

Verotoksigeni sevi bakterije *Escherichia coli*, osamljeni v Sloveniji iz humanih vzorcev

Verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from human samples in Slovenia

Marija Trkov,¹ Alenka Andlovic,² Ingrid Berce,³ Alenka Štorman,⁴ Mateja Ravnik,⁵ Metka Paragi¹

¹ Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Trubarjeva ulica 2, SI-1000 Ljubljana

² Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Zaloška 4, SI-1104 Ljubljana

³ Zavod za zdravstveno varstvo Nova Gorica, Vipavska cesta 13, SI-5000 Nova Gorica

⁴ Zavod za zdravstveno varstvo Celje, Ipavčeva 18, SI-3000 Celje

⁵ Zavod za zdravstveno varstvo Kranj, Gosposvetska 12, SI-4000 Kranj

Korespondenca/ Correspondence:

dr. Marija Trkov, univ. dipl. inž. živil. tehnol., Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Trubarjeva ulica 2, 1000 Ljubljana
Tel.: 01 520 5706,
Fax: 01 520 5704
e-pošta: marija.trkov@ivz-rs.si

Ključne besede:

verotoksigena *Escherichia coli*, verocitotoksini, genotipizacija, epidemiologija

Abstract

Background: Shiga toxin-producing *E. coli* or Vero cytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) are characterised by the ability to produce either one or both cytotoxins referred to as Shiga toxin 1 (Stx1) and Shiga toxin 2 (Stx2). VTEC infection may result in life-threatening conditions such as haemolytic uremic syndrome (HUS) and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Due to different methods of monitoring and identification of these bacteria in recent years, the existing data on reported cases of VTEC infections probably do not reflect reality. Our study of VTEC strains isolated in different regions of Slovenia, showed serogroups, major virulence factors and specific epidemiological data that can serve as a basis for further laboratory and epidemiological surveillance of VTEC infections.

Methods: A total of 66 VTEC strains, isolated from stool samples of patients with diarrhoea from the year 1993 to 2009, were collected at NIPH (National Institute of Public Health). The data of patient's age and gender, onset of illness and clinical manifestation of disease were gathered. The serogroups of isolated strains were determined with antisera following manufacturer's instructions. The ability to produce verocytotoxins was tested using the reversed passive latex agglutination method. The presence of genes for intimin (*eae*), enterohaemolysin (*ehxA*) and verotoxins (*vtx1* and *vtx2*) were determined by polymerase chain reaction (PCR).

Results: Infection with VTEC was encountered throughout the year, but most people were ill in the summer and autumn months. More than half of patients (57.6 %) were younger than five years. Collected VTEC strains belonged to serogroups O17, O26, O91, O103, O111, O113, O126, O128, O145, O148 and O157 (the most frequent were O157 and O26). A high percentage of VTEC

strains showed the presence of intimin (86.4 %) and enterohaemolysin (86.4 %) genes. The gene for *vtx1* was found in 22.7 % of strains, the *vtx2* in 57.6 % of strains, while the presence of both genes was determined in 19.7 % of strains. The presence of the *vtx2* gene was determined in all strains associated with HUS and TTP, most of them possessed the *eae* and *ehxA* genes too. These patients were mostly older people and young children.

Conclusions: Most infections with VTEC occurred in the warmer months of the year, most patient were small children. The severity of VTEC infection is determined by several factors such as the *E. coli* serogroup, the type of Shiga toxin produced and presence of other virulence genes. The most common serogroups among the study strains were O157 and O26. VTEC O26 has been the most commonly isolated serogroup in recent years, nevertheless more and more different serological groups began to emerge. In all strains associated with HUS and TTP, the *vtx2* gene was determined. Further typing of verocytotoxin encoding genes will contribute to assess the risk for complications with VTEC infection. The study provides insights about the age of the patients, seasonal distribution of disease, serogroups and genotypes of the agent.

Izveček

Izhodišča: Za verotoksigeno seve bakterije *E. coli* (VTEC) je značilno, da izdelujejo verotoksine, pri okužbi pa lahko pride do zelo nevarnih zapletov, kot sta hemolitično-uremični sindrom (HUS) in trombotična trombocitopenična purpura (TTP). Za zbrane verotoksigeno seve, osamljene v različnih regijah, smo prikazali serološke skupine in najpomembnejše dejavnike virulence ter določene epidemiološke podatke. Rezultati raziskave so zato lahko podlaga za nadaljnje laboratorijsko in epidemiološko spremljanje okužb z verotoksigenimi sevi bakterije *E. coli*.

Key words:

verotoxigenic *Escherichia coli*, verocytotoxins, genotyping, epidemiology

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2012;
81: 32–43

Prispelo: 14. mar. 2012,
Sprejeto: 7. nov. 2011

Metode: V raziskavo smo vključili 66 sevov VTEC, ki smo jih zbrali na IVZ in so bili osamljeni iz vzorcev iztrebkov bolnikov z drisko v različnih slovenskih regijah med letoma 1993 in 2009. Zbrali smo podatke o času bolezni, bolnikovih starosti in spolu ter kliničnih znakih bolezni. Serološke skupine osamljenih sevov smo določili v skladu z navodili proizvajalcev antiserumov. Za seve, pri katerih predhodno ni bila določena sposobnost izdelovanja verotoksinov, smo verotoksine določili z reverzno pasivno aglutinacijo lateksa. Prisotnost genov za intimin (*eae*), enterohemolizin (*ehxA*) ter verotoksine (*vtx1* in *vtx2*) smo določili z metodo PCR.

Rezultati: Zaradi okužbe z verotoksigenimi sevi bakterije *E. coli* je največ ljudi zbolelo v poletnih in jesenskih mesecih. Več kot polovica bolnikov (57,6 %) je bila mlajša od petih let. V raziskavo vključene VTEC so pripadale serološkim skupinam O17, O26, O91, O103, O111, O113, O126, O128, O145, O148 in O157, najpogostejši pa sta bili O157 in O26. Pri visokem odstotku vero-

toksigenih sevov smo določili gen za intimin (86,4 %) in gen za enterohemolizin (86,4 %). Gen za *vtx1* je imelo 22,7 % sevov, gen za *vtx2* je imelo 57,6 % sevov, oba gena pa je imelo 19,7 % sevov. Pri vseh sevih, povezanih s HUS in TTP, smo določili gen za *vtx2*, pri večini pa tudi gena *eae* in *ehxA*. Ti bolniki so bili predvsem majhni otroci in starejše osebe.

Zaključki: Največ okužb z VTEC se je pojavilo v toplejših mesecih leta, največ okuženih pa je bilo v skupini majhnih otrok. Potek bolezni je odvisen tudi od lastnosti povzročitelja, in sicer od serološke skupne *E. coli*, skupine verotoksinov, ki jo sev izdeluje, in drugih dejavnikov virulence. Najpogostejši serološki skupini med preiskovanimi sevi sta bili O157 in O26, pojavljati pa se je začelo vedno več različnih seroloških skupin. Pri vseh sevih, povezanih s HUS in TTP, smo določili gen za *vtx2*. Raziskava omogoča vpogled v podatke o starosti bolnikov, času pojavljanja bolezni, seroloških skupinah in genotipih povzročiteljev.

Uvod

Escherichia coli je prevladujoča fakultatívno anaerobna bakterija v prebavilih ljudi in živali.¹ Večina sevov je za gostitelje nepatogenih, nekateri med njimi pa so med procesom evolucije s horizontalnim prenosom ali z mutacijami pridobili različne gene, ki so omogočili nastanek in kasneje povečevanje virulence. Ti sevi lahko povzročajo različne zunajčrevesne in črevesne okužbe.² Črevesne okužbe povzročajo verotoksigene, enteropatogene, enterotoksigene, enteroinvazivne, enteroagregativne in difuzno adherentne *E. coli*.^{3,4} Za verotoksigene *E. coli* ali *E. coli*, ki izdelujejo šigove toksine (VTEC/STEC), je značilna zmožnost izdelovanja verotoksinov (VT), ki delujejo citotoksično na celice Vero. Ker so sorodni citotoksinu bakterije *Shigella dysenteriae* tipa 1, zanje uporabljamo tudi okrajšavo Stx (*angl.* Shiga toxins).⁵ Delujejo tako, da zaustavijo sintezo proteinov v celicah gostitelja in so pglavitni, ne pa tudi edini dejavnik virulence VTEC.⁶ Verotoksine delimo v dve skupini, Stx1 (VT1) in Stx2 (VT2), bakterije pa izdelujejo eno ali pa obe skupini toksinov. Geni, ki nosijo zapise zanje, *vtx1* (*stx1*) in *vtx2* (*stx2*), so na lambdoidnih bakteriofagih. Nekateri VTEC, enterohemoragične *E. coli* (EHEC), imajo na

genomu otok patogenosti LEE (*angl.* locus for enterocyte effacement).⁵ Omenjeni locus nosi zapis za odstranitev mikrovilov na enterocitih. Izraz enterohemoragična *E. coli* se pogosto uporablja, vendar naj bi bil bolj vezan na tiste VTEC, pri katerih je prišlo pri okužbi do hemoragičnega kolitisa, ki se kaže s krvavo drisko. Otok patogenosti LEE je značilen tudi za enteropatogene seve bakterije *E. coli* (EPEC), odkrili pa so ga celo prvi vrsti *Citrobacter rodentium*. Ta otok nosi zapise za intimin, sekrecijski sistem III, protein Tir in različne sekrecijske proteine. Vsi sodelujejo pri pritrjevanju bakterijske celice na evkariontsko celico. Sekrecijski sistem III sodeluje pri translokaciji proteina Tir v evkariontsko celico, kjer služi kot receptor za intimin. Tako si patogena bakterija izdela svoj lastni receptor, ki ji omogoča pritrjevanje na celice gostitelja. Mnoge VTEC, ki imajo ali pa nimajo otoka patogenosti LEE, imajo tudi veliki plazmid, na katerem sta zapisa za dejavnika virulence enterohemolizin (*ehxA*) in serinsko proteazo (*espP*).^{4,7,8}

Kljub temu, da pripadajo verotoksigene *E. coli* zelo različnim serotipom,⁸ je bila *E. coli* O157:H7 v različnih državah najpogostejša povzročiteljica tako posameznih primerov bolezni kot tudi izbruhov.^{9–13} Glede

pogostosti pojavljanja preostalih serotipov in seroloških skupin VTEC obstajajo razlike med posameznimi državami, vendar najpogosteje poročajo o seroloških skupinah O26, O103, O111 in O145.^{14,15} Klinični znaki bolezni, ki jo povzročajo verotoksigena *E. coli*, so različni. Pri bolnikih se pojavi driska, ki je lahko tudi krvava. Nevarna zapleta, do katerih lahko pride pri okužbi z VTEC, sta trombotična trombocitopenična purpura (TTP) in hemolitični uremični sindrom (HUS). S HUS so povezane različne serološke skupine,¹⁴ najpogostejši serotip pa je *E. coli* O157:H7.¹⁶ Do hemolitično uremičnega sindroma pride pogosteje pri bolnikih okuženih s sevi, ki imajo gen za *vtx2*.^{12,16}

Do zelo velikega izbruha je prišlo v začetku maja 2011 v Nemčiji, ko je zbolelo nekaj tisoč ljudi, mnogo od njih s krvavo drisko in HUS, za posledicami okužbe pa je umrlo približno štirideset bolnikov. Izbruh je povzročil do sedaj redko osamljeni serotip *E. coli* O104:H4.¹⁷ Ugotovili so, da je imel sev neobičajno in redko kombinacijo lastnosti, ki so po eni strani značilne za verotoksigena, po drugi pa za enteroagregativne *E. coli*. Sev je izdeloval verotoksin Stx2 podtipa *vtx2a*, pri njem pa niso našli nekaterih drugih genov, ki so značilni za VTEC. Tako sev ni izdeloval verotoksinov Stx1, ni imel gena za enterohemolizin, prav tako tudi ne gena za intimin, kar kaže na odsotnost otoka patogenosti LEE na njegovem genomu. Pri sevu pa so našli številne gene, značilne za enteroagregativne seve bakterije *E. coli*, med njimi tudi gen *aggR*, ki je povezan s pritrjevanjem in tvorbo biofilmov pri tej skupini *E. coli*, ki tudi povzročajo črevesne okužbe.^{18,19} Te ugotovitve pojasnjujejo visoko stopnjo patogenosti seva, ki je povzročil izbruh v Nemčiji, nekoliko kasneje pa še manjšega v Franciji.¹⁷

Pomemben vir verotoksigenih sevov bakterije *E. coli* so prežvekovalci, zlasti govedo, ponekod tudi ovce. Z iztrebki lahko pridejo v različna živila, tudi na zelenjavo in v vodo.^{13,15} Verotoksigeni sevi bakterije *E. coli* se lahko prenašajo z okuženim mesom, zlasti mleto govedino, mesnimi izdelki, nepasteriziranim mlekom, nepasteriziranim sadnim sokom, različno zelenjavo, vodo,

lahko pa tudi ob stiku z okuženimi ljudmi in živalmi.⁹

Z našo prvo tovrstno raziskavo v Sloveniji smo skušali zbrati in prikazati podatke o starosti in spolu bolnikov, času bolezni, klinični sliki bolezni ter seroloških skupinah in genotipih VTEC. S tem želimo izboljšati poznavanje tveganih skupin bolnikov, okuženih z VTEC, ter pripomoči k hitrejšemu in učinkovitejšemu diagnosticiranju teh bakterij.

Materiali in metode

Sevi bakterij. V raziskavo je bilo vključeni 66 verotoksigenih sevov *E. coli* (VTEC), ki smo jih zbrali na Inštitutu za varovanje zdravja Republike Slovenije (IVZ). Sevi so bili osamljeni iz vzorcev iztrebkov bolnikov z drisko med letoma 1993 in 2009 na IVZ, Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani (IMI) in v sedmih regionalnih zavodih za zdravstveno varstvo (Nova Gorica (NG), Kranj (KR), Celje (CE), Koper (KP), Maribor (MB), Murska Sobota (MS) in Novo mesto (NM)). Mikrobiološki laboratorij, ki je sprejel vzorec iztrebka, je prispeval podatke o času bolezni, starosti in spolu bolnika ter razpoložljive podatke o klinični sliki. Sodelujoči laboratoriji so na IVZ posredovali izolate VTEC, izolate *E. coli* z določeno ali nedoločeno serološko skupino ali pa mešane bakterijske kulture. Vsi sevi *E. coli* so bili osamljeni iz iztrebkov bolnikov s klasičnimi bakteriološkimi metodami. Verotoksigenost izolatov, ki smo jih prejeli iz IMI in so bili osamljeni do leta 2006, so na omenjenem inštitutu dokazovali z encimsko-immunskim testom. Verotoksigenost preostalih izolatov, ki so bili osamljeni do leta 2006, je bila ugotovljena na IVZ z reverzno pasivno aglutinacijo laktosa, po letu 2006 pa tudi s PCR. Vsem sevom smo na IVZ določali prisotnosti genov za verotoksine, intimin in enterohemolizin. Serološke skupine O smo določili z antiserumi po navodilih proizvajalcev: Imunološki zavod Zagreb (Hrvaška), Statens Serum Institut (Danska), Sifin (Nemčija) in Denka Seiken (Japonska). Nekateri laboratoriji so serološke skupine izolatov *E. coli* določili sami, preostalim pa smo jih določili na IVZ.

Tabela 1: Ustanove, ki so prejele okužene vzorce z VTEC, leto osamitve, serološke skupine in genotipi osamljenih sevov VTEC.

Leto	Ustanova ^a (n) ^b	Serološka sk.	Genotip				
			Število	vtx1	vtx2	eae	ehxA
1993	IMI-LJ (1)	O157	1	+ ^d	+	+	+
1994	IMI-LJ (1)	O113	1	+	+	- ^e	+
1997	IMI-LJ (1)	O157	1	+	+	+	+
1998	IMI-LJ (1), KR (1)	O157	2	+	+	+	+
1998	IMI-LJ (2)	O26	2	-	+	+	+
1999	IVZ-LJ (1)	O157	1	-	+	+	+
1999	MS (1)	O157	1	+	+	+	+
1999	NG (1)	O157	1	+	-	+	+
1999	IMI LJ (1)	O26	1	-	+	+	+
2000	IVZ-LJ (2)	O157	2	-	+	+	-
2000	MB (1), NG (1)	O157	2	+	+	+	+
2000	NM (1)	O157	1	+	-	+	+
2000	IVZ-LJ (1)	O157	1	-	+	+	+
2001	NG (1)	O157	1	-	+	+	+
2001	IMI-LJ (1)	O17	1	+	+	-	-
2001	IMI-LJ (1)	ND ^c	1	-	+	-	+
2002	IMI - LJ (1), NG (1), KR (1)	O157	3	-	+	+	+
2003	IMI-LJ (1)	O157	1	-	+	-	+
2003	IMI-LJ (1), MB (1)	O157	2	+	+	+	+
2003	MB (2), IMI-LJ (1), MS (1)	O157	4	-	+	+	+
2004	IMI-LJ (1)	O145	1	-	+	+	+
2004	MB (3), KR (1)	O157	4	-	+	+	+
2005	NG (1)	O157	1	-	+	+	+
2005	IMI-LJ (1)	O145	1	-	+	+	+
2005	IMI-LJ (2)	O26	2	-	+	+	+
2006	NG (1)	O157	1	-	+	+	+
2006	IMI-LJ (1), IVZ-LJ (1)	O26	2	+	-	+	+
2006	IVZ-LJ (1)	O26	1	-	+	+	+
2007	NG (1)	O157	1	+	+	+	+
2007	KR (1)	O157	1	-	+	+	+
2007	NG (1), KR (1)	O26	2	+	-	+	+
2008	KR (1)	O157	1	-	+	+	+
2008	IVZ-LJ (1)	O avtoaglutinacija	1	+	-	+	+
2008	IVZ-LJ (1)	O26	1	-	+	+	+
2008	CE (1)	O103	1	-	+	-	+
2008	KR (1), CE (1)	O103	2	+	-	+	+
2008	IMI-LJ (1)	O111	1	-	+	+	-
2009	CE (1)	O157	1	-	+	+	+
2009	IVZ-LJ (1)	ND	1	-	+	-	-
2009	NG (1), IVZ-LJ (1)	O26	2	+	-	+	+
2009	KP (1), IMI-LJ (1)	O26	2	+	-	+	-
2009	KP (1)	O91	1	+	+	+	+
2009	IVZ-LJ (1)	O103	1	+	-	+	+
2009	CE (1)	O111	1	+	-	+	+
2009	IMI-LJ (1)	O126	1	-	+	-	-
2009	KR (1)	O128	1	-	+	-	+
2009	IVZ-LJ (1)	O148	1	-	+	-	-

^a IVZ: Inštitut za varovanje zdravja RS, Ljubljana; IMI: Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana; NG: ZZZ Nova Gorica; KR: ZZZ Kranj; KP: ZZZ Koper; CE: ZZZ Celje; MB: ZZZ Maribor; MS: ZZZ Murska Sobota; NM: ZZZ Novo mesto

^b število sevov; ^c ND: ni bilo določeno; ^d +, gen prisoten; ^e -, gen ni prisoten

Tabela 2: Pojavnost posameznih seroloških skupin VTEC po letih.

Leto	1993 1994 1997 1998 1999 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009															Skupaj
	Ser. sk. ^a															
O157	1	0	1	2	3	6	1	3	7	4	1	1	2	1	1	34
O26	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	2	3	2	1	4	15
O103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	4
O145	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2
O111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
O113	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
O17	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
O91	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
O126	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
O128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
O148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
ND ^b	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	3
Skupaj	1	1	1	4	4	6	3	3	7	5	4	4	4	7	12	66

^a serološka skupina; ^b serološka skupina ni bila določena

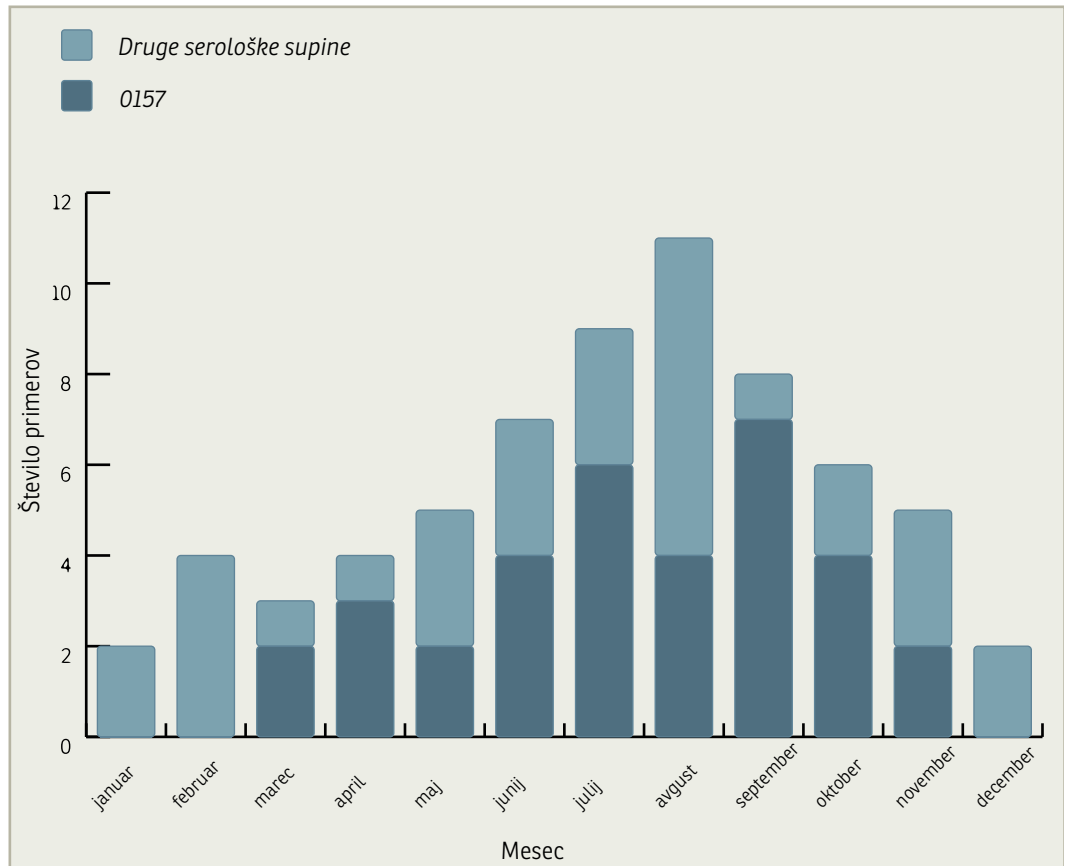
Priprava tarčne DNK. Tarčno DNK, ki smo jo uporabili v verižnih reakcijah s polimerazo (PCR), smo pripravili tako, da smo do 10 bakterijskih kolonij, zraslih na trdnem gojišču, suspendirali v 200 µl 10-odstotni raztopini Chelex-100 (Sigma, ZDA) v 1x pufri TE. Suspenzijo smo segrevali 5 min pri 100 °C, centrifugirali 5 min pri 2200 xg, nato pa 15 µl supernatanta prenesli v 100 µl 1x pufra TE in ga shranili pri -20 °C do uporabe.

Pomnoževanje v verižni reakciji s polimerazo (PCR). Prisotnost genov *vtx1* (verotoksin 1), *vtx2* (verotoksin 2) in *eae* (intimin) smo ugotavljali z mešanico začetnih oligonukleotidov »DEC Primer Mix« po navodilu proizvajalca (Statens Serum Institut, Danska).²⁰ Reakcijska mešanica za pomnoževanje v »multipli« verižni reakciji s polimerazo je poleg 8 µl tarčne DNK vsebovala še: 5 µl 10x pufra PCR, 3,5 µl 50mM MgCl₂, 8 µl mešanice dNTP (vsakega 1,25 mM) (Applied Biosystems, ZDA), 4 µl mešanice začetnih oligonukleotidov (Statens Serum Institut, Danska), 0,4 µl 5 U/µl polimeraze DNK Platinum Taq (Invitrogen, ZDA) in 11 µl vode (Sigma, ZDA). Pomnoževanje s

PCR je potekalo po naslednji shemi: dveminutni začetni denaturaciji DNK pri 95 °C je sledilo 35 ciklov (50 sekundna denaturacija pri 94 °C, 40-sekundno prileganje začetnih oligonukleotidov pri 62 °C, 50-sekundno pomnoževanje pri 72 °C) in triminutno končno pomnoževanje pri 72 °C. Ob vsakem pomnoževanju preiskovane DNK smo pomnoževali tudi kontrolno mešanico DNK *E. coli*, ki je vsebovala gene za *eae*, *vtx1* in *vtx2* (Statens Serum Institut, Danska).

Prisotnost gena za enterohemolizin (*ehxA*) smo ugotavljali z začetnima oligonukleotidoma hlyA1 (5'-GGT GCA GCA GAA AAA GTT GTA G-3') in hlyA4 (5'-TCT CGC CTG ATA GTG TTT GGT A-3'). Nastal je pomnožek PCR velikosti 1551 bp.²¹ Petindvajsetmikrolitrska reakcijska mešanica je vsebovala 7,5 µl vode (Fermentas, Litva), 12,5 µl 2x PCR mešanice (Fermentas, Litva) 1 µl (10 pmol/µl) vsakega začetnega oligonukleotida in 3 µl tarčne DNK. Pomnoževanje s PCR je potekalo po shemi: 2,5-minutni začetni denaturaciji DNK pri 95 °C je sledilo 30 ciklov (30-sekundna denaturacija pri 94 °C, 30-sekundno prileganje začetnih oligonukleotidov pri 60 °C, 90-se-

Slika 1: Število bolnikov, okuženih z VTEC, po mesecih.



kundno pomnoževanje pri 72 °C) in 10-minutno končno pomnoževanje pri 72 °C. Za pomnoževanja s PCR smo uporabili ciklični termostat Eppendorf (Nemčija).

Agarozna gelska elektroforeza: Pomnožke PCR smo pregledovali v 0,7–2,0 % 0,5 x TBE (Sigma, ZDA) agaroznih gelih.

Sposobnost izdelave verocitotoksinov VT1 in / ali VT2: Ugotavljali smo jih pri 43 sevih z reverzno pasivno aglutinacijo lateksa s testom VTEC – RPLA po navodilu proizvajalca (Oxoid, Velika Britanija) in predhodno opisanem postopku.²²

Rezultati

V raziskavo smo vključili seve *E. coli*, ki so ustrezali laboratorijskim merilom za določitev verotoksigena *E. coli*.²³ Pri vseh je bila dokazana prisotnost genov *vtx1* ali *vtx2*, ki nosijo zapise za verotoksine, pri večini pa tudi sposobnost izdelovanja verotoksinov.

Kot je razvidno s Slike 1, ki prikazuje število bolnikov zaradi okužbe z VTEC po posameznih mesecih v letu, so bolniki zbolevali skozi vse leto, največ v poletnih

in jesenskih mesecih. Bolnike smo razdelili v starostne skupine, kot prikazuje Slika 2. Največ bolnikov je bilo med zelo majhnimi otroki, mlajšimi od petih let (38 oz. 57,6 %). Vendar pa je bilo število bolnikov dokaj visoko tudi pri drugih starostnih skupinah, in sicer v skupini 25–44 let, 45–64 let in pri bolnikih, starih 65 let ali več (Slika 2). Med zelo majhnimi otroki je bilo nekoliko več dečkov kot deklic, pri starejših obolelih pa nekoliko več žensk kot moških (ni prikazano).

V Tabeli 1 prikazujemo serološke skupine O posameznih verotoksigenih sevov *E. coli*, leto njihove osamitve in ustanove, ki so prejele vzorce iztrebkov bolnikov, okuženih z VTEC. Kar 34 od 66 sevov VTEC (51,5 %) je pripadalo serološki skupini O157. Na drugem mestu je bila O26 (15 od 66 sevov oz. 22,7 %), štiri sevi so pripadali serološki skupini O103, po dva O145 in O111, po en pa serološkim skupinam O113, O17, O126, O148, O128 in O91. Enemu sevu serološke skupine O nismo mogli določiti zaradi avtoaglutinacije, dva seva pa nista pripadala nobeni od seroloških skupin, za katere smo imeli v naših laboratorijih antiserume. Največ se-

Tabela 3: Genotipi posameznih seroloških skupin VTEC.

Genotip	vtx2, eae, ehxA	vtx1, eae, ehxA	vtx1, vtx2, eae, ehxA	vtx2, ehxA	vtx2, eae	vtx2	vtx1, eae	vtx1, vtx2	vtx1, vtx2, ehxA	Skupaj
Ser. sk. ^a										
O157	19	2	10	1	2	0	0	0	0	34
O26	7	6	0	0	0	0	2	0	0	15
O103	0	3	0	1	0	0	0	0	0	4
O145	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
O111	0	1	0	0	1	0	0	0	0	2
O113	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
O17	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
O91	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
O126	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
O128	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
O148	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
ND ^b	0	1	0	1	0	1	0	0	0	3
Skupaj	28	13	11	4	3	3	2	1	1	66

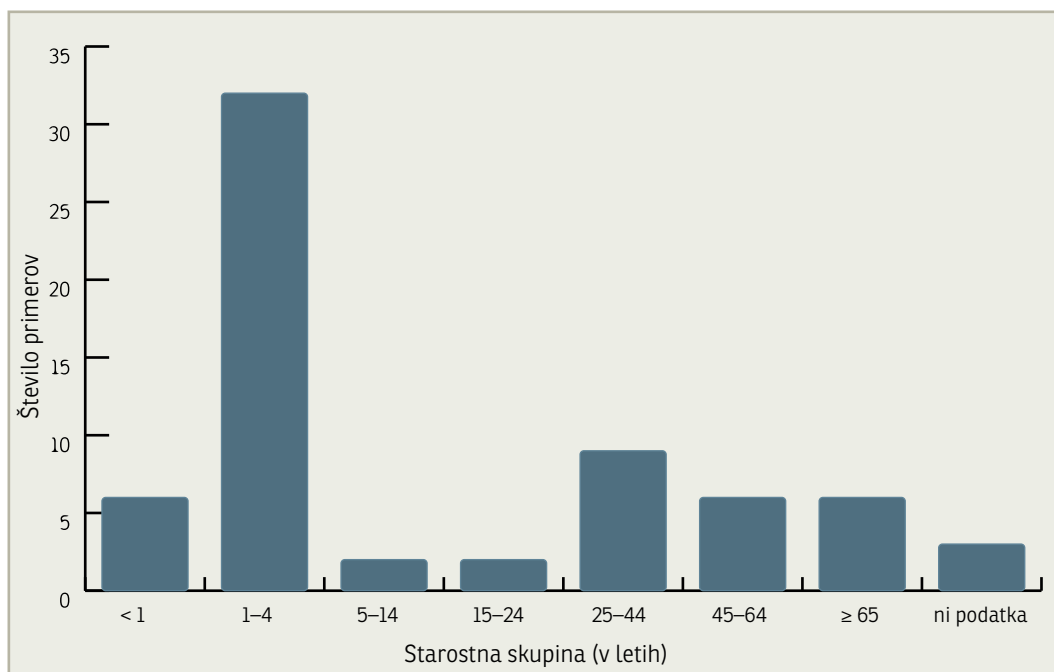
^a serološka skupina; ^b serološka skupina ni bila določena

vov VTEC (24 od 30 oz. 80 %), osamljenih do leta 2004, je pripadalo serološki skupini O157. To verjetno ni zgolj posledica dejanske prevladujoče prisotnosti te serološke skupine med VTEC, ampak tudi bolj načrtnega iskanja in dokazovanja verotoksinov pri tej serološki skupini v tem obdobju. Druga najpogostejša serološka skupina med preiskovanimi sevi je bila O26. Največ sevov te serološke skupine je bilo osamljenih v letih 2006 (3 sevi) in 2009 (4 sevi). V zadnjih letih, zlasti v letih 2008 in 2009, pa smo opazili večjo zastopanost drugih seroloških skupin, kot so O103, O111, O148, O126, O128 in O91 (Tabela 2).

Verotoksogene *E. coli* imajo različne dejavnike virulence, za katere nosijo zapise različni geni. Pri 40 od 42 testiranih sevov smo ugotovili sposobnost izdelovanja verotoksinov z reverzno pasivno aglutinacijo lateksa (VTEC – RPLA). Pri dveh sevih, ki sta pripadala serološkima skupinama O157 in O126, sposobnosti izdelovanja verotoksinov s to metodo nismo dokazali, vendar je bila pri slednjem dokazana naknadno z encimsko-immunskim testom. Pri preostalih 24 sevih, ki smo jih prejeli iz IMI in so bili osa-

mljeni do leta 2006, so na omenjenem inštitutu sposobnost izdelovanja verotoksinov preverjali z encimsko-immunskim testom. Pri enem sevu *E. coli* O157 sposobnost izdelovanja verotoksinov s to metodo ni bila dokazana, je pa bila naknadno določena s testom VTEC – RPLA. Prisotnost genov za verotoksine, *vtx1* in / ali *vtx2*, smo ugotovili pri vseh proučevanih sevih (Tabela 1). Gen *vtx2* je imelo 38 sevov (57,6 %), petnajst sevov (22,7 %) je imelo le gen *vtx1*, trinajst sevov (19,7 %) pa je imelo oba gena. Slednji so pripadali serološkim skupinam O157, O17, O91 in O113. Pri preiskovanih sevih smo ugotavljali tudi prisotnost genov za intimin (*eae*) in enterohemolizin (*ehxA*). Gen za intimin je imelo kar 57 sevov (86,4 %), pripadali so serološkim skupinam O157, O26, O145, O103, O111 in O91. Prav toliko sevov, ki so pripadali serološkim skupinam O157, O113, O26, O145, O103, O111 O91 in O128, je imelo gen za enterohemolizin. Glede prisotnosti proučevanih genov smo ugotovili veliko raznolikost genotipov med preiskovanimi sevi (Tabela 1, Tabela 3). Najpogostejši genotip pri VTEC O157 je bil *vtx1*-, *vtx2*+, *eae*+, *ehxA*+ (19 / 66 sevov oz. 28,8 %). Pojavljal se

Slika 2: Število bolnikov, okuženih z VTEC, po starostnih skupinah.



je od leta 1999 pa vse do leta 2009, največ pa v letih 2002 (3 sevi), 2003 (4 sevi) in 2004 (4 sevi). Deset sevov O157 (15,2 %) je pripadalo genotipu *vtx1+*, *vtx2+*, *eae+*, *ehxA+*, ki pa je bil časovno in regionalno nekoliko manj enakomerno zastopan. Genotip *vtx1-*, *vtx2+*, *eae+*, *ehxA+* je bil najpogostejši tudi pri serološki skupini O26, saj smo ga ugotovili pri sedmih sevih. V zadnjih letih (2006, 2007 in 2009) pa se je pojavljal genotip *vtx1+*, *vtx2*, *eae+*, *ehxA+*. Genotipi proučevanih sevov ter njihova časovna in regionalna zastopnost je razvidna iz Tabel 1 in 3.

Verotoksigena *E. coli* povzročajo drisko, ki je lahko tudi krvava. Pri okužbi lahko pride do zapletov, kot sta trombotična trombocitopenična purpura (TTP) in hemolitični uremični sindrom (HUS). Podatke o težjem poteku bolezni, kot so krvava driska (KD), HUS in TTP, ki smo jih uspeli zbrati, prikazujemo v Tabeli 4. Krvavo drisko je povzročilo sedem sevov VTEC, ki so imeli gen za *vtx2* in/ali *vtx1* ter gena za intimin in enterohemolizin. Pripadali so serološkim skupinam O157, O26 in O103. Z osmimi primeri zapletov, kot sta TTP in/ali HUS, so bile povezane naslednje serološke skupine: O157 (dva primera), O26 (dva primera), po en primer pa z O17, O145 in O126. Enemu sevu, povezanemu s HUS, serološke skupine O nismo uspeli določiti. Oboleli so bili majhni otroci, stari do 4 leta, ali pa starejše osebe.

Pri vseh sevih, kjer je prišlo do HUS in/ali TTP, smo dokazali prisotnost gena *vtx2*, pri večini pa tudi prisotnost genov za intimin in enterohemolizin. Zanimivo je, da smo pri VTEC O126, ki je povzročil HUS pri 61 letni bolnici v letu 2008, dokazali zgolj prisotnost gena *vtx2*. Enak genotip verotoksigenega seva *E. coli* smo ugotovili tudi pri 55-letnem bolniku, pri katerem je prišlo do HUS po okužbi z VTEC v letu 2010 (ni prikazano). Omenjenemu sevu serološke skupine O nismo uspeli določiti.

Razpravljanje

Po podatkih Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni (ECDC) se je incidenca okužb z VTEC v evropskih državah, za katere so zbrali podatke, od leta 1995 do leta 2002, več kot podvojila. V letu 2005 je bila incidenca v državah, ki so posredovale podatke v mrežo Enter-net, 1,17/100000 prebivalcev in se je glede na leto 2004 zmanjšala.²⁴ V letu 2006 je bilo prijavljenih potrjenih primerov okužb z VTEC na 100000 prebivalcev 0,74,²⁵ leta 2007 0,61²⁶ in leta 2008 0,7.¹³ Povprečno povečevanje incidence do leta 2004 in njeno padanje v naslednjih letih ni nujno odraz dejanskega povečevanja in kasneje zmanjšanja števila okužb z VTEC. Pri tolmačenju podatkov o prijavljenih primerih okužb z VTEC mo-

Tabela 4: Klinična slika, starost bolnikov in leto bolezni ter serološka skupina in genotip povzročitelja.

Leto bolezni	Starost (v letih)	Serološka sk.	Genotip	Klinična slika ^a
1993	37	O157	<i>vtx1, vtx2, eae, ehxA</i>	KD
1998	14	O157	<i>vtx1, vtx2, eae, ehxA</i>	KD
1998	< 1	O26	<i>vtx2, eae, ehxA</i>	HUS
2001	68	O17	<i>vtx1, vtx2</i>	TTP
2001	56	ND	<i>vtx2, ehxA</i>	TTP, odpoved ledvic
2002	4	O157	<i>vtx2, eae, ehxA</i>	HUS
2005	2	O145	<i>vtx2, eae, ehxA</i>	HUS, smrt
2005	1	O26	<i>vtx2, eae, ehxA</i>	HUS
2006	64	O26	<i>vtx1, eae, ehxA</i>	KD
2007	81	O157	<i>vtx2, eae, ehxA</i>	HUS, TTP
2008	55	O157	<i>vtx2, eae, ehxA</i>	KD
2008	7	O103	<i>vtx1, eae, ehxA</i>	KD
2009	4	O26	<i>vtx1, eae, ehxA</i>	KD
2009	61	O126	<i>vtx2</i>	KD, HUS

^a KD – krvava driska, TTP – trombotična trombocitopenična purpura, HUS – hemolitično-uremični sindrom

ramo nujno upoštevati uporabljeni sistem spremljanja in metodologijo odkrivanja VTEC v posameznih državah, saj sta se oba s časom spreminjala.¹³ Nekatere države so v določenih letih poročale vse okužbe z *E. coli*, vključno z VTEC, nekatere pa zgolj okužbe z VTEC O157. Odkrivanje patogenih *E. coli*, vključno z verotoksigenimi *E. coli*, je v primerjavi z odkrivanjem nekaterih drugih črevesnih bakterij dokaj zahtevno, pogosto dolgotrajnejše in tako povezano z večjimi stroški. Zato podatki o okužbah s temi bakterijami v Sloveniji in v svetu ne odražajo dejanskega stanja. Da bi dobili vsaj okvirni vpogled v podatke o epidemiologiji in virulenci verotoksigenih *E. coli* v Sloveniji, smo za seve, ki smo jih zbrali v laboratoriju IVZ, pridobili podatke o času bolezni, starosti in spolu bolnikov, izolatom VTEC pa določili nekatere dejavnike virulence.

Ugotovili smo, da so za okužbo s sevi VTEC, vključenimi v našo raziskavo, bolniki zbolevali skozi vse leto. Do povečanega števila okužb je prihajalo v poletnih in jesenskih mesecih, največ pa julija, avgusta in septembra (Slika 1). Do podobnih ugotov-

vitev so prišli tudi v drugih državah.^{10,13,24-26}

Po podatkih ECDC za leto 2008 je bilo večje število okužb z VTEC v poletnih mesecih značilno zlasti za serološko skupino O157, medtem ko so bile okužbe z drugimi serološkimi skupinami manj odvisne od letnega časa.¹³ Največ bolnikov, ki so zboleli zaradi okužb s sevi, vključenimi v našo raziskavo, je bilo mlajših od 5 let, veliko jih je bilo v starostnih skupinah nad 25 let, najmanj bolnikov pa je bilo starih 5–24 let (Slika 2). Glede na podatke ECDC je bilo v letih 2005, 2006 in 2007 največ bolnikov, okuženih z VTEC, starih do 4 leta, pri drugih starostnih skupinah je bila incidenca okužb nižja. Pomembnejše razlike glede okužb med spoloma v naši raziskavi in tudi po podatkih ECDC²⁴⁻²⁶ niso ugotovili.

Verotoksigene *E. coli* lahko pripadajo zelo različnim serotipom, ki vključujejo večino seroloških skupin O *E. coli*.²⁷ Vendar pa se določeni serotipi in tako tudi določene serološke skupine O pojavljajo pogosteje. Dobra polovica izolatov VTEC, vključenih v našo raziskavo, je pripadalo serološki skupini O157. Prevladovali so do leta 2004, nato

pa se je njihovo število glede na druge serološke skupine zmanjšalo. To ni nujno odraz dejanskega stanja, ampak bolj načrtnega iskanja in dokazovanja verotoksinov pri O157 v tem obdobju. Druga najpogostejša serološka skupina je bila O26, tako je v letu 2009 največ preiskovanih verotoksigenih sevov pripadalo ravno tej serološki skupini (Tabela 2). Večina sevov seroloških skupin O157 in O26 je verotoksigenih ali pa enteropatogenih.²⁷⁻³⁰ Slednje nimajo genov za verotoksine, imajo pa gen za intimin. Zanimiva ugotovitev naše raziskave je, da se od leta 2008 dalje med verotoksigenimi sevi pojavlja vedno več različnih seroloških skupin O (Tabela 1, Tabela 2). Tako so VTEC iz leta 2009 pripadale vsaj osmim različnim serološkim skupinam. Preiskani verotoksigeni sevi spadajo v naslednje serološke skupine: O17, O26, O91, O103, O111, O113, O126, O128, O148, O145 in O157 (Tabela 1). Ker je sev, ki je povzročil letošnji izbruh v Nemčiji, pripadal serološki skupini O104, navajamo kot zanimivost podatek, da noben sev VTEC, osamljen od januarja do septembra 2011 v sodelujočih laboratorijih, ni pripadal tej serološki skupini (ni prikazano). Po podatkih ECDC je bilo v letih 2007 in 2008 več kot polovica (54,1 in 53,0 %) prijavljenih in potrjenih VTEC okužb pri ljudeh povezanih s serološko skupino O157. Zelo visok delež, kar 29 % leta 2007 oziroma 25,9 % leta 2008, so predstavljale VTEC, ki jim serološka skupina O ni bila določena in so se tako uvrstile na drugo mesto med vsemi VTEC. Na tretje in četrto oziroma na drugo in tretje mesto med določenimi serološkimi skupinami O sta se uvrstile skupini O26 in O103. Med najpogostejšimi desetimi serološkimi skupinami v letu 2007 najdemo še O91, O145, O111, O128, O113, O146, v letu 2008 se pojavi še O117, ni pa bilo O113.^{13,31}

Glede prisotnosti genov *vtx1*, *vtx2*, *eae* in *ehxA* smo ugotovili veliko raznolikost med preiskovanimi verotoksigenimi sevi (Tabela 1, Tabela 3). Tako smo za serološki skupini O157 ugotovili pet, za O26 pa tri različne genotipe, vendar so se nekateri genotipi pojavljali mnogo pogosteje kot drugi. Glede prisotnosti genov za verotoksine smo pri 22 sevih (64,7 %) O157 ugotovili prisotnost gena *vtx2*, prisotnost obeh genov, *vtx1* in *vtx2*,

smo ugotovili pri desetih sevih (29,4 %). O pogosti prisotnosti genov za *vtx2* pri humanih izolatih VTEC O157 poročajo tudi drugi avtorji.^{6,10,32,33} Prisotnost zgolj gena za *vtx1* pa smo ugotovili le pri dveh sevih (5,9 %), kar je tudi po ugotovitvah drugih avtorjev bolj značilnost preostalih seroloških skupin,³³ kot sta npr. O26 in O103.¹⁴ Pri VTEC O26 smo ugotovili, da je imela dobra polovica sevov gen za *vtx1*, slaba polovica sevov je imela gen za *vtx2*, noben sev pa ni imel genov za obe skupini verotoksinov. Pri večini sevov obeh seroloških skupin smo določili prisotnost genov za intimin in enterohemolizin (Tabela 1).

V pričujoči raziskavi smo ugotovili, da je prišlo do težjih oblik poteka bolezni, kot so krvava driska, HUS in TTP, predvsem pri majhnih otrocih (starih manj kot pet let) in starejših ljudeh (Tabela 4). Po podatkih ECDC in Evropske agencije za varno hrano (EFSA) so države članice EU, ki so sporočale podatke v letih 2007 in 2008, ugotovile največ primerov HUS pri otrocih do četrtega leta starosti, veliko primerov pa so ugotovili tudi v starostni skupini 5–14 let.^{13,31} Najpogostejše serološke skupine, povezane s HUS^{13,31} in tudi s krvavo drisko,³⁴ so bile poleg O157 še O26, O111, O103, O145. V naši raziskavi so bile s težjim potekom bolezni povezane VTEC O157, O26, O17, O103, O126 in O145 (Tabela 4). Krvava driska je bila povezana s sevi, ki so imeli gene za eno ali obe skupini toksinov, vsi pa so imeli gen za enterohemolizin in intimin. Omenjena gena smo ugotovili tudi pri verotoksigenih sevih, povezanih s HUS in/ali TTP, o čemer poročajo tudi drugi avtorji.^{12,14,21,34} Verotoksigene *E. coli*, povezane s HUS, imajo pogosto gen za *vtx2*,¹² kar smo ugotovili tudi za seve, vključene v našo raziskavo. Z omenjenim zapletom so pogosteje povezani določeni podtipi verotoksinov. Nadaljnja tipizacija genov *vtx1* in *vtx2* pri slovenskih izolatih bo pripomogla k oceni tveganja za nastanek HUS. Nedavni izbruh s sevom *E. coli* O104:H4 je pokazal nujnost spremljanja ne le verotoksigenih ampak tudi preostalih skupin *E. coli*, ki povzročajo črevesne okužbe. To pa je povezano s sprotnim uvajanjem metodologije, ki omogoča njihovo odkrivanje in prepoznavanje njihovih lastnosti.

Zahvala

Avtorice se zahvaljujemo Tatjani Harlander iz ZZV Novo mesto, Dušanu Novaku iz ZZV Maribor, Bojanu Drinovcu iz ZZV Koper in Iztoku Štrumblju iz ZZV Murska Sobota, ki so prav tako prispevali nekatere verotoksigene seve *E. coli* in nam posredovali razpoložljive epidemiološke podatke.

Literatura

- Chang DE, Smalley DJ, Tucker DL, Leatham MP, Norris WE, Stevenson SJ, et al. Anderson AB, Grissom JE, Laux DC, Cohen PS, Conway T. Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 100: 7427–32.
- Johnson JR. Evolution of pathogenic *Escherichia coli*. In: Donnenberg MS, ed. *Escherichia coli*. Virulence mechanisms of a versatile pathogen. San Diego: Academic Press; 2002: 55–77.
- Gyles CL. Shiga toxin producing *Escherichia coli*: An overview. *J Anim Sci* 2007; 85: E45–62.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 123–40.
- Thorpe CM, Ritchie JM, Acheson DWK. Enterohemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. In: Donnenberg MS, ed. *Escherichia coli*. Virulence mechanisms of a versatile pathogen. San Diego, Academic Press, 2002: 119–54.
- Kawano K, Okada M, Haga T, Maeda K, Goto Y. Relationship between pathogenicity for humans and stx genotype in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27: 227–32.
- Kehl SC. Role of the laboratory in the diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichiacoli* infections. Minireview. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2711–5.
- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 142–201.
- Woodward DL, Clark CG, Caldeira RA, Ahmed R, Rodgers FG. Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC): A major public health treat in Canada. *Can J Infect Dis* 2002; 13: 321–30.
- Carroll AM, Gibson A, McNamara EB. Laboratory-based surveillance of human verocytotoxinogenic *Escherichia coli* infection in the Republic of Ireland, 2002–2004. *J Med Microbiol* 2005; 54: 1163–9.
- Manning SD, Motiwala AS, Springman AC, Qi W, Lacher DW, Quellette LM, et al. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. *PNAS* 2008; 105: 4868–73.
- Leotta GA, Miliwebsky ES, Chinen I, Espinosa EM, Azzopardi K, Tennant SM, et al. Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Australia and New Zeland. *BMC Microbiol* 2008; 8: 1–8.
- European food safety authority. Verotoxigenic *Escherichia coli*. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal* 2010; 8: 1496, 209–20.
- Eklund M, Scheutz F, Siitonen A. Clinical isolates of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2829–34.
- Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J Anim Sci* 2007: E45–E62.
- Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uremic syndrome. *Lancet* 2005; 365: 1073–86.
- European centre for disease prevention and control. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC): Update on outbreak in the EU [cited 27 July 2011]. Dosegljivo na http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/escherichia_coli/Pages/index.aspx.
- Frank C, Faber MS, Askar M, Bernard H, Fruth A, Gilsdorf A, et al. Large and ongoing outbreak of hemolytic uremic syndrome, Germany, May 2011. *Euro Surveill* 2011; 16: 21.
- Scheutz F, Møller Nilsen E, Frimodt – Møller J, Boisen N, Morabito S, Tozzoli R, et al. Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Euro Surveill* 2011; 16: 24.
- Persson S, Olsen KEP, Scheutz F, Krogfelt KA, Gerner-Smidt P. A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 516–24.
- Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* 1995; 63: 1055–61.
- Trkov M, Berce I, Dovečar D, Grilc E, Bujko M, Kraigher A. Odkrivanje nekaterih genov, povezanih z virulenco, pri sevih *E. coli*, ki povzročajo črevesne okužbe. *Zdrav Varst* 2008; 47: 81–8.
- Odločba Komisije 2008/426/ES z dne 28. aprila 2008 o spremembi Odločbe 2002/253/EC o opredelitvi primerov nalezljivih bolezni za poročanje mreži Skupnosti v skladu z Odločbo št. 2119/98/EC Evropskega parlamenta in Sveta. UL L št. 159 z dne 18.6.2008.
- European centre for disease prevention and control. Verocytotoxinogenic *Escherichia coli* (VTEC). Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe. Stockholm- European centre for disease prevention and control. 2007: 244–7.
- European centre for disease prevention and control. Vero/shiga toxin-producing *Escherichia coli* (VTEC/STEC) infection. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2008. Stockholm, European centre for disease prevention and control. 2008: 136–41.
- European centre for disease prevention and control. Vero/shiga toxin-producing *Escherichia coli* (VTEC/STEC) infection. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2009. Stockholm, European centre for disease prevention and control. 2009: 93–95.

27. Scheutz F, Strockbine NA. *Escherichia*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. New York: Springer; 2005: 607–24.
28. Jenkins C, Evans J, Chart H, Willshaw GA, Frankel G. *Escherichia coli* serogroup O26 – a new look at an old adversary. *J Appl Microbiol* 2008; 104: 14–25.
29. Campos LC, Franzolin MR, Trabulsi LR. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups – a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 545–52.
30. Bielaszewska M, Zhang W, Tarr PI, Sonntag AK, Karch H. Molecular profiling and phenotype analysis of *Escherichia coli* O26:H11 and O26:NM: Secular and geographic consistency of enterohemorrhagic and enteropathogenic isolates. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4225–8.
31. European food safety authority. Verotoxigenic *Escherichia coli*. The Community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007, EFSA Journal 2009–223: 211–21.
32. Crothers JL, Moore JE, Millar BC, Watabe M, Rooney PJ. Determination of verocytotoxin and *eae* gene loci by multiplex PCR in *Escherichia coli* O157:H7 isolated from human faeces in Northern Ireland: a four-year study of trends, 1997–2000. *Br J Biomed Sci* 2004; 61: 1–7.
33. Eklund M, Leino K, Siitonen A. Clinical *Escherichia coli* strain carrying *stx* genes: *stx* variants and *stx*-positive virulence profiles. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4585–93.
34. Beutin L, Krause G, Zimmermann S, Kaulfuss S, Gleier K. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-years period. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1099–108.