą napędową ewolucji szczepów EHEC jest horyzontalny przepływ genów, którego wkład w dywersyfikację genomu jest nieporównanie większy niż zmienność genomu. Różne pochodzenie szczepów należących do tego samego patotypu nadal nie jest wyjaśnione na poziomie molekularnym. Szczepy EHEC są znakomitym przykładem ewolucji równoległej, przebiegającej różnymi drogami i prowadzącej do wytworzenia złożonych systemów wirulencji, takich jak system sekrecji 3 typu T3SS (Type 3 Secretion System) [66]. Najważniejszymi czynnikami wirulencji w szczepach EHEC są: toksyny Shiga (Stx1 i Stx2), wyspa patogenności LEE (Locus of Enterocyte Effacement – złuszczenie komórek nabłonka jelitowego) i duży plazmid wirulencji. Wyspa LEE, która występuje także

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin; tel. (81) 537 59 05; fax: (81) 537 59 59; e-mail: jolanta.kutkowska@poczta.umcs.lublin.pl

w szczepach patotypu EPEC (Enteropathogenic *E. coli*, enteropatogenne *E. coli*) i *Citrobacter rodentium*, koduje zespół białek systemu T3SS i kilkanaście innych związanych z tym systemem.

Wielkość genomu szczepu referencyjnego O157 STEC; Sakai (RIMD 0509952) przewyższa o 1,5 Mbp wielkość genomu szczepu laboratoryjnego *E. coli* K-12. Znakomita większość genów związanych z patogennością szczepów EHEC jest zlokalizowana w tej „dodatkowej” części genomu. Składają się na nią trzy elementy: (i) 18 profagów lambdoidalnych (PPs; Sp-1 do Sp-18), (ii) 6 elementów integracyjnych (IEs; SpLE1 do SpLE6), definiowanych jako elementy genetyczne zawierające spokrewnione integrazy ale nie posiadające genów fagowych ani elementów transferu koniugacyjnego oraz (iii) 2 plazmidy. Większość genów związanych z wirulencją jest zlokalizowana na SpLE4, odpowiedniku locus LEE oraz w genomach profagów (PPs), które kodują toksyny Stx1 i Stx2 oraz białka efektorowe systemu T3SS (tzw. efekторы non-LEE). Inne nie-O157 serotypy EHEC mają bardzo podobny potencjał chorobotwórczy, ponieważ część genów wirulencji szczepów nie-O157 i O157 jest wspólna. Porównanie całych genomów szczepów EHEC O157 i nie-O157 (np. O26, O111, O103) potwierdza, że niezależne nabywanie mobilnych elementów (PPs, IEs i plazmidów) było przyczyną różnych dróg ewolucji szczepów EHEC. Szczególny przebieg miało wytworzenie systemu T3SS, który u EHEC powstał z genów nabywanych wraz z trzema typami elementów mobilnych: IE jako odpowiednikiem LEE, kodującym zasadniczą część systemu T3SS, SpLE3, IE-podobnym elementem oraz fagami lambdoidalnymi [59].

Bakterie EHEC (STEC) są egzogennym składnikiem flory jelitowej człowieka [83]. Obecność *E. coli* O157 w odchodach zwierząt (bydło, owce, kozy) mimo krótkiego okresu nosicielstwa (do 30 dni) stanowi ryzyko dla zdrowia ludzi ze względu na możliwość zakażenia żywności i wody oraz długi okres pozostawania tych bakterii w środowisku [27].

W tym artykule zwrócono szczególną uwagę na heterogenność antygenów somatycznych O i rzęskowych H jako markerów determinujących właściwości chorobotwórcze bakterii STEC oraz znaczenie wody jako źródła infekcji *E. coli* O157.

2. Występowanie w środowisku i źródła zakażenia bakteriami EHEC *E. coli* O157

Głównym rezerwuarem, biorąc pod uwagę możliwość zakażenia jest zdrowe bydło, w którego przewodzie pokarmowym te bakterie występują najliczniej w odcinku rekto-analnym. Największą i udokumentowaną rolę w nosicielstwie *E. coli* O157 odgrywają przeżuwacze [7, 20], rezerwuarem shigatoksycznych

pałeczek *E. coli* mogą być także konie, psy oraz jelenie, żyrafy, i ptaki [24, 49].

Bakterie *E. coli* O157, które wraz z zanieczyszczoną wodą lub kompostem dostają się do gruntu przeżywiają w zależności od typu gleby i stopnia jej nawodnienia do 47 dni, a w ryzosferze ponad 200 dni [28, 69]. Bakterie *E. coli* O157:H7 wyizolowane z mleka przeżywały bardzo długo w wodzie pobranej ze strefy przybrzeżnej; 73 do 100 dni w niskiej temperaturze (6°C) i 30–60 dni w temperaturze 24°C. Wraz z deszczami bakterie są splukiwane do jezior, rzek i kąpielisk, gdzie wchodzą w skład flory allochtonicznej [22].

Badania działania światła słonecznego na przeżywalność w warstwach powierzchniowych stawów bakterii wskaźnikowych; enterokoki i komensalne *E. coli* w porównaniu do *E. coli* O157:H7 wykazały, że bakterie tego serotypu przeżywiają dłużej niż bakterie wskaźnikowe, szczególnie w wyższej temperaturze i dużym stężeniu związków organicznych [35]. W wodzie bieżącej do picia chlorowanej standardowo podchlorynem sodu (NaOCl) bakterie *E. coli* O157:H7 nie przeżywiają, ale w takiej samej wodzie pozbawionej chloru *E. coli* O157 przeżywały po tygodniu inkubacji w 15°C. Niewłaściwe chlorowanie wody było przyczyną jednej z największych epidemii w Walkerton, Kanada [32]. Szczególnie niebezpieczeństwo stwarza niska temperatura sprzyjająca przejściu bakterii w stan „niehodowalności” VBNC (viable but non-culturable) [18].

W innym doświadczeniu, zastosowanie cytometrii przepływowej dowiodło, że szczep *E. coli* O157 (nie produkujący toksyn Stx) nie tylko był zdolny do namnażania w podłożach ubogich w organiczne źródła węgla, ale wykazywał większą konkurencyjność w stosunku do oligotroficznej mikroflory autochtonicznej wyizolowanej z wody do picia (bieżącej i butelkowanej) [92].

Najliczniejsze przypadki infekcji wywołanych u ludzi pałeczkami *E. coli* O157 dotyczą zachorowań żołądkowo-jelitowych spowodowanych spożyciem żywności – najczęściej nieodpowiednio przetworzonego termicznie mięsa wołowego, niepasteryzowanego mleka i jego przetworów, warzyw i owoców. Ze względu na wysoką tolerancję *E. coli* O157:H7 na niskie pH oraz wysuszenie, bakterie te stanowią zagrożenie w żywności uważanej dotąd za bezpieczną, np. suszonej lub liofilizowanej [47]. Uprawy nawożone niewystarczająco długo składowanymi nawozami naturalnymi są zagrożeniem dla zdrowia ludzi. Stwierdzono, że w oborniku bakterie *E. coli* O157 mogą przeżywać kilkanaście miesięcy [60].

3. Patogeneza

Chorobotwórczość pałeczek *E. coli* O157 jest determinowana przez produkty genów w większości zgrupowanych na wyspach patogenności PAI (pathogenicity

island, wyspy patogenności) zlokalizowanych w chromosomie i na plazmidach [36].

Do najważniejszych czynników patogenności należy toksyna Shiga (Stx, Shiga toxin lub SLT, Shiga-like toxin) kodowana przez allele genu *stx*. W przeciwieństwie do genów *stx* *Shigella dysenteriae*, które zajmują w genomie stabilną pozycję w pobliżu sekwencji pozostałych po genomach fagowych, (w piśmiennictwie anglojęzycznym – remnant prophages), warianty genów *stx* szczepów STEC są zlokalizowane w obrębie kompletnych genomów fagów lambdoidalnych w większości należących do rodziny *Podoviridae*. Artykuł przeglądowy wyjaśniający mechanizmy genetyczne ekspresji genów toksyn Shiga i fagów lambdoidalnych w enterokrwtoczących szczepach *E. coli* opublikowali Ł o ś i W ę g r z y n (2011) [44]. Zidentyfikowano dwa główne typy takich profagów: kodujące *stx1* np. fag H-19B, podobne do genów *stx* *S. dysenteriae* typu 1 (99% podobieństwa na poziomie DNA) oraz kodujące *stx2*, o mniejszym podobieństwie (tylko 56% podobieństwa na poziomie sekwencji aminokwasowej) np. fag 933W. W szczepach STEC *E. coli* O157:H7 wyizolowanych z przypadków zakażeń o ciężkim przebiegu stwierdzano nadekspresję genu *stx2* [68]. Ta bardziej toksyczna forma toksyny jest wytwarzana w wielu wariantach Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, i Stx2g w przeciwieństwie do homogenego białka Stx1 [97, 100].

Ekspresja *stx1* i *stx2* jest sprzężona z transkrypcją genów późnych cyklu litycznego i może być indukowana niskim poziomem związków żelaza. Ma to istotne konsekwencje, gdyż zdolność produkcji toksyn Stx może być przekazywana między szczepami w następstwie indukcji cyklu litycznego w odpowiedzi typu SOS uruchomianej po działaniu niektórych chemioterapeutyków (trimetoprim, 4-chinolony). Stosowanie tych leków w terapii biegunek u ludzi i zwierząt może powodować rozprzestrzenianie się szczepów STEC w środowisku [74, 82].

Toksyny Stx należą do toksyn typu AB₅ [56]. Aktywność N-glikozydazowa podjednostki A toksyny powoduje usuwanie adenin z 28S rRNA podjednostki 60S rybosomu i zatrzymanie biosyntezy białka w wyniku interferencji z czynnikiem elongacyjnym EEF1 w komórkach wytwarzających receptory glikosfingolipidowe GbO3Cer/CD77 oraz w mniejszym stopniu GbO4Cer np. w komórkach śródbłonna [6, 26]. Ponadto, pod wpływem działania toksyny Shiga na szlaki transdukcji sygnału może być indukowana apoptoza [46] lub hamowana infekcja limfocytów B przez wirusa BLV (Bovine Leukemia Virus, wirus białaczki bydłowej), co może znaleźć zastosowanie w terapiach antynowotworowych [25]. Najnowsze metody detekcji toksyn Shiga opisano w publikacji Clotilde i wsp. [19].

Ważnym czynnikiem patogenności szczepów EHEC w tym STEC są adhezyny odpowiedzialne za przyle-

ganie bakterii i powstawanie zmian typu A-E (Attaching-Effacing, przyleganie i ścieranie) oraz systemy ich transportu kodowane w locus LEE. W różnych serotypach locus LEE jest wbudowany w loci kodujące różne tRNA np. *selC* tRNA selenocysteiny w O157:H7 i O127:H7, *pheU* tRNA fenyloalaniny w serotypach O111 i O126 lub *pheV* inny gen tRNA fenyloalaniny. W skład systemu sekrecji T3SS wchodzi: białka chaperonowe, białka translokatorowe (składniki kompleksu translokacyjnego); EspA, EspD, EspB i białka efektorowe wprowadzane do cytoplazmy komórki gospodarza; Map, EspF, EspG, EspH, EspZ oraz receptor intyminy Tir (Translocated Intimin Receptor) [53]. Czynniki regulatorowe (Ler, GrlR i GrlA) determinujące ekspresję genów locus LEE są kodowane przez geny położone w tym locus oraz położone w innych loci (PchA, PchB, PchC i LrhA) [3, 36]. Większość tych białek działa wielotorowo, jak np. LrhA, które wpływa pozytywnie na ekspresję genów hemolizyny *ehxCABD*, a negatywnie na ekspresję genów rzęskowych H [31].

Najważniejszym białkiem adhezyjnym transportowanym do błony zewnętrznej przez system T3SS jest intymina (EaeA) [10]. Zaobserwowano zależność typu kolonizacji nabłonka jelitowego od odmiany intyminy (α , β , γ lub δ), różniącej się sekwencją aminokwasową C-końca. W szczepach serogrupy O157 dominuje intymina typu γ . Określenie wariantów genów wirulencji oraz identyfikacja serotypu może ułatwić przewidywanie stopnia chorobotwórczości szczepów [65, 83]. Fenotyp A-E charakteryzuje niezwykle stabilna adhezja bakterii do śluzówki jelitowej, zanikanie mikrokosmków rąbka szczoteczki oraz rearanżacja cytoskieletu enterocytów przybierających kształt przypominający piedestał (pedestal). Wyizolowano szczepy STEC pozbawione locus LEE i dające obraz zmian nabłonka jelitowego, jak szczepy O157 LEE dodatnie. Okazało się, że w szczepach LEE ujemnych (posiadających plazmid wirulencji pO113) za zmiany histopatologiczne odpowiada nowa toksyna (toksyna subAB), której działanie zabójcze na komórki polega na degradacji chaperonu (BiP/GRP78) reticulum endoplazmatycznego. Analiza alleli plazmidowych i genów chromosomalnych potwierdziła niezależną (równoległą) ewolucję szczepów STEC [55].

Czynnikiem wyróżniającym szczepy EHEC jest białko efektorowe TccP (Tir cytoskeleton coupling protein), które po translokacji do cytoplazmy komórki docelowej wiąże się i aktywuje białko zespołu Wiskott-Aldrich'a (N-WASP), a to z kolei aktywuje kompleks Arp 2/3 (actin-related protein 2/3 complex) inicjujący lokalną polimeryzację włókien aktyny. W przeciwieństwie do szczepów EPEC, w których reszty tyrozyny receptora Tir ulegają fosforylacji, białko Tir szczepów EHEC O157 nie jest fosforylowane i wiąże się do białka TccP w miejsce Nck, białka adaptorowego komórki

gospodarza. Gen *tccP* znajduje się w genomie faga lizogennego CP-933U/Sp14 (TccP). Typowe izolaty EHEC O157:H7 mają pseudogen *tccP* kodowany przez profaga CP-933 M/Sp4 (*tccP2*). W odróżnieniu od nich atypowe (*gus*-ujemne, fermentujące sorbitol, SF) szczepy EHEC O157 mają obydwa warianty genu, *tccP* i *tccP2* [58].

3.1. Objawy kliniczne zakażenia *E. coli* EHEC

Objawy kliniczne zakażeń wywoływanych przez EHEC, w tym *E. coli* O157, zależą od cech osobniczych oraz czynników bakteryjnych i manifestują się w postaci łagodnych do krwotocznych biegunek przechodzących w krwotoczne zapalenie okrężnicy (HC, Hemorrhagic Colitis), bądź groźnych dla życia zespołów: hemolityczno-mocznicowego (HUS, Hemolytic-Uremic Syndrome) i małopłytkowej plamicy zakrzepowej (TTP, thrombotic thrombocytopenic purpura). Bezpośrednią przyczyną ogólnonarządowych zmian chorobowych HC i HUS są toksyny Shiga [38]. Zespół HUS jest definiowany jako niewydolność nerek i towarzyszące jej objawy; trombocytopenia i anemia hemolityczna. Do krwawych biegunek, przy których istnieje ryzyko komplikacji pozajelitowych dochodzi w około 70–90% przypadków. Decydującą rolę w rozwoju objawów odgrywa powinowactwo toksyn Stx do komórek nabłonków, które zależy nie tylko od wariantu toksyny, ale w znacznym stopniu od oddziaływania receptorów GbO3Cer (globotriaosyl ceramidu) i GbO4Cer (globotetraosyl ceramidu) z innymi składnikami błon, głównie fosfatydylocholiną i cholesterolem [26].

Szczepy *E. coli* O157 powodujące biegunki charakteryzują się niską dawką zakaźną, która wynosi około 10 do 100 komórek bakterii. W leczeniu infekcji nie należy stosować antybiotyków, które interferują z biosyntezą ściany komórkowej bakterii i powoduje ich lizę, gdyż może to uwalniać dodatkowe ilości toksyn Stx i zwiększać ryzyko wystąpienia zespołu HUS. Podjęto próbę zastosowania w terapii HUS preparatu eculizumab (Soliris®, Alexion, Inc.) zawierającego przeciwciała monoklonalne, wiążące się z białkiem dopełniacza C5, inicjującego proces niszczenia erytrocytów [81].

4. Czynniki wirulencji kodowane na plazmidach

Dwie grupy szczepów *E. coli* O157 izolowane od chorych z zespołem HUS; niefermentujące sorbitolu (nSF) O157:H7 i fermentujące sorbitol (SF) O157 H⁻ mają różne plazmidy wirulencji. Szczepy należące do pierwszej grupy posiadają plazmid pO157 o masie ~60,5 MDa (92 kpz), do drugiej mają plazmid pSFO157 o masie ~79,7 MDa (121 kpz) [14, 88, 93]. Plazmid wirulencji pO157 jest wykrywany w niemal wszystkich izolatach klinicznych STEC *eae*-dodatnich i zawiera

ponad 100 ORF (Open Reading Frames, otwartych ramek odczytu) w tym: *katP* – katalaza/peroksydaza KatP (niezależna od katalaz KatG i KatE kodowanych chromosomalnie); *toxB* – białko podobne do toksyny B *Clostridium difficile* o właściwościach adhezyny lub wzmacniającej ekspresję adhezyn; *etpC-etpO* – system sekrecyjny 2 typu; *stcE* – inhibitor fosfolipazy C1; *espP* – kodujący zewnątrzkomórkową proteazę serynową oraz operon *ehxCABD* kontrolujący syntezę enterohemolizyny Ehx, homologicznej do α -hemolizyny (Hly) szczepów *E. coli* innych niż STEC i powodującej typ β hemolizy. Hemolizyna Ehx poza zdolnością do tworzenia por w błonie erytrocytów wzmacnia działanie toksyn Shiga a jej synteza jest kontrolowana przez aktywatory Ler, GlrA i LrhA zlokalizowane w locus LEE [29, 34, 41].

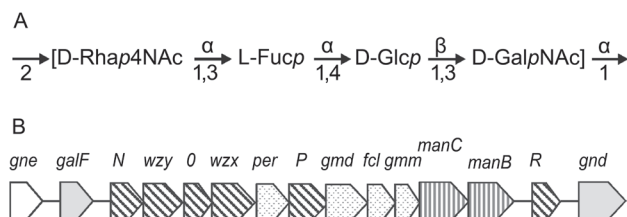
Funkcjonowanie genów jednego z operonów plazmidu pO157; *ecf* (*E. coli* Attaching and Effacing [*eae*] Gene-positive Conserved Fragments) jest regulowane temperaturą i wpływa na ekspresję genów białek związanych ze składnikami powierzchniowymi bakterii. Geny *ecf1* i *ecf2* kodują odpowiednio; deacetylazę polisacharydu i białko WabB – transferazę α -1,7-N-acetyloglukozaminy w LPS. Białko Ecf4 produkt homologu chromosomalnego genu *lpxM* koduje dodatkową kopię mirystoylo transferazy przyłączającej kwas mirystynowy (14:0) do lipidu A. Analiza efektów mutacji w tym genie wskazuje, że produkt *ecf2* jest wymagany do przeżywania bakterii w skrajnie różnych środowiskach tj. przewodzie pokarmowym i w środowisku wodnym, co wiąże się z odpowiednią modyfikacją lipidu A oraz lipidów błonowych. Obniżenie temperatury do 24°C powodowało, że spadała ilość kwasów nasyconych (12:0, 14:0 i cyklopropanowego 17:0) a rosła ilość kwasu okta-decenenowego (18:1) w lipidach błonowych [98].

Różnica między plazmidami pO157 i pSFO157 polega na braku genów *katP*, *espP* i homologu genu *toxB* w plazmidzie pSFO157. Większość genów obecnych tylko w pSFO157 znajduje się na fragmencie plazmidu F zawierającym geny warunkujące transfer na drodze koniugacji oraz klaster genów *sfp* dla fimbrii Sfp [14].

Szczepy SF O157:H⁻ nie produkują hemolizyny mimo, że mają operon *hly*. Porównanie sekwencji nukleotydowych chromosomowych i obu plazmidów potwierdza, że szczepy SF O157:H⁻ i szczepy nSF O157:H7 wywodzą się od wspólnego przodka, w którym plazmid pSFO157 był prekursorem plazmidu pO157 [88].

5. Antygen O; struktura, biosynteza, znaczenie w chorobotwórczości i jako markera w diagnostyce

Antygeny O swoiste są składnikami lipopolisacharydów (LPS) i jednymi z ważniejszych markerów wykorzystywanych w diagnostyce szczepów STEC. Ich



Rys. 1. Sekwencja cukrów biologicznej powtarzającej się jednostki antygeny O157 *E. coli* A) i organizacja genów operonu biosyntezy antygeny O zlokalizowanego między genami metabolizmu podstawowego *galF* (pirofosforylaza UDP-glukozy) i *gnd* (dehydrogenaza 6-fosfoglukonianu) B) opracowane na podstawie [1, 63, 73, 91].

Objaśnienia; α -Rhap4NAc lub Per; 4-acetamido-4,6-dideoksy- α -D-mannopiranoza, (perozamina), α -L-Fucp; α -L-fukoza (6-deoksy- α -L-galaktopiranoza), β -D-Glcp; β -D-glukopiranoza; α -D-GalpNAc; α -D-N-acetylogalaktopiranozamina.

Produkty genów (*wbpN*, *wbpO*, i *wbpP*), oznaczonych literami: N, O, P pełnią funkcję glikozylotransferaz, funkcje pozostałych genów opisano w tekście.

identyfikację wykonuje się na podstawie reakcji serologicznych lub analizy genów biosyntezy [48]. Są one składową LPS eksponowaną na powierzchni komórki bakteryjnej i rozpoznawaną przez czynniki układu immunologicznego oraz bakteriofagi. Pierwszorzędowną funkcją antygenów O jest ochrona komórki bakteryjnej przed składnikami dopełniacza i innymi białkami obronnymi, jak BPI (bactericidal permeability-increasing protein) lub peptydy obronne. Swoistość antygeny O jest związana z adaptacją do środowiska a jego zmienność z mechanizmami unikania odpowiedzi ze strony układu immunologicznego [64]. Określanie serotypów jest stosowane w ustalaniu źródła epidemii i chorobotwórczości szczepu. Polisacharyd O swoisty *E. coli* O157:H7 jest zbudowany z powtarzających się tetrasacharydowych jednostek. Sekwencja cukrów antygeny O157 i organizacja genów jego biosyntezy została pokazana na rysunku 1.

Występowanie wspólnych determinantów antygenowych powoduje, że serologiczne metody detekcji antygeny O157 np. odczyn lateksowy, mogą dawać reakcje pozytywne ze szczepami innymi niż *E. coli*. Identyczna struktura antygeny O, jak w LPS *E. coli* O157 (Rys. 1) występuje w rodzajach: *Salmonella*: *S. enterica* O30 (grupa N) i *Citrobacter*: *C. freundii* F90, *C. sedlakii*. Elementy strukturalne wspólne z antygenem O157 mają łańcuchy O w LPS *E. coli* O111, *S. enterica* O35 oraz *E. coli* O55 i *S. enterica* O50, a także LPS *E. hermannii*, *Brucella abortus* i *Vibrio cholerae* O1 Inaba [2, 72, 91].

Przykładem występowania reakcji krzyżowych mimo różnic w budowie antygenów O jest reakcja przeciwciał monoklonalnych anty O157 a LPS ze szczepu NRCC 6052 *C. freundii*, którego trójcukrowa podjednostka jest zbudowana z dwu reszt D-ramnozy i jednej cząsteczki D-glukozy. W tym przypadku wystąpienie reakcji mimo braku 2-podstawionej perozaminy wchodzącej w skład wspólnego epitopu można wytłu-

maczyć mimikrą antygenową [54, 91]. Epitop zawierający N-acylowaną (formylo pochodną) perozaminę występuje ponadto w LPS *Pseudomonas maltophilia* 555, *Yersinia enterocolitica* O9 i *Brucella melitensis* [94]. Przewodzone są badania w celu zastosowania szczepów niepatogennych syntetyzujących antygeny identyczne lub zbliżone do struktury O157 jako żywe szczepionki [5].

Należy zaznaczyć, że część reakcji krzyżowych może być wynikiem obecności w surowicach przeciwciał skierowanych przeciw rdzeniowej części LPS, ponieważ we wszystkich szczepach *E. coli* O157:H7 i O157H⁻ występuje chemotyp R3 rdzenia LPS, obecny także w niektórych szczepach *S. flexneri* i *S. dysenteriae* [16].

Operon (*wb**) *rfb* kontrolujący biosyntezę antygeny O *E. coli* O157 ma wielkość 14 kbp i zawiera 12 genów transkrybowanych w tym samym kierunku, kontrolujących syntezę prekursorów cukrów w tym: guanozynydifosforanu-perozaminy (GDP-D-Per) i guanozynydifosforanu-fukozy (GDP-L-Fuc), odpowiednio geny *manB*, *manC*, *gmd*, *per* i *fcl* (Rys. 1). W operonach biosyntezy antygenów O *E. coli* i *S. enterica* zawierających gen *gnd* zawsze występuje gen *gmm* (*wbdQ*), którego produkt mannozylohydrolaza GDP-mannozy katalizuje hydrolizę mannozy z GDP-mannozy lub glukozy z GDP-glukozy i reguluje poziom GDP-cukrów. Kolejne geny kodują specyficzne glikozylotransferazy przenoszące reszty cukrowe na undekaprenylowy nośnik lipidowy Und-P (Undecaprenyl Phosphate) oraz flipazę (*wxz*), enzym przenoszący podjednostki oligocukrowe związane wiązaniem pirofosforanowym z Und-P-P na zewnętrzną stronę błony cytoplazmatycznej i polimerazę (*wzy*) łączącą powtarzające się podjednostki [73]. Na końcu 3' operonu *rfb* znajduje się gen *wbdR* oznaczony R na rys. 1, kodujący produkt o aktywności N-acetylotransferazy konwertującej GDP-D-Per do GDP-D-Per4NAc. Jego lokalizacja w pobliżu miejsc sprzyjających rekombinacji (powtórzenia Hinc) i polimorficzność genu *gnd* flankującego operon *rfb* są potwierdzeniem, że geny tego operonu zostały nabyte w drodze poziomego transferu. Zaproponowano hipotezę, powstania enterokrwotocznych szczepów *E. coli* O157, według której jedną z istotnych zmian był transfer genów antygeny O157 do genomu *E. coli* O55. Na podstawie organizacji operonu *rfb* i sekwencji nukleotydowej genów flankujących ten operon w szczepach *E. coli* O55 i O157 stwierdzono, że jedno z miejsc rekombinacji jest zlokalizowane w genie *galF* a drugie między genami *his* i *amn* oddalonym o ok. 35 kbp [94].

Delecja w którymkolwiek z operonów biosyntezy LPS daje fenotyp szorstki LPS, pozbawiony antygeny O [70, 72].

Analiza sekwencji genów kodujących nukleotydowe prekursorów cukrów podjednostek O antygeny wskazuje, że pochodzą od wspólnego przodka lecz trudno jest wyjaśnić znacznie większe zróżnicowanie wśród genów

kodujących glikozyklotransferazy. Przepuszczalnie obie grupy genów wywodzą się z dwu klastrow występujących u wspólnego przodka charakteryzującego się niską zawartością G+C [72, 86].

Porównawcza analiza sekwencji par odpowiednich genów operonu *rfb* i genów rdzeniowych (house-keeping) w *S. enterica* i *E. coli* dowodzi, że ewolucja tych pierwszych, następowała znacznie szybciej m.in. na skutek selektywnego działania środowiska [42, 72]. Obecnie obserwowane zróżnicowanie antygenów O jest wynikiem rekombinacji między blisko spokrewnionymi szczepami, np. *E. coli* O157:H7 i *E. coli* O55:H7 [86]. Porównanie sekwencji klastrow kodujących syntezę antygenów O *E. coli* O118 i *E. coli* O151 wykazało, że te serotypy różnią się tylko dwoma (na 13 283) nukleotydami, co wskazuje na ich klonalność. Prowadzone są dalsze badania w celu wyjaśnienia podstaw molekularnych zróżnicowania strukturalnego i immunologicznego antygenów somatycznych szczepów EHEC [43].

Zróżnicowanie genomów enterokrwotocznych *E. coli* określone przy pomocy techniki ALP (ALP, Amplicon Length Polymorphism) szczepów izolowanych ze środowiska i referencyjnych ATCC 35218 (serotyp O niekreślony), ATCC 25922 (serotyp O6), ATCC 35150 (serotyp O niekreślony) potwierdza, że rearanżacje genomu są spowodowane poziomym transferem genów bądź utratą plazmidu/(ów) [67].

Wyjściowym substratem w biosyntezie perozaminy jest fruktozo-6-fosforanu. Ostatni etap syntezy przebiega z udziałem aminotransferazy (syntetazy) RfbE (Per), przekształcającej GDP-4-keto-6-deoksymannozę do GDP-D-perozaminy [2]. Wysoki procent podobieństwa (54% na poziomie sekwencji aminokwasowej) genu *rfbE*_{O157:H7} (syntetaza D-perozaminy) i *rfbE* *Vibrio cholerae* wskazuje, że gen *rfbE* w szczepach *E. coli* O157:H7 został nabyty od gatunków innych niż *E. coli* [8]. Produkt genu *rfbE* ulega ekspresji w szczepach *E. coli* O157, które nie wytwarzają toksyn i mają antygeny rzęskowe inne niż H7. Natomiast szczepy *E. coli* O157:H7, wytwarzające toksyny są blisko spokrewnione z serotypem *E. coli* O55:H7. Dlatego w wątpliwych przypadkach wyniki testów serologicznych należy potwierdzać identyfikacją produktu genu *rfbE*_{O157:H7} [72].

Innym markerem genetycznym locus *rfb*, który poza genem *rfbE*_{O157:H7} może być wykorzystany w diagnostyce szczepów O157 jest gen epimerazy *gne*. Składanie podjednostek antygeny O *E. coli* O157 nie rozpoczyna się od reakcji katalizowanej przez inicjującą transferazę WecA, która przenosi GalNAc-P z UDP-GalNAc (difosfourydynogalaktozamina) z utworzeniem GalNAc-P-P-Und (nośnik galaktozaminilo-difosfo-undekaprenyloxy, C55) lecz odbywa się w innym szlaku. Szlak ten rozpoczyna się od przeprowadzanej przez białko WecA syntezy Und-P-P-GlcNAc, który zostaje przekształcony do GalNAc-P-P-Und przez swoistą epimerazę, kodo-

waną przez gen *gne1* (Z3206). Homologia na poziomie sekwencji aminokwasowej epimeraz różniących się funkcją dowodzi, że enzym z *E. coli* O157 tworzy klastery z genami *gne* tych bakterii, w których cukrem inicjującym biologicznej powtarzającej się jednostki jest GalNAc, np. większość serotypów *Y. pseudotuberculosis*. Dla genu o funkcji Und-P-P-GlcNAc C4 epimerazy zaproponowano nazwę *gnu*. Rozważane jest wykorzystanie genu *gnu* lub jego produktu jako potencjalne miejsce docelowe dla leków blokujących biosyntezę antygenów O szczepów, takich jak serogrupa O157, w których GalNAc jest cukrem redukującym podjednostki [21, 71].

Analiza filogenetyczna szczepów *E. coli* O157 pochodzących z różnych środowisk wskazuje, że cechy determinujące chorobotwórczość są związane z określonym serotypem [8] oraz ze środowiskiem. W przypadku serotypu O157, który powszechnie występuje w przewodzie pokarmowym bydła, owiec, jeleni, żyraf i innych zwierząt chorobotwórczość dotyczy prawie wyłącznie ludzi. Inne przykłady to szczepy należące do serotypów O2 i O78, chorobotwórcze dla ptactwa ale nie dla ludzi, których markerami wirulencji są plazmidowe i chromosomalne allele genu *iss* (Increased Serum Survival) oraz gen *tsh* (Temperature-sensitive Hemagglutinin) kodujący temperaturowrażliwą hemaglutyninę, a także szczepy należące do serogrupy O147, izolowane wyłącznie od świń, w których geny wirulencji (*fedA*) kodują fimbrie F18 [24, 75].

Badania czynników wirulencji ujawniły, że szczep dzikiego typu O157 wykazywał znacznie słabszą adhezję do komórek HeLa i komórek nabłonka jelitowego w porównaniu do mutantu w genie *rfbE*_{EcO157:H7} [8]. W przypadku mutantu *rfbE* *E. coli* O157:H7 obniżona była natomiast przeżywalność w jelitach myszy i bydła [79].

Uzyskano dowody wskazujące na związek metabolizmu D-sorbitolu z biosyntezą LPS w *E. coli* K-12 i nie jest wykluczone, że różnica zdolności fermentacji tego alkoholu cukrowego ma związek z ekspresją antygenów O157 LPS [51].

W ostatnim czasie w badaniach efektów biologicznych wykorzystywane są bezkręgowce ze względu na problemy etyczne i koszt badań na zwierzętach gnotobiotycznych. Mimo braku mechanizmów odporności adaptacyjnej mają one analogiczny do kręgowców system odporności wrodzonej, w którym podstawową rolę pełnią białka odpornościowe [40]. Owady produkują białka podobne do cytokin, które aktywują ekspresję białek i peptydów działających przeciw bakteriom, grzybom, pasożytom i wirusom [87].

Udział antygeny O157 w wirulencji został w sposób jednoznaczny udokumentowany na modelu nicienia, *Caenorhabditis elegans*. Mutanty delecyjne ($\Delta perA$), niezdolne do syntezy perozaminy a tym samym antygeny O nie kolonizowały jelit i nie zabijały *C. elegans*.

W podobny sposób zachowywały się szczepy pozabione plazmidu wirulencji pO157 [99]. Na modelu larw jedwabnika morwowego oraz na myszach wykazano, że aktywność letalna mutantów delecyjnych w genie *rfbE* lub w *waal*, (kodującym ligazę antygeny O, przyłączającą łańcuch O do rdzenia połączonego z lipidem A) jest znacznie zredukowana. Ponadto, szczepy szorstkie okazały się bardziej wrażliwe na morycynę – defenzynę hemolimfy jedwabnika oraz na normalną surowicę kregowca (świni). Rekombinanty *in trans* miały fenotyp jak szczep wyjściowy. Model jedwabnika morwowego ma tę przewagę nad modelem nicienia, że może być hodowany i zakażany przez EHEC O157:H7 w temperaturze 37°C, właściwej dla ssaków [52].

Mutant *E. coli* O157 w genach *galETKM* kodujących syntezę N-acetylo-D-galaktozaminy, niezdolny do syntezy galaktozy i niemal całkowicie pozbawiony łańcucha O swoistego, nie kolonizował nabłonka jelitowego królika i był wrażliwy na białko BPI [30].

Znaczący spadek przeżywalności w układzie moczowym myszy wykazywały mutanty w genie *wecA* [4] i genie *waal* uropatogennych szczepów *E. coli* [9].

Bezpośredni udział LPS szczepów EHEC wyizolowanych od dzieci z zespołem HUS udowodniono badając aktywację płytek *via* kompleks TLR4 i CD62. Sądzi się, że ta droga aktywacji odpowiada za niszczenie płytek w tym zespole [84].

Składniki powierzchniowe chorobotwórczych wariantów *E. coli* pełnią ważne funkcje także w interakcji z roślinami. Badano korelacje występujące między strukturami rozpoznawanymi jako markery bakterii patogennych PAMPs (Pathogen-associated Molecular Patterns) takimi jak, curli, rzęski, LPS i egzopolisacharydy a systemową (SAR; Systemic Acquired Resistance) i indukowaną (ISR; Induced Systemic Resistance) odpornością roślin w związku z preferencyjną kolonizacją tkanek owoców i warzyw przez chorobotwórcze patotypy *E. coli*, w szczególności serotyp O157. Ze strony rośliny w odpowiedzi uczestniczą receptory PRRs (Pattern Recognition Receptors), których rozpoznanie inicjuje pierwszorzędową reakcję obronną, jak odkładanie kalozy, produkcja reaktywnych form tlenu i białek obronnych powodujących hamowanie kolonizacji tkanki roślinnej. Wobec patogenów zdolnych do sekrecji białek efektorowych, rośliny wytworzyły drugorzędową odpowiedź obronną (SDR, Secondary Defense Responses), włącznie z aktywacją białek odpornościowych (RPs; Resistance Proteins) hamujących efekторы i włączających odpowiedź obronną z udziałem białek RP.

Mutanty delecyjne w genach rzęsek, curli oraz w genie *waal* (kodującym białko hyperadherencji) oraz mutanty syntetyzujące skróconą formę antygeny O LPS kolonizowały rośliny bardziej efektywnie, a znacznie słabiej przeżywały na roślinach, co było związane z ich obniżoną zdolnością indukcji ekspresji genów białek

PR. Otrzymane wyniki potwierdzają pierwszorzędą rolę struktur rozpoznawanych przez receptory organizmu gospodarza w zdolności bakterii do przeżywania i kolonizacji tkanek zwierzęcych i roślinnych [76].

6. Antygeny H serotypu O157

Innym markerem wykorzystywanym w identyfikacji szczepów O157 jest polimorfizm genu *fliC* kodującego białko strukturalne rzęsek. Do tego celu stosowana jest technika RFLP-PCR (Restriction Fragments Length Polymorphism, polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych) i sekwencjonowanie produktów zwłaszcza, że dość często antygeny H nie ulegają ekspresji w warunkach *in vitro*. Zróżnicowanie genu dotyczy części wewnętrznej między konserwatywnymi sekwencjami C i N końców flageliny. Badano sekwencje genu *fliC_{H7}* w szczepach O157:H7 i O157:H⁻. Szczepy izolowane z kału bydła, świń i owiec chorych na biegunkę reprezentowały tzw. atypowy serotyp antygeny H. DNA części szczepów nie dawała produktu ze starterami *fliC* a ich rzęski były kodowane prawdopodobnie przez inne geny flagelarne np. *fliA*, *fliK* i *fliM*. Pozostała część szczepów miała inne, dotąd nieopisane geny rzęskowe [23].

W surowicy dorosłych osobników bydła przed szczepieniem bakteriami *E. coli* O157:H7 zidentyfikowano przeciwciała przeciw: LPS O157, intyminie, Tir, białkom EspA i EspB (*E. coli*-secreted proteins). Po szczepieniu rósł poziom tylko dwu: anty-EspB i anty-LPS [12]. Zaobserwowano względnie szybki spadek poziomu przeciwciał anty-*E. coli* O157; 10–11 tygodni dla przeciwciał IgG i 4 tygodnie dla przeciwciał klasy IgA, co ma znaczenie w czułości detekcji, podatności na powtórne zakażenie oraz produkcji szczepionek [45].

Ekspresja genów regulatorowych rzęsek (geny *fliDC*) i położonych poniżej genów związanych z wirulencją; adhezja i system T3SS jest kontrolowana przez białko regulatorowe Lrp (Leucine-responsive Regulatory Protein) w odpowiedzi na podwyższony poziom krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (głównie kwasu masłowego) występujących w jelitach [89].

7. Identyfikacja *E. coli* O157

Enterokrwotoczne *E. coli* O157 wykazują typowe cechy fizjologiczne i biochemiczne komensalnych *E. coli* z trzema wyjątkami, wykorzystywanymi w ich identyfikacji. Większość szczepów serotypu O157:H7 w przeciwieństwie do komensalnych szczepów *E. coli* nie rośnie wcale lub rośnie bardzo słabo w temperaturze 44,5°C, przy czym optymalna temperatura wzrostu *E. coli* O157 wynosi 36 ± 2°C a minimalna 8–10°C. Dwie pozostałe cechy odróżniające *E. coli* O157 od szczepów

komensalnych to brak wytwarzania β -glukuronidazy kodowanej przez gen *uidA* (*gusA*) oraz brak zdolności fermentacji D-sorbitolu (D-glucitolu) w ciągu doby. Bakterie te tolerują niskie pH; mogą przeżyć do 2 miesięcy w temperaturze 4°C w żywności o pH 4,5 [17].

Identyfikacja szczepów *E. coli* O157:H7 metodą hodowlaną polega na wysiewaniu badanego materiału na podłoże z D-sorbitolem – SMAC (sorbitol Mac-Conkey). Selektywność i czułość tej metody można zwiększyć stosując czynniki selekcyjne: cefeksim i telluryt potasu (agar SMAC-CT), preinkubacja w ciągu 2 godz. w pH 2,0 w bulionie EEB (Enterohemorrhagic *E. coli* Enrichment Broth) czy separacja immunomagnetyczna z pomocą kulek paramagnetycznych pokrytych przeciwciałami monoklonalnymi anty-*E. coli* O157. Metodą, która daje powtarzalne wyniki, kompatybilne z uzyskanymi sposobem wzbogaconej selekcji i dające się stosować w badaniach przesiewowych jest PCR z sondą fluorogenną najczęściej dla genu *eaeA* [57]. W celu potwierdzenia identyfikacji izolatów niefermentujących sorbitolu przeprowadza się reakcję Real Time PCR ze starterami dla genów *eae*_{O157}, *rfbE*_{O157} i *fliC* [78].

Obok elektroforezy pulsacyjnej (PFGE, Pulsed Field Gel Electrophoresis) jedną z metod różnicowania blisko spokrewnionych szczepów jest niedawno opracowana technika analizy polimorfizmu wielkości ampliconu (ALP), oparta na zastosowaniu precyzyjnie wybranych starterów w oparciu o tzw. wskaźnik genomowy ("genetic index") ustalany dla kompletnie zsekwencjonowanych szczepów. W przypadku *E. coli* O157 do ustalenia indeksu wybrano genomy dwu referencyjnych szczepów O157: O157:H7 EDL933 i O157:H7B Sakai oraz odnośny szczep laboratoryjny *E. coli* K-12 MG1655 [67].

Jednym z problemów różnicowania szczepów *E. coli* O157:H7 jest ich bliskie pokrewieństwo ze szczepami *E. coli* O157:NM, (NM, Non-motile) nie wykazującymi ruchu, fermentującymi sorbitol i wytwarzającymi β -glukuronidazę. Są one izolowane prawie wyłącznie od dzieci (ok. 20% przypadków zespołu HUS) i nie są wykrywane na podłożu (SMAC). Markerem wykorzy-

stywanym do ich identyfikacji jest klaster genów *sfp*, kodujący fimbrie Sfp, obecne wyłącznie w szczepach *E. coli* O157 fermentujących sorbitol (SF) [96]. Szczepy fermentujące sorbitol O157:NM są szczególnym zagrożeniem ze względu na wysoką częstość nabywania genu *stx2* w wyniku lizogenizacji fagami (np. ϕ 297) ulegającymi integracji w genie *yecE* („hot spot”) [50].

Szczepy O157:NM są bliżej spokrewnione z O157:H7 aniżeli szczepy O157 wykazujące ruch i wytwarzające antygeny flagelarne inne niż H7. Dodatkowymi cechami szczepów *E. coli* O157 z antygenami rzęskowymi innymi niż H7 jest polimorfizm dotyczący ponad 20 enzymów, a także brak toksyn Stx1 i Stx2 oraz intymny.

8. Epidemie EHEC *E. coli* przenoszące się drogą wodną

W ostatnich latach przypadki zakażeń EHEC często mają charakter epidemii. Centrum Kontroli Chorób i Prewencji (CDC) podaje liczbę 75 000 przypadków rocznie w Europie. Najczęstszym źródłem zakażeń jest żywność; w USA stanowią one 66% przypadków. Około 12% to infekcje związane ze spożyciem wody pitnej [18] lub jako efekt przypadkowego połknięcia wody w trakcie kąpieli w jeziorach lub basenach [13].

Dane literaturowe potwierdzają rosnącą liczbę przypadków zachorowań, wywoływanych przez *E. coli* O157, przenoszących się drogą wodną (Tab. I). Źródłem zakażenia jednej z najwcześniejszych odnotowanych epidemii (na przełomie 1989/1990 roku) w USA (Missouri) była niedezynfekowana woda przeznaczona do spożycia [85]. Kolejne epidemie, miały miejsce w USA (Wyoming) źródłem zakażenia była woda do picia z ujęć powierzchniowych [61]. W roku 1999 w Nowym Jorku źródłem zakażenia była woda do picia z ujęć podziemnych [11] oraz podczas jednej z największych epidemii w roku 2000 w Kanadzie (Walkerton) kiedy zachorowało aż 2300 osób [32]. Pierwszą epidemię, której źródłem była woda z kąpielisk odnotowano w USA (Oregon) w roku 1991 [39].

Tabela I
Epidemie *E. coli* O157:H7 przenoszące się drogą wodną

Miejsce i rok	Liczba zachorowań	Źródło	Piśmiennictwo
Cabool, Missouri, USA, 1989/1990	243	woda do picia	[85]
Portland, Oregon, USA, 1991	21	jezioro	[39]
Szkocja, Wielka Brytania, 1993	6	basen	[13]
Alavus, Finlandia, 1997	14	jezioro	[62]
Alpine, Wyoming, USA, 1998	157	woda do picia	[61]
Nowy Jork, USA, 1999	775	woda do picia	[11]
Walkerton, Ontario, Kanada, 2000	2300	woda do picia	[32]
Kornwalia, Wielka Brytania, 2004	7	plaża	[33]

W Europie infekcje spowodowane enterokrwtoczną *E. coli* O157 są rzadziej rejestrowane. W corocznym raporcie Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) stwierdza się, że liczba przypadków zakażeń Shigatoksynicznymi szczepami *E. coli* jest na czwartym miejscu po zakażeniu *Campylobacter*, *Salmonella* i *Yersinia*. W 24 państwach Unii Europejskiej (z wyjątkiem Czech, Grecji oraz Portugalii) oraz w krajach spoza UE: Norwegii, Szwajcarii, Islandii – wykazano ponad 3500 przypadków zakażeń ludzi szczepami EHEC/STEC, najwięcej w Wielkiej Brytanii, Niemczech, Holandii i Irlandii. Szeroko opisywaną w mediach epidemię odnotowano w 2011 w Niemczech, w której czynnikiem etiologicznym był szczep *E. coli* O104:H4 wykazujący cechy *E. coli* EHEC i EAEC (Enteroaggregative *E. coli*). Zachorowało wówczas ponad 4 tys. osób. Źródłem epidemii były nasiona kozieradki [90].

9. Zapobieganie

Ważnym działaniem prewencyjnym jest eliminacja chorobotwórczych bakterii *E. coli* O157 z przewodu pokarmowego zwierząt nosicieli. Dodatek do pasz np. siarczanu neomycyny lub nizyny w połączeniu z sorbiniem sodu lub z polimleczanem powoduje zmniejszenie wydzielania kałowego *E. coli* O157:H7 [15, 37].

Udowodniono, że podanie bakterii probiotycznych do hodowli komórkowych nabłonka jelitowego linii HEp-2 i T84 hamuje adhezję oraz zmiany cytoszkieletu indukowane przez szczepy *E. coli* O157:H7 i O127:H6 [80].

Zastosowanie jako szczepionki mutantów *E. coli* O157 w genach *hha* (białko regulujące ekspresję hemolizyny) i *sepB* (ATP-aza kontrolująca ekspresję LLE-kodowanych białek) powodowało wyraźną redukcję kolonizacji jelit bydła i wydzielania z odchodami szczepu dzikiego typu [77].

Podstawową rolę w zapobieganiu epidemiom odgrywa nadzór sanitarno-epidemiologiczny wody do picia i celów rekreacyjnych. Ze względu na istotne zagrożenie zdrowia i życia ludzi w przypadku zakażeń STEC ustanowiono dyrektywą 2003/99/WE Parlamentu Europejskiego nakazującą wprowadzenie działań monitoringowych Shigatoksynicznych szczepów *E. coli*. Ustawa o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi (Dz.U. 2008 nr 234) określa zgłaszanie każdego przypadku wykrycia Shigatoksynicznych pałeczek *E. coli* O157 w materiale klinicznym. Jakość wody w kąpieliskach i przeznaczonej do spożycia jest w Polsce systematycznie kontrolowana zgodnie z harmonogramem pobierania próbek (dla kąpielisk zgodnie z zapisami ustawy – Prawo wodne Dz.U. z 2005 r. Nr 239).

10. Podsumowanie

Liczba publikacji na temat chorobotwórczości i epidemii wywoływanych przez enterokrwtoczne, Shigatoksyniczne szczepy *E. coli* (STEC) z dominującym serotypem O157:H7 świadczy o rosnącym znaczeniu tych patogenów. W Polsce notuje się stosunkowo małą liczbę epidemii spowodowanych przez *E. coli* O157. Dane eksperymentalne potwierdzają, że bakterie *E. coli* O157 mają zdolność przeżywania w środowiskach ubogich w organiczne źródła węgla i w niskiej temperaturze nawet do kilku miesięcy. Infekcje spowodowane przez serotyp O157:H7 mogą być przyczyną zachorowań związanych z układem pokarmowym (perforacja i krwawienia z okrężnicy) i chorób pozajelitowych, jak zespół hemolityczno-mocznicy – HUS.

Większość czynników determinujących wirulencję szczepów STEC jest kodowana przez geny zlokalizowane w wyspach patogenności na chromosomie (locus LEE) i na plazmidach wirulencji (plazmid pO157). Najważniejszym czynnikiem odpowiedzialnym za zmiany histopatologiczne w jelitach i układzie moczowym jest toksyna Shiga i jej warianty kodowane przez geny fagowe. Pozostałe czynniki są kodowane przez locus LEE a ich ekspresja, podobnie jak genów toksyn może być regulowana przez czynniki zewnętrzne. Udokumentowano regulację ekspresji genów operonu *ecf* na plazmidzie pO157 przez temperaturę, która wpływa na pojawianie się określonych białek związanych z innymi składnikami powierzchniowymi bakterii, co ma związek z adaptacją do różnych środowisk.

Określenie serotypu *E. coli* jest jednym z najważniejszych kryteriów w badaniach epidemiologicznych. Analiza genetyczna operonu *rfb* biosyntezy antygeny somatycznego i immunochemiczna LPS szczepów serogrup O157 i nie-O157 ujawniła różnicowanie na poziomie nukleotydowym i strukturalnym. Sekwencjonowanie genu *rfbE* kodującego syntetazę perozaminy, cukru wchodzącego w skład determinanty antygenowej wskazuje na nabycie tego genu w drodze poziomego transferu z bakterii innych niż *E. coli*. Podobieństwo sekwencji aminokwasowych epimerazy Gnu obecnej w szczepach zawierających jako cukier redukujący N-acetylogalaktozaminę, jak LPS *E. coli* O157 wskazuje na różne drogi ewolucji szlaków biosyntezy antygenów O szczepów STEC. Wyjaśnienie związku między czynnikiem wirulencji a ekspresją określonego antygeny somatycznego wymaga dalszych badań. Porównanie struktury antygenów O i korelacji z ekspresją antygenów H w połączeniu z analizą genetyczną przybliży wyjaśnienie mechanizmów dopasowania struktur bakterii do gospodarza i środowiska. Wyniki analizy sekwencji genów rdzeniowych i nabytych w drodze poziomego transferu w szczepach patotypu EHEC wskazują na wielość dróg ewolucji tych patogenów.

Piśmiennictwo

- Albermann C., Beuttler H.: Identification of the GDP-N-acetyl-D-perosamine producing enzymes from *Escherichia coli* O157:H7. *FEBS Letters*, **582**, 479–484 (2008)
- Albermann C., Piepersberg W.: Expression and identification of the RfE protein from *Vibrio cholerae* O1 and its use for the enzymatic synthesis of GDP-D-perosamine. *Glycobiol.* **11**, 655–661 (2001)
- Barba J., Bustamante V.H., Flores-Valdez M.A., Deng W., Finlay B.B., Puente J.L.: A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. *J. Bacteriol.* **187**, 7918–7930 (2005)
- Bengoechea J.A., Pinta E., Salminen T., Oertelt C., Holst O., Radziejewska-Lebrecht J., Piotrowska-Seget Z., Venho R., Skurnik M.: Functional characterization of Gne (UDP-N-acetylglucosamine-4-epimerase), Wzz (chain length determinant), and Wzy (O-antigen polymerase) of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *J. Bacteriol.* **184**, 4277–4287 (2002)
- Bettelheim K.A., Evangelidis H., Pearce J.L., Sowers E., Strockbine N.A.: Isolation of a *Citrobacter freundii* strain which carries the *Escherichia coli* O157 antigen. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 760–761 (1993)
- Betz J., Bielaszewska M., Thies A., Humpf H-U., Dreisewerd K., Karch H., Kim K.S., Friedrich A.W., Müthing J.: Shiga toxin glycosphingolipid receptors in microvascular and macrovascular endothelial cells: differential association with membrane lipid raft microdomains. *J. Lipid Res.* **52**, 618–634 (2011)
- Bielaszewska M., Schmidt H., Liesegang A., Prager R, Rabsch W, Tschäpe H, Cizek A, Janda J, Bláhová 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.* **38**, 3470–3473 (2000)
- Bilge S.S., Vary, J.C. Jr., Dowell S.F., Tarr P.I.: Role of the *Escherichia coli* O157:H7 O side chain in adherence and analysis of an *rfb* locus. *Infect. Immun.* **64**, 4795–4801 (1996)
- Billips B.K., Schaeffer A.J., Klumpp D.J.: Molecular basis of uropathogenic *Escherichia coli* evasion of the innate immune response in the bladder. *Infect. Immun.* **76**, 3891–3900 (2008)
- Blanco M., Schumacher S., Tasara T., Zweifel C., Blanco J.E., Dahbi G., Blanco J., Stephan R.: Serotypes, intimin variants and other virulence factors of *eae* positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene. *BMC Microbiol.* **5**, 23 doi:10.1186/1471-2180-5-23 (2005)
- Bopp D.J., Limberger R.J. i wsp. : Detection, isolation and molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* associated with a large waterborne outbreak. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 174–180 (2003)
- Bretschneider G., Berberov E.M., and Moxley R.A.: Isotype-specific antibody responses against *Escherichia coli* O157:H7 locus of enterocyte effacement proteins in adult beef cattle following experimental infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **118**, 229–238 (2007)
- Brewster D.H., Brown M.I., Robertson D., Houghton G.L., Bimson J., Sharp J.C.M.: An outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with a children's paddling pool. *Epidemiol. Infect.* **112**, 441–447 (1994).
- Brunder W., Karch H., Schmidt H.: Complete sequence of the large virulence plasmid pSFO157 of the sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H⁻ strain 3072/96. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**, 467–474 (2006)
- Callaway T.R., Andersen R.C., Edrington T.S., Genovese J.K., Bischoff M.K., Poole L.T., Jung S.Y., Harvey B.R., Nisbet J.D.: What are we doing about *Escherichia coli* O157:H7 in cattle? *J. Anim. Sci.* **82** (E. suppl.), E 93–99 (2004)
- Carol G. Currie, Ian R. Poxton: The lipopolysaccharide core type of *Escherichia coli* O157:H7 and other non-O157 verotoxin-producing *E. coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **24**, 57–62 (1999)
- Carter M.Q., Brandl M.T., Louie J.W., Kyle J.L., Carychao D.K., Cooley M.B., Parker C.T., Bates A.H., Mandrell R.E.: Distinct acid resistance and survival fitness displayed by curli variants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 3685–3695 (2011)
- Chauret C.: Survival and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods, beverages, soil and water. *Virulence*, **2**, 593–601 (2011)
- Clotilde L.M., Bernard C. 4th, Salvador A., Lin A., Lauzon C.R, Muldoon M., Xu Y., Lindpaintner K., Carter J.M: A 7-plex microbead-based immunoassay for serotyping Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Meth.* **92**, 226–230 (2013)
- Cornick N.A., Booher S.L., Casey T.A., Moon H.W.: Persistent colonization of sheep by *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* pathotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4926–4934 (2000)
- Cunneen M.M., Liu B., Wang L., Reeves P.R.: Biosynthesis of UDP-GlcNAc, UndPP-GlcNAc and UDP-GlcNAcA involves three easily distinguished 4-epimerase enzymes, Gne, Gnu and GnaB. *PLoS ONE*, **8**, e67646. doi:10.1371/journal.pone.0067646 (2013)
- Czajkowska D., Witkowska-Gwiazdowska A., Sikorska I., Boszczyk-Maleszak H., M. Horoch M.: Survival of *Escherichia coli* serotype O157:H7 in water and in bottom-shore sediments. *Polish J. Environ. Studies*, **14**, 423–430 (2005)
- de Moura C., Tiba M.R., da Silva M.J., Leite D.S.: Identification of new flagellin-encoding *fliC* genes in *Escherichia coli* isolated from domestic animals using RFLP-PCR and sequencing methods. *Pesq. Vet. Bras.* **33**, 417–422 (2013)
- DebRoy C., Roberts E.: Screening petting zoo animals for the presence of potentially pathogenic *Escherichia coli*. *J. Vet. Diagn. Invest.* **18**, 597–600 (2006)
- Fere W. A., Hovde C.J.: Antiviral activity of Shiga toxin 1: suppression of bovine leukemia virus-related spontaneous lymphocyte proliferation. *Infect. Immun.* **68**, 4462–4469 (2000)
- Gallegos K.M., Conrady D.G., Karve S.S., Gunasekera T.S., Herr A.B., Weiss A.A.: Shiga toxin binding to glycolipids and glycans. *PLoS ONE*, **7**, 1–10 (2012)
- Garcia A., Fox J.G., Besler T.E.: Zoonotic enterohemorrhagic *Escherichia coli*: a one health perspective. *ILAR J.* **51**, 221–232 (2010)
- Gurtler J.B., Douds D.D. Jr., Dirks B.P., Quinlan J.J., Nicholson A.M., Phillips J.G., Niemira B.A.: *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 survival in soil and translocation into leeks (*Allium porrum*) as influenced by an arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*). *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 1813–1820 (2013)
- Herrera-Luna C., Klein D., Lapan G., Revilla-Fernandez S., Haschek B., Sommerfeld-Stur I., Moest K., Baumgartner W.: Characterization of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy calves in Austria shedding various enteropathogenic agents. *Veterinarni Medicina*, **54**, 1–11 (2009)
- Ho T.D., Waldor M.K.: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 *gal* mutants are sensitive to bacteriophage P1 and defective in intestinal colonization. *Infect. Immun.* **75**, 1661–1666 (2007)
- Honda N, Iyoda S, Yamamoto S, Terajima J, Watanabe H.: LrhA positively controls the expression of the locus of enterocyte effacement genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* by differential regulation of their master regulators PchA and PchB. *Mol. Microbiol.* **74**, 1398–1411 (2009)
- Hrudey S.E., Payment P, Huck P.M., Gillham R.W., Hrudey E.J.: A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water Sci. Technol.* **47**, 7–14 (2003)

33. Ihekweazu C., Barlow M., Roberts S., Christensen H., Guttridge B., Lewis D., Paynter S.: Outbreak of *E. coli* O157 infection in the south west of the UK: risks from streams crossing seaside beaches. *Eurosurveillance*, **11**, 128–130 (2006)
34. Iyoda S., Honda N., Saitoh T., Shimuta K., Terajima J., Watanabe H., Makoto Ohnishi M.: Coordinate control of the locus of enterocyte effacement and enterohemolysin genes by multiple common virulence regulators in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **79**, 4628–4637 (2011)
35. Jenkins M.B., Fisher D.S., Endale D.M., Adams P.: Comparative die – off of *Escherichia coli* O157:H7 and fecal indicator bacteria in pond water. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 1853–1858 (2011)
36. Jerse AE, Gicquelais K.G., Kaper J.B.: Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **59**, 3869–3875, (1991)
37. Jin T., Zhang H., Boud G.: Incorporation of preservatives in polylactic acid films for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and extending microbiological shelf life of strawberry puree. *J. Food Protect.* **73**, 812–818 . (2010)
38. Karmali M.A.: Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Mol. Biotechnol.* **26**, 117–122 (2004)
39. Keene W.E., McAnulty J.M., Hoesly F.C., Hedberg K., Oxman G.L., Barrett T.J., Pfaller M.A., Fleming D.W.: A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N. Eng. J. Med.* **331**, 579–584 (1994)
40. Lehrer R.I., Ganz T.: Defensins of vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 96–102 (2002)
41. Lim J.Y., Sheng H., Seo S.H., Park Y.H., Hovde C.J.: Characterization of an *Escherichia coli* O157:H7 plasmid O157 deletion mutant and its survival and persistence in cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 2037–2047 (2007)
42. Liu B., Perepelov A.V., Li D., Senchenkova S.N. Han Y., Shashkov A.S., Feng L., Knirel Y.A., Wang L.: Structure of the O-antigen of *Salmonella* O66 and the genetic basis for similarity and differences between the closely related O-antigens of *Escherichia coli* O166 and *Salmonella* O66. *Microbiol.* **156**, 1642–1649 (2010)
43. Liu Y., Fratamico P., DeRoy C., Bumbaugh A.C. Allen J.W.: DNA sequencing and identification of serogroup-specific genes in the *Escherichia coli* O118 O antigen gene cluster and demonstration of antigenic diversity but only minor variation in DNA sequence of the O antigen clusters of *E. coli* O118 and O151. *Foodborne Pathog. Dis.* **5**, 449–457 (2008)
44. Łoś J.M., Węgrzyn G.: Enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* EHEC i bakteriofagi kodujące toksyny Shiga. *Post. Mikrobiol.* **50**, 175–190 (2011)
45. Ludwig K., Bitzan M., Bobrowski C., Müller-Wiefel D.E.: *Escherichia coli* O157 fails to induce a long-lasting lipopolysaccharide-specific, measurable humoral immune response in children with hemolytic-uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* **186**, 566–569 (2002)
46. Mangeney M., Lingwood C.A., Taga S., Caillou B., Tursz T., Wiels J.: Apoptosis induced in Burkitt's lymphoma cells via Gb3/CD77, a glycolipid antigen. *Cancer Res.* **53**, 5314–5319 (1993)
47. Marcela A., Prado V.: Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food. *Exp. Rev. Mol. Diagn.* **3**, 105–115 (2003)
48. Maurer J.J., Schmidt D., Petrosko P., Sanchez S., Bolton L., Lee M.D.: Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2954–2960 (1999)
49. McGee P., Bolton D.J., Sheridan J.J., Earley B., Kelly G., Leonard N.: Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in farm water: its role as a vector in the transmission of the organism within herds. *J. Appl. Microbiol.* **93**, 706 (2002)
50. Mellmann A., Lu S., Karch H., Xu J-G., Harmsen D., Schmidt M.A., Bielaszewska M.: Recycling of Shiga toxin 2 genes in sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 67–72 (2008)
51. Meredith T.C., Woodard R.W.: Identification of GutQ from *Escherichia coli* as a D-arabinose 5-phosphate isomerase. *J. Bacteriol.* **187**, 6936–6942 (2005)
52. Miyashita A., Iyoda S., Ishii K., Hamamoto H., Sekimizu K., Kaito C.: Lipopolysaccharide O-antigen of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for killing both insects and mammals. *FEMS Microbiol. Lett.* **333**, 59–68 (2012)
53. Munera D., Crepin V. F., Marches O., and Gad F. N-terminal type III secretion signal of enteropathogenic *Escherichia coli* translocator proteins. *J. Bacteriol.* **192**, 3534–3539 (2010)
54. Navarro A., Eslava C., de la Torre G.G., León L.A., Licona D., León L., Zarco L.A., Cravioto A.: Common epitopes in LPS of different *Enterobacteriaceae* are associated with an immune response against *Escherichia coli* O157 in bovine serum samples. *J. Med. Microbiol.* **56**, 1447–1454 (2007)
55. Newton H.J., Hartland E.L. i wsp.: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains negative for locus of enterocyte effacement. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 372–380 (2009)
56. O'Brien A.D., Tesh V.L., Donohue-Rolfé A., Jackson M.P., Olsnes S., Sandvig K., Lindberg A.A., Keusch G.T.: Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **180**, 65–94 (1992)
57. Oberst R.D., Hays M.P., Bohra L.K., Phebus R.K., Sargeant J.M.: Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle feces using a polymerase chain reaction-based fluorogenic 5' nuclease (TaqMan[®]) detection assay after secondary enrichment. *J. Vet. Diagn. Invest.* **15**, 543–552 (2003)
58. Ogura Y., Frankel G. i wsp.: TccP2 of O157:H7 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): challenging the dogma of EHEC-induced actin polymerization. *Infect. Immun.* **75**, 604–612 (2007)
59. Ogura Y., Hayashi T. i wsp.: Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 17939–17944 (2009)
60. Oliveira M., Vinas I., Usall J., Anguera M., Abadias M.: Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *Int. J. Food Microbiol.* **156**, 133–140 (2012)
61. 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.* **8**, 370–375 (2002)
62. Paunio M., Pebody R., Keskimäki M., Kokki M., Ruutu P., Oinonen S., Voutari V., Siitonen A., Lathi E., Leinikki P.: Swimming-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol. Infect.* **122**, 1–5 (1999)
63. Perry M.B., MacLean L., Griffith D.W.: Structure of the O-chain polysaccharide of the phenol-phase soluble lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O:157:H7. *Biochem. Cell Biol.* **64**, 21–28 (1986)
64. Pupo E., Lindner B., Brade H. Schromm A.B.: Intact rough- and smooth-form lipopolysaccharides from *Escherichia coli* separated by preparative gel electrophoresis exhibit differential biologic activity in human macrophages. *FEBS J.* **280**, 1095–1111 (2003)
65. Ramachandran V., Brett K., Hornitzky M.A., Downton M., Bettelheim K.A., Walker M.J., Djordjevic S.P.: Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5022–5032 (2003)
66. Reid S.D., Herbelin C.J., Bumbaugh A.C., Selander R.K., Whittam T.S.: Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*, **406**, 64–67 (2000)
67. Rice W.C.: Application of Amplicon Length Polymorphism to differentiate amongst closely related strains of bacteria. *Curr.*

- Res Technol. Edu Topics Appl Microbio Microbial Biotechnol.* A. Mendes-Villas Ed. 1509–1516 (2010)
68. Rooks D.J., Libberton B., Woodward M.J., Heather E., Allison H.A., McCarthy A.J.: Development and application of a method for the purification of free shigatoxic bacteriophage from environmental samples. *J. Microbiol. Meth.* **91**, 240–245 (2012)
 69. Rothrock M.J., Frantz J.M., Burnett S.: Effect of volumetric water content and clover (*Trifolium incarnatum*) on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in a soil matrix. *Curr. Microbiol.* **65**, 272–283 (2012)
 70. Rump L.V., Feng P.C.H., Fischer M., Monday S.R.: Genetic analysis for the lack of expression of the O157 antigen in an O rough:H7 *Escherichia coli* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 945–947 (2010)
 71. Rush J.S., Alaimo C., Robbiani R., Wacker M., Waechter C.J.: A novel epimerase that converts GlcNAc-P-P-undecaprenol to GalNAc-P-P-undecaprenol in *Escherichia coli* O157. *J. Biol. Chem.* **285**, 1671–1680 (2010)
 72. Samuel G., Hogbin J-P., Wang L., Reeves P.R.: Relationships of the *Escherichia coli* O157, O111, and O55 O-Antigen gene clusters with those of *Salmonella enterica* and *Citrobacter freundii*, which express identical O antigens. *J. Bacteriol.* **186**, 6536–6543 (2004)
 73. Samuel G., Reeves P.: Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydr. Res.* **338**, 2503–2519 (2003)
 74. Sato T., Shimizu T., Watarai M., Kobayashi M., Kano S., Hamabata T., Takeda Y., Yamasaki S.: Genome analysis of a novel Shiga toxin 1 (Stx1)-converting phage which is closely related to Stx2-converting phages but not to other Stx1-converting phages. *J. Bacteriol.* **185**, 3966–3971 (2003)
 75. Schierack P., Steinrück H., Kleta S., Vahjen. W.: Virulence factor gene profiles of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 6680–6686 (2006)
 76. Seo S., Matthews K.R.: Influence of the plant defense response to *Escherichia coli* O157:H7 cell surface structures on survival of that enteric pathogen on plant surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5882–5889 (2012)
 77. Sharma V.K., Dean-Nystrom E.A., Casey T.A.: Evaluation of *hha* and *hha sepB* mutant strains of *Escherichia coli* O157:H7 as bacterins for reducing *E. coli* O157:H7 shedding in cattle. *Vaccine*, **29**, 5078–5086 (2011)
 78. Sharma V.K.: Real-time reverse transcription-multiplex PCR for simultaneous and specific detection of *rfbE* and *eae* genes of *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Cell. Probes*, **20**, 298–306 (2006)
 79. Sheng H., Lim J.Y., Watkins M.K., Minnich S.A., Hovde C.J.: Characterization of an *Escherichia coli* O157:H7 O-antigen deletion mutant and effect of the deletion on bacterial persistence in the mouse intestine and colonization at the bovine terminal rectal mucosa. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 5015–5022 (2008)
 80. Sherman P.M., Johnson-Henry K.C., Yeung H.P., Ngo P.S.C., Goulet J., Tompkins T.A.: Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infect. Immun.* **73**, 5183–5188 (2005)
 81. Simon K., Janocha J.: Epidemia EHEC (*Escherichia coli* O104:H4) w Europie w 2011 roku – problemy kliniczne i terapeutyczne. *Przegl. Epidemiol.* **66**, 73–77 (2012)
 82. Smith D.L., Wareing B.M., Fogg P.C.M., Riley L.M., Spencer M., Cox M.J., Saunders J.R., McCarthy A.J., Allison H.E.: Multilocus characterization scheme for Shiga toxin-encoding bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 8032–8040 (2007)
 83. Sobieszkańska B.M., Gryko R.: Typy adhezji szczepów *Escherichia coli* izolowanych z przypadków biegunek. *Przegl. Epidemiol.* **55**, 287–297 (2001)
 84. Ståhl A., Svensson M., Mörgelin M., Svanborg C., Tarr P.I., Mooney J.C., Watkins S.L., Johnson R., Karpman D.: Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic *Escherichia coli* binds to platelets through TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome. *Blood*, **108**, 167–176 (2006)
 85. Swerdlow D.L., Wells J.G. i wsp.: A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann. Intern. Med.* **117**, 812–819 (1992)
 86. Tarr P.I., Schoening L.M., Yea Y-L., Ward T.R., Jelacic S., Whitam T.S.: Acquisition of the *rfb-gnd* cluster in evolution of *Escherichia coli* O55 and O157. *J. Bacteriol.* **182**, 6183–6191 (2000)
 87. Tauszig S., Jouanguy E., Hoffmann J.A., Imler J.L.: Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10520–10525 (2000)
 88. Timothy J. Johnson T.J., Nolan L.K.: Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 750–774 (2009)
 89. Tobe T., Nakanishi N., Sugimoto N.: Activation of motility by sensing short-chain fatty acids via two steps in a flagellar gene regulatory cascade in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **79**, 1016–1024 (2011)
 90. Truszczyński M., Pejsak Z.: Epidemia wywołana przez wero toksyczny serotyp O104:H4 *Escherichia coli* za pośrednictwem żywności pochodzenia roślinnego. *Życie Wet.* **86**, 680–682 (2011)
 91. Vinogradov E., Conlan J.W., Perry M.B.: Serological cross-reaction between the lipopolysaccharide O-polysaccharide antigens of *Escherichia coli* O157:H7 and strains of *Citrobacter freundii* and *Citrobacter sedlakii* FEMS *Microbiol. Letters*, **190**, 157–161 (1998)
 92. Vital M., Hammes F., Egli T.: Competition of *Escherichia coli* O157 with drinking water bacterial community at low nutrient concentrations. *Water Res.* **46**, 6279–6290 (2012)
 93. Wang G., Clark C.G., Frank G., Rodgers F.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.* **40**, 3613–3619 (2002)
 94. Wang L., Huskic S., Cisterne A., Rothemund D., Reeves P.R.: The O-antigen gene cluster of *Escherichia coli* O55:H7 and identification of a new UDP-GlcNAc C4 epimerase gene. *J. Bacteriol.* **184**, 2620–2625 (2002)
 95. Weiner M.: Shigatoksyczne enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* – nowe czy dobrze znane zagrożenie? *Życie Wet.* **86**, 507–514 (2011)
 96. Werber D., Bielaszewska M., Frank C., Stark K., Karch H.: Watch out for the even eviler cousin – sorbitol – fermenting *E. coli* O157. *The Lancet*, **377**, 298–299 (2011)
 97. Wiczorek K., Posse B., Osek J., Tatarczak M.: Identification of putative adhesin genes in shigatoxicogenic *Escherichia coli* isolated from different sources. *Vet. Microbiol.* **110**, 77–85 (2005)
 98. Yoon J.W., Lim J.Y., Park Y.H., Hovde C.J.: Involvement of the *Escherichia coli* O157:H7 (pO157) *ecf* operon and lipid A myristoyl transferase activity in bacterial survival in the bovine gastrointestinal tract and bacterial persistence in farm water troughs. *Infect. Immun.* **73**, 2367–2378 (2005)
 99. Youn M., Lee K-M., Kim S.H., Lim J., Yoon J.W., Park S.: *Escherichia coli* O157:H7 LPS O-side chains and pO157 are required for killing *Caenorhabditis elegans* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **436**, 388–393 (2013)
 100. Zhang W., Bielaszewska M., Kuczius T., Karch H.: Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx_{1c}*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1441–1446 (2002)