

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200178



A

291

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ

ΓΕΝΙΚΗ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΣΧΟΛΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

ΛΕΙΨΑΝΗ ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ ΤΗΣ ΑΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΤΕΡΝΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝ ΤΗΣ ΤΡΟΦΙΔΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ

ΑΙΤΗΣΗ

ΑΙΤΗΣΗ





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗΣ
ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ ΛΕΒΕΙΔΙΩΤΟΥ - ΣΤΕΦΑΝΟΥ

**ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΗΣ ESCHERICHIA COLI
0157:H7 ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΖΩΪΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ**

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΑΠ. ΝΤΟΝΤΟΡΟΥ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2003



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».



Ημερομηνία αιτήσεως: 28/4/1998

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς επιτροπής: 16/6/1998

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

ΧΡΥΣΑΝΘΗ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Μέλη:

ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ ΑΝΤΩΝΙΑΔΗΣ, Ομότιμος Καθηγητής Μικροβιολογίας

ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ ΛΕΒΕΙΔΙΩΤΟΥ-ΣΤΕΦΑΝΟΥ, Επίκουρη Καθηγήτρια

Μικροβιολογίας

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 23/6/1998

Ημερομηνία καταθέσεως διδακτορικής διατριβής: 20/12/2002

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ: Καθηγητής Νίκη Αγνάνη

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ ΑΝΤΩΝΙΑΔΗΣ, Ομότιμος Καθηγητής Μικροβιολογίας

ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ ΤΣΙΑΝΟΣ, Καθηγητής Παθολογίας, Δ/ντής Παθολογικής

Κλινικής

ΜΩΥΣΗΣ ΕΛΙΣΑΦ, Καθηγητής Παθολογίας

ΧΡΥΣΑΝΘΗ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ, Επ. Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ ΛΕΒΕΙΔΙΩΤΟΥ-ΣΤΕΦΑΝΟΥ, Επ. Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΧΡΗΣΤΟΥ, Επ. Καθηγητής Παθολογίας

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΧΑΛΙΑΣΟΣ, Επ. Καθηγητής Παιδιατρικής

Η διδακτορική διατριβή έγινε αποδεκτή με βαθμό «**ΑΡΙΣΤΑ**».



Στους γονείς μου,
Απόστολο και Φαίdra



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η *E.coli* O157:H7 αποτελεί τις δύο τελευταίες δεκαετίες μια σοβαρότατη απειλή για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως. Ο τροφιμογενής, κατά κύριο λόγο, τρόπος μετάδοσής του βακτηρίου, το καθιστά ιδιαίτερα επικίνδυνο καθώς μπορεί εύκολα να προσβάλλει μεγάλο αριθμό ατόμων, ενώ οι νόσοι που προκαλεί στον άνθρωπο είναι ιδιαίτερα σοβαρές και μπορούν να επιφέρουν έως και το θάνατο.

Ωστόσο, τα στοιχεία που έχουμε στη χώρα μας όσον αφορά στη συχνότητα απομόνωσης της *E.coli* O157:H7 τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα, καθώς και στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, είναι ελάχιστα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αναζήτηση στελεχών της *E.coli* O157:H7 σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης και ο προσδιορισμός της συχνότητάς της σε αυτά. Για την πραγματοποίηση αυτής της εργασίας παρακινήθηκα από την Επίκουρο Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κ. Χρυσάνθη Παπαδοπούλου.

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε εξ' ολοκλήρου στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη της Επίκουρου Καθηγήτριας κας Χρυσάνθης Παπαδοπούλου.

Επιθυμώ να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και τις ευχαριστίες μου στην Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Χρυσάνθη Παπαδοπούλου τόσο για την ανάθεση αυτής της εργασίας, όσο και για τις πολύτιμες υποδείξεις της, το απεριόριστο ενδιαφέρον και την ακούραστη συμπαράστασή της σε όλα τα στάδια εκπόνησης της εργασίας.

Εκφράζω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στα μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής, στην Επίκουρο Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κ. Σταματίνα Λεβειδιώτου-Στεφάνου για το ενδιαφέρον που επέδειξε κατά την εκτέλεση αυτής της εργασίας,



καθώς και για τη συμβολή της στη συγγραφή του τελικού κειμένου και στον Ομότιμο Καθηγητή Μικροβιολογίας κ. Γρηγόριο Αντωνιάδη για τις χρήσιμες υποδείξεις του.

Επίσης, εκφράζω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής, Καθηγητές κκ. Επαμεινώντα Τσιάνο και Μωυσή Ελισάφ και τους Επίκουρους Καθηγητές κκ. Λεωνίδα Χρήστου και Νικόλαο Χαλιάσο για τις πολύτιμες υποδείξεις τους.

Εκφράζω τις ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Κωνσταντίνο Ιωαννίδη για τη συμβολή του στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτής της εργασίας.

Εκφράζω τις ευχαριστίες μου στη Διευθύντρια του Ελληνικού Κέντρου Αναφοράς για την *E. coli* O157:H7 του Νοσοκομείου Ειδικών Παθήσεων Θεσσαλονίκης κα. Αθηνά Κανσουζίδου, για την επιβεβαίωση των στελεχών.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον τ. Διευθυντή του Νοσοκομείου Ειδικών Παθήσεων Θεσσαλονίκης Δρ. Β. Δανηλίδη για τις χρήσιμες υποδείξεις του.

Εκφράζω τις ευχαριστίες μου στην Dr. G. Willshaw – Smith του Special Projects Lab, Central Public Health Laboratory Service, Colindale, UK, για τη φαγοτυπία των στελεχών.

Επίσης, εκφράζω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στο Ίδρυμα Γεωργίου Σταύρου για την χορήγηση υποτροφίας σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ όλο το επιστημονικό και τεχνικό προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	17
A. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	19
B. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΗΣ <i>E. COLI</i>	21
Γ. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ-ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ <i>E. COLI</i> O157:H7	23
Δ. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ-ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	25
1. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ	25
2. ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ	29
2.1. Τροφιμογενής μετάδοση	30
2.2. Μετάδοση από άτομο σε άτομο	31
2.3. Υδατογενής μετάδοση	31
3. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ	33
4. ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ ΠΟΥ ΟΦΕΙΛΟΝΤΑΝ ΣΤΗΝ <i>E. COLI</i> O157:H7	37
5. Η <i>E. COLI</i> O157:H7 ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ	41
5.1. Στελέχη της <i>E. coli</i> O157:H7 που έχουν απομονωθεί από ανθρώπους	41
5.2. Στελέχη της <i>E. coli</i> O157:H7 που έχουν απομονωθεί από ζώα	43
5.3. Στελέχη της <i>E. coli</i> O157:H7 που έχουν απομονωθεί από τρόφιμα	43
E. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	44
1. ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ, ΔΟΜΗ, ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ SHIGA ΤΟΞΙΝΩΝ	47
2. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΣ ΔΟΣΗ	48
ΣΤ. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ	48
1. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ	48
1.1. Ασυμπτωματική μόλυνση ή μη αιμορραγική διάρροια	49
1.2. Αιμορραγική κολίτιδα	
1.3. Αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο	



1.4. Θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα	55
2. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ ΣΤΑ ΖΩΑ	56
Z. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	58
1. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ <i>E. COLI</i> O157 ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ	58
1.1. Συλλογή του κλινικού δείγματος	58
1.2. Απομόνωση και ταυτοποίηση της <i>E.coli</i> O157:H7	58
2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΜΟΛΥΣΜΕΝΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	59
2.1. Τρόπος λήψης των δειγμάτων τροφίμων	59
2.2. Απομόνωση της <i>E.coli</i> O157:H7	59
2.2.1. Μέθοδος της κλασικής καλλιέργειας	59
2.2.2. Μέθοδος του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού	61
2.3. Ανίχνευση της <i>E.coli</i> O157:H7	62
2.3.1. Μέθοδοι βασισμένες στην αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος	62
α. Συγκόλληση με σωματίδια latex καλυμμένα με αντιγόνο	62
β. Elisa	62
γ. Χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων	63
2.3.2. Μέθοδοι βασισμένες στο DNA του βακτηρίου	64
α. Χρήση ανιχνευτών DNA	64
β. Μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR)	64
2.4. Επιβεβαιωτικές δοκιμασίες για την ταυτοποίηση της <i>E.coli</i> O157	65
2.5. Μέθοδοι για την ανίχνευση παραγωγής των τοξινών	66
2.5.1. Κυτταροκαλλιέργεια	66
2.5.2. Ειδικοί αντιποροί	67
2.5.3. Elisa	67
2.5.4. Χρήση ανιχνευτών DNA	67



2.5.5. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	67
2.6. Έλεγχος στα Εργαστήρια Αναφοράς	68
2.6.1. Φαγοτυπία	68
2.6.2. Πλασμιδιακή ανάλυση	68
2.6.3. Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο (PFGE)	68
H. ΠΡΟΛΗΨΗ-ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΦΥΛΑΞΗΣ	69
1. ΓΕΝΙΚΑ ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΦΥΛΑΞΗΣ	69
2. ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	69
2.1. Επίδραση της θερμοκρασίας	70
2.2. Επίδραση του χλωριούχου νατρίου	71
2.3. Επίδραση του pH	71
2.4. Επίδραση των οξέων	72
2.5. Επίδραση των συντηρητικών	72
2.6. Επίδραση της τροποποιημένης ατμόσφαιρας	72
2.7. Επίδραση της ζύμωσης και της ξήρανσης	73
Θ. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ-ΘΕΡΑΠΕΙΑ	73
1. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	73
2. ΘΕΡΑΠΕΙΑ	74
II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	79
A. ΣΚΟΠΟΣ	81
B. ΥΛΙΚΟ	81
Γ. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	83
1. Ομογενοποίηση των δειγμάτων τροφίμων	84
2. Προεμπλουτισμός των δειγμάτων τροφίμων	84
2.1. Δείγματα γάλακτος	85



2.2. Δείγματα κρέατος που δεν είχαν υποστεί θερμική επεξεργασία	86
2.3. Δείγματα αλλαντικών	86
2.4. Δείγματα εντέρων χοίρων	86
3. Μέθοδος της κλασικής καλλιέργειας	87
3.1. Θρεπτικά υποστρώματα	87
3.2. Ενοφθαλμισμός στα στερεά θρεπτικά υποστρώματα	88
3.3. Επώαση των δειγμάτων τροφίμων	89
3.4. Επισκόπηση-ανάγνωση των θρεπτικών υποστρωμάτων	89
3.5. Ταυτοποίηση της <i>E.coli</i> O157:H7	89
3.5.1. Βιοχημική ταυτοποίηση	89
3.5.2. Ορολογική ταυτοποίηση	90
3.6. Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά	91
4. Μέθοδος του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού	92
4.1. Αρχή της μεθόδου του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού	92
4.2. Μεθοδολογία του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού	93
4.3. Τεχνική του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού	93
5. Φαγοτυπία, ανίχνευση παραγωγής τοξινών, βλεφαριδικό αντιγόνο	95
6. Εξέταση δειγμάτων κοπράνων ζώων	96
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	97
Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	105
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	117
SUMMARY	119
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	121



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



Α. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Το 1977, ο Τσέχος ερευνητής Konowalchuk και οι συνεργάτες του, μελετώντας τις τοξίνες που είχαν απομονώσει από ορισμένα διαρροϊκά στελέχη της *Escherichia coli*, διαπίστωσαν ότι διέφεραν από τις μέχρι τότε γνωστές τοξίνες των εντεροτοξινογόνων στελεχών *E.coli*. Επιπλέον διαπίστωσαν ότι οι νεοαπομονωθείσες τοξίνες είχαν κυτταροτοξική δράση στα νεφρικά κύτταρα (Vero κύτταρα) του πράσινου Αφρικανικού πιθήκου (Konowalchuk et al, 1977). Έκτοτε καθιερώθηκε τα στελέχη *E.coli* που παράγουν αυτού του είδους τις τοξίνες (vero-τοξίνες) να χαρακτηρίζονται ως vero-τοξινογόνα στελέχη.

Το 1982, αναφέρθηκαν στις Η.Π.Α. δύο μεγάλες επιδημίες αιμορραγικής κολίτιδας, στο Όρεγκον με 26 περιστατικά και στο Μίτσιγκαν με 21 περιστατικά. Επιδημιολογικές έρευνες που πραγματοποιήθηκαν για τις δύο αυτές επιδημίες, έδειξαν ότι και οι 47 ασθενείς είχαν καταναλώσει ατελώς ψημένα χάμπουργκερ από αλυσίδα εστιατορίων fast-food. Στη διάρκεια της εργαστηριακής διερεύνησης των επιδημιών, απομονώθηκε *E.coli* O157:H7 από το 50% των δειγμάτων κοπράνων των ασθενών, καθώς και από ένα δείγμα χάμπουργκερ από την επιδημία του Μίτσιγκαν (Riley et al, 1983).



Μετά την εμφάνιση αυτών των δύο επιδημιών, το Κέντρο Ελέγχου Νοσημάτων (CDC) των Η.Π.Α. επανεξέτασε 3000 στελέχη *E.coli*, τα οποία είχαν απομονωθεί από ασθενείς με διάρροϊκό σύνδρομο από το 1973 έως το 1977. Από την αναδρομική αυτή μελέτη βρέθηκε ένα μόνο στέλεχος *E.coli* O157:H7, το οποίο είχε απομονωθεί στην Καλιφόρνια το 1975, από μια πενηντάχρονη γυναίκα, που είχε εκδηλώσει οξεία, αυτοϊούμενη αιμορραγική διάρροια, με έντονο κοιλιακό άλγος (Riley et al, 1983).

Το 1983 αναφέρθηκε επιδημία αιμορραγικής κολίτιδας στον Καναδά (Johnson et al, 1983) και την ίδια χρονιά διαπιστώθηκε ότι τα στελέχη *E.coli* O157:H7 παράγουν τοξίνη παρόμοια με εκείνη της *Shigella dysenteriae* I. Η τοξίνη αυτή χαρακτηρίστηκε ως τοξίνη παρόμοια της σιγγέλας (Shiga-like toxin) (O'Brien et al, 1983).

Επίσης το 1983 οι Karmali και συνεργάτες, απέδειξαν ότι τα νερο-τοξινογόνα στελέχη της *E.coli* μπορούν να προκαλέσουν την εμφάνιση αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου (Karmali et al, 1983).

Το 1985, εμφανίστηκε στη Βρετανία για πρώτη φορά επιδημία αιμορραγικής κολίτιδας κατά την οποία απομονώθηκε η *E.coli* O157:H7 από τα κόπρανα ασθενούς. Συνολικά 24 άτομα νόσησαν, 11 εισήχθησαν σε νοσοκομεία, ενώ ένας ασθενής κατέληξε. Στην επιδημία αυτή, η μόλυνση παραδόξως δεν προήλθε από την κατανάλωση μολυσμένου κρέατος, αλλά από κατανάλωση πατατών οι οποίες είχαν επιμολυνθεί από χώμα, μολυσμένο με *E.coli* O157:H7 (Morgan et al, 1988).

Από το 1982 μέχρι σήμερα δεκάδες επιδημίες, αλλά και μεμονωμένα περιστατικά έχουν αποδοθεί στο βακτήριο αυτό, καθιστώντας το έτσι μια σοβαρότατη αναδυόμενη απειλή για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως.



Β. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΗΣ *E. COLI*

Το 1885 ο Γερμανός γιατρός Theodor Escherich, μελετώντας το περιεχόμενο του γαστρεντερικού σωλήνα των βρεφών, απομόνωσε για πρώτη φορά ένα νέο βακτήριο, στο οποίο έδωσε το όνομα *Bacterium coli* (Sussman, 1985).

Το 1919, οι Castellani και Chalmers περιέγραψαν το έως τότε ονομαζόμενο *Bacterium coli*, ως ένα νέο βακτήριο που δεν μπορούσε να καταταχθεί στα είδη γνωστά γένη βακτηρίων, εξαιτίας των διαφορετικών βιοχημικών του ιδιοτήτων και έδωσαν σε αυτό το όνομα *Escherichia coli*, προς τιμήν του T. Escherich (Bettelheim, 1991).

Σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Bergey (Krieg και Holt, 1984), τα στελέχη της *E. coli* που προκαλούν γαστρεντερίτιδα στον άνθρωπο διακρίνονται σε τρεις ομάδες:

- 1) Εντεροπαθογόνα στελέχη *E. coli* (*Enteropathogenic E. coli* -EPEC)
- 2) Εντεροτοξινογόνα στελέχη *E. coli* (*Enterotoxigenic E. coli* -ETEC)
- 3) Εντεροδιδεισδυτικά στελέχη *E. coli* (*Enteroinvasive E. coli* -EIEC).

Οι ομάδες και οι κυριότεροι ορότυποι των ομάδων αυτών, παρουσιάζονται στον πίνακα 1:



Πίνακας 1. Ορότυποι παθογόνων στελεχών της *E.coli* (Krieg και Holt, 1984)

EPEC	ETEC	EIEC
O26, O44, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, O158	O6:K15:H16, O8:K40:H9, O25:K98, O8:K47:H-, O8:K25:H9, O11:H27, O15:H11, O20:H-, O25:K7:H42, O27:H7, O27:H20, O63:H12, O73:H45, O85:H7, O78:H11, O78:H12, O114:H21, O115:H51, O128:H7, O128:H12, O128:H21, O139:H28, O148:H28, O149:H4, O159:H4, O159:H20, O159:H34, O166:H27, O169:H-	O28, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164

Το 1977, όπως προαναφέρθηκε, οι Konowalchuk και συνεργάτες, ανακάλυψαν την κυτταροτοξική δράση τοξινών που παράγονταν από στελέχη της *E.coli*, τα οποία όμως διέφεραν από τις ήδη γνωστές ομάδες. Έτσι, προστέθηκε στις παραπάνω τρεις ομάδες και μια νέα ομάδα παθογόνων οροτύπων της *E.coli*, που προκαλούν γαστρεντερίτιδα και ονομάστηκαν «βεροτοξινογόνες» (verotoxigenic *E.coli*-VTEC) εξαιτίας της τοξικής τους δράσης πάνω στα νερο κύτταρα. Τα στελέχη αυτά ονομάστηκαν επίσης και «Έντεροαιμορραγικά» (Enterohemorrhagic *E.coli*-EHEC) εξαιτίας της πρόκλησης αιμορραγικής διάρροιας στον άνθρωπο, αλλά και «Στελέχη που παράγουν τοξίνη όμοια με της σιγγέλας» (Shiga-like toxin producing-SLTEC) (Tarr, 1995).



Στην κατηγορία των εντεροαιμορραγικών στελεχών της *E.coli* που είναι παθογόνα για τον άνθρωπο, ανήκουν περισσότεροι από 100 ορότυποι, ωστόσο ο πιο σημαντικός και συχνότερα απομονούμενος από ασθενείς με γαστρεντερίτιδες, είναι ο O157:H7 (Griffin, 1995). Ο ορότυπος αυτός αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1972 (Furowicz και Orskov, 1972), ενώ το 1977 απομονώθηκαν στην Αργεντινή τρία στελέχη από νεαρά βοοειδή με κολιβακιλική διάρροια τα οποία όμως ταυτοποιήθηκαν ως *E.coli* O157:H7 δέκα χρόνια αργότερα (Orskov et al, 1987).

Το 1985, στα ήδη γνωστά στελέχη της *E.coli* προστέθηκε και μια πέμπτη ομάδα, τα «Εντεροπροσκολλητικά στελέχη *E.coli*» (Enteroadherent *E.coli*-EAEC), που ονομάστηκαν έτσι εξαιτίας της ικανότητάς τους να προσκολλώνται σε περισσότερο από το 40% των κυττάρων Hep-2 στις κυτταροκαλλιέργειες (Mathewson et al, 1985).

Γ. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ-ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ *E.COLI* O157:H7

Η *E.coli* O157:H7 έχει τις ίδιες βιοχημικές ιδιότητες με τα υπόλοιπα στελέχη της *E.coli*, διαφέρει όμως από αυτά σε τρεις βασικές ιδιότητες. Αυτές είναι:

1) Αδυναμία ζύμωσης της σορβιτόλης μέσα σε 24 ώρες (Wells et al, 1983, Farmer και Davis, 1985). Το χαρακτηριστικό αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την απομόνωση και ταυτοποίηση του βακτηρίου, δεδομένου ότι πάνω από το 90% των υπολοίπων στελεχών της *E.coli* ζυμώνουν τη σορβιτόλη μέσα σε 24 ώρες (Honish, 1986).



2) Αδυναμία παραγωγής β-γλυκουρονιδάσης, του ενζύμου που υδρολύει το 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG). Αποτέλεσμα της υδρόλυσης αυτής, είναι ο φθορισμός υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Αυτή την ικανότητα υδρόλυσης την έχει το 93% και περισσότερο των στελεχών της *E.coli*, όχι όμως και τα στελέχη *E.coli* O157:H7 (Feng και Hartman, 1982, Doyle και Schoeni, 1984).

3) Αδυναμία ανάπτυξης του βακτηρίου σε θερμοκρασίες από 44 °C έως 45,5°C (Doyle και Schoeni, 1984). Αυτή η ιδιότητα είναι ιδιαίτερα σημαντική, δεδομένου ότι στις περισσότερες μεθόδους αναζήτησης κολοβακτηριοειδών στα τρόφιμα χρησιμοποιούνται αυτές οι θερμοκρασίες (Raghubeer και Matches, 1990).

Άλλες χαρακτηριστικές ιδιότητες της *E.coli* O157:H7 είναι:

1) Η παραγωγή των Shiga τοξινών, που παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην παθογένεια του βακτηρίου.

2) Η παραγωγή της εντεροαιμολυσίνης, μιας πρωτεΐνης που κωδικοποιείται πλασμιδιακά και προκαλεί μικρές ζώνες αιμόλυσης στο αιματούχο άγαρ μετά από επώαση στους 37°C για 18 ως 24 ώρες. Αντίθετα, η εξωκυτταρική α-αιμολυσίνη των υπολοίπων στελεχών της *E.coli* προκαλεί σαφείς ζώνες αιμόλυσης στο αιματούχο άγαρ μετά από επώαση 4-6 μόνο ωρών στην ίδια θερμοκρασία (Beutin et al, 1989).

3) Η ζύμωση της ραφινόζης και της δουλσιτόλης (Ratnam et al, 1988).



Δ. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ-ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

1. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ

Δεξαμενή της *E.coli* O157:H7 αποτελούν υγιή βοοειδή, στον εντερικό σωλήνα των οποίων υπάρχει το βακτήριο και αποβάλλεται με τα κόπρανα, μολύνοντας το κρέας, το γάλα και το περιβάλλον (Borzuck et al, 1987).

Στις Η.Π.Α., ανευρίσκεται το βακτήριο στα κόπρανα μοσχарιών (2,3%) και δαμαλιών (3%), ενώ σε πολύ μικρότερο ποσοστό (0,15%) ανευρίσκεται στις ενήλικες αγελάδες (Wells et al, 1991). Παράλληλα, διαφορετική είναι και η συχνότητα ανεύρεσης της *E.coli* O157:H7 μεταξύ γαλακτοπαραγωγών και κρεοπαραγωγών φυλών βοοειδών (0,28% και 0,33% αντίστοιχα), όπως αποκαλύπτεται από έρευνα των Hancock et al, 1994.

Επίσης, η συχνότητα απομόνωσης της *E.coli* O157:H7 από τα κόπρανα βοοειδών ποικίλλει από χώρα σε χώρα, όπως εμφανίζεται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2. Συχνότητα απομόνωσης της *E.coli* O157:H7 από τα βοοειδή

Χώρα	Ποσοστό απομόνωσης (%)	Βιβλ. αναφορά
Ιταλία	16,6	Bonardi et al, 1999
Βρετανία	15,7	Chapman et al, 1997
Ολλανδία	11,1	Heuvelink et al, 1998α
Γερμανία	10,8	Montenegro et al, 1992

Καναδάς	9,5	Wilson et al, 1992
Ισπανία	9	Blanco et al, 1993
Κολομβία	6,5	Mattar και Vásquez, 1998
Ιαπωνία	1,8	Miyao et al, 1998
Ταϊλάνδη	1,8	Vuddhakul et al, 2000
Φινλανδία	1,3	Lahti et al, 2001
Σουηδία	1,1	Albihn et al, 1997
Χονγκ Κονγκ	1	Leung et al, 2001
Νορβηγία	0,3	Vold et al, 1998
Ταϊβάν	0,13	Lin et al, 2001
Πολωνία	0	Osek και Winiarczyk, 2001
Ουγκάντα	0	Kadu-Mulindw et al, 2001
Ελλάδα	0	Κανσουζίδου και συν, 1994, Dontorou et al, 2001

Τα μολυσμένα βοοειδή μπορούν να αποβάλλουν το βακτήριο μέχρι και για 20 εβδομάδες τα ενήλικα ζώα και μέχρι 14 εβδομάδες τα ανήλικα (Cray και Moon, 1995). Κατά τη διάρκεια της αποβολής της *E.coli* O157:H7 με τα κόπρανα, είναι δυνατή η μόλυνση του γάλακτος, όταν δεν γίνεται σωστός καθαρισμός του μαστού του ζώου πριν την άμελξη.

Μόλυνση του κρέατος του ζώου στο σφαγείο είναι επίσης συχνή δεδομένου, ότι κατά τη διάρκεια της πλύσης του σφάγιου του ζώου είναι πιθανόν τα μικρόβια να μην απομακρύνονται, αλλά αντίθετα να διεισδύουν μέσα στο κρέας (Anderson et al, 1992). Μάλιστα οι Davidson και συν. (1978) υπολογίζουν διείσδυση των μικροβίων στο κρέας του ζώου σε βάθος 6 mm κατά τη διαδικασία της πλύσης του στο σφαγείο.

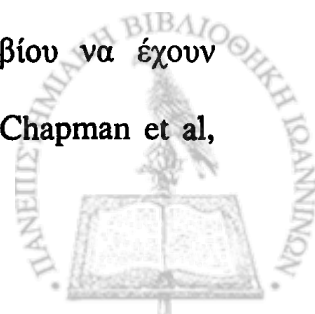


Τέλος, τα κόπρανα των ζώων-φορέων της *E.coli* O157:H7 μπορούν να μολύνουν και το περιβάλλον. Συγκεκριμένα, μόλυνση του νερού με κόπρανα βοοειδών-φορέων του βακτηρίου, έχει ως αποτέλεσμα επιβίωση για τουλάχιστον τέσσερις μήνες καθώς και πολλαπλασιασμός στο ίζημα λιμναζόντων νερών (Le Jeune et al, 1997).

Επίσης, ιδιαίτερα ανθεκτικό φαίνεται να είναι το βακτήριο και στα κόπρανα των βοοειδών στα οποία επιβιώνει για περισσότερο από 50 ημέρες, καθώς και στα νερά των ποταμών (27 ημέρες), σε μεταλλικές επιφάνειες (60 ημέρες), ενώ στο χώμα η *E.coli* O157:H7 επιβιώνει για πάνω από 130 ημέρες (Maule, 2000).

Ωστόσο, φαίνεται ότι τα βοοειδή δεν είναι το μοναδικό είδος ζώου που λειτουργεί ως δεξαμενή για την *E.coli* O157:H7. Στον εντερικό σωλήνα περίπου 1,4% φαινομενικά υγιών χοίρων στην Ιαπωνία υπάρχει το βακτήριο (Nakazawa et al, 1999). Ίδιο εμφανίζεται το ποσοστό απομόνωσης του βακτηρίου και από υγιείς χοίρους στην Ολλανδία (Heuvelink et al, 1999a). Στη Βρετανία το ποσοστό των χοίρων-φορέων της *E.coli* O157:H7 είναι πιο χαμηλό (0,4%), σύμφωνα με τους Charman et al (1997). Στη Νορβηγία το ποσοστό των χοίρων-φορέων της *E.coli* O157:H7 είναι ακόμη μικρότερο, περίπου 0,1% (Johnsen et al, 2001). Τέλος στο Χονγκ Κονγκ, σε κανένα από τα 487 δείγματα κοπράνων χοίρων δεν απομονώθηκε η *E.coli* O157:H7 (Leung et al, 2001).

Επίσης και στα κόπρανα προβάτων έχει ανιχνευτεί το βακτήριο και μάλιστα σε ποσοστά που φτάνουν το 31% κατά τη διάρκεια του μήνα Ιουνίου (Kudva et al, 1996). Άλλη έρευνα δείχνει πολύ μικρότερο ποσοστό (2,2%) και εδώ όμως η εποχική διακύμανση είναι σαφής, με 17 από τα 22 στελέχη του μικροβίου να έχουν απομονωθεί κατά τη διάρκεια των μηνών Ιουνίου ως Σεπτεμβρίου (Charman et al,



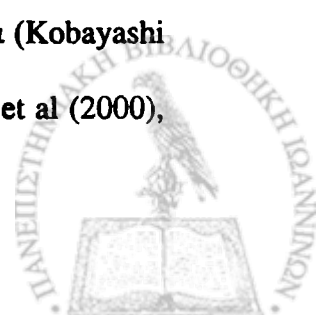
1997). Νεότερη έρευνα στη Βρετανία αποκαλύπτει ποσοστό μόλυνσης των προβάτων 7,4% (Charman et al, 2001). Στη Νορβηγία το ποσοστό των θετικών για το βακτήριο προβάτων είναι 0% (Johnsen et al, 2001). Στη χώρα μας, δεν απομονώθηκε κανένα στέλεχος της *E.coli* O157:H7 από κόπρανα προβάτων, απομονώθηκε όμως από κόπρανα αίγας σε ποσοστό 1,2% (Dontorou et al, 2001).

Όσον αφορά στην απομόνωση της *E.coli* O157:H7 από τα πουλερικά, σε έρευνες σε εντερικό περιεχόμενο αυτών δεν απομονώθηκε το βακτήριο (Charman et al, 1997, Heuvelink et al, 1999α). Αντίθετα, έρευνα των Pilircinpec και συν. (1999), αποκαλύπτει ποσοστό 9,2% πτηνών-φορέων του βακτηρίου από τα συνολικά 216 δείγματα παχέος εντέρου που εξετάστηκαν. Επίσης, πειραματικός ενοφθαλμισμός του βακτηρίου σε νεοσσούς μιας ημέρας, έδειξε ότι μπορούν να αποβάλλουν την *E.coli* O157:H7 για τουλάχιστον 11-12 μήνες, μολύνοντας εκτός από το περιβάλλον και το κέλυφος των αυγών, όχι όμως και το εσωτερικό τους (Schoeni και Doyle, 1994).

Όμως και από άλλα είδη πτηνών, όπως οι γαλοπούλες, έχει απομονωθεί η *E.coli* O157:H7 σε ποσοστό 1,3% των πτηνών που εξετάστηκαν (Heuvelink et al, 1999α).

Αντίθετα, επιδημιολογική έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε γλάρους στην Ιαπωνία, αποκάλυψε ότι ενώ είναι δυνατόν να μολυνθούν από άλλους εντεροαιμορραγικούς οροτύπους της *E.coli*, εντούτοις δεν απομονώθηκε από αυτά ο ορότυπος O157:H7 (Makino et al, 2000).

Τέλος, η *E.coli* O157:H7 έχει απομονωθεί και από άλογα (Morris et al, 1987), γάτες (Abaas et al, 1989), σκύλους (Hammermueller et al, 1995), αλλά και από μύγες οι οποίες μάλιστα ενοχοποιήθηκαν για τη μετάδοση του βακτηρίου σε τρόφιμα, με αποτέλεσμα την εκδήλωση επιδημίας σε μαθητές σχολείου στην Ιαπωνία (Kobayashi et al, 1999). Μάλιστα έρευνα που έγινε στη χώρα αυτή από τους Sasaki et al (2000),



απέδειξε ότι μύγες του γένους *Musca domestica* μπορούν να αποβάλλουν την *E.coli* O157:H7 και να τη διασπείρουν σε τρόφιμα για τουλάχιστον 24 ώρες.

Από τα παραπάνω στοιχεία γίνεται κατανοητό ότι η *E.coli* O157:H7, όπως και όλα τα στελέχη της *E.coli*, είναι ευρέως διαδεδομένη στη φύση. Προσωρινά, το βακτήριο αποτελεί μέρος της μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου ανθρώπων, ζώων και πουλιών. Από εκεί αποβάλλεται και μολύνει το περιβάλλον και συγκεκριμένα τα επιφανειακά νερά, όπου μπορεί να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα και ιδιαίτερα στους χειμερινούς μήνες κατά τους οποίους σπανίως βρίσκεται στο έντερο των ζώων.

Σαφής είναι και η εποχική διακύμανση της διασποράς του βακτηρίου, με μέγιστη αποβολή του με τα κόπρανα κατά τη διάρκεια των μηνών Ιουνίου μέχρι Σεπτεμβρίου. Αυτό ίσως να οφείλεται στις διαφορετικές συνθήκες διαβίωσης και διατροφής των ζώων κατά τη διάρκεια του χρόνου, καθώς και στις κλιματολογικές συνθήκες κάθε εποχής, που επηρεάζουν την επιβίωση της *E.coli* O157:H7 στο περιβάλλον. Η εποχική διακύμανση της απομόνωσης του βακτηρίου από τα ζώα, είναι αντίστοιχη εκείνης των επιδημιών σε ανθρώπους που οφείλονται στο ίδιο αίτιο.

2. ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ

Η μετάδοση της *E.coli* O157:H7 είναι κατά κύριο λόγο τροφιμογενής (σε ποσοστό 67%), μπορεί όμως να μεταδοθεί και από άτομο σε άτομο (σε ποσοστό 22%), ενώ σπανιότερα είναι υδατογενής από νερά λιμνών (8%) και από μη χλωριωμένα πόσιμα νερά (2%) (Griffin, 1998). Πρόσφατα, αναφέρεται ολοένα και συχνότερα η απευθείας μετάδοση κατόπιν επαφής με μολυσμένα ασυμπτωματικά ζώα, γεγονός που αποδεικνύει ότι πρόκειται για αναδυόμενη ζωνόσο (Renwick et al, 1994, Chalmers et al, 1997).



2.1. Τροφιμογενής μετάδοση

Η *E.coli* O157:H7 αποτελεί τις δύο τελευταίες δεκαετίες ένα από τα σημαντικότερα αίτια τροφιμογενών λοιμώξεων παγκοσμίως. Μεταδίδεται κυρίως με τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης και σπανιότερα με τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης. Από την πρώτη κατηγορία ενοχοποιούνται κυρίως το μοσχαρίσιο κρέας και τα προϊόντα που παράγονται από αυτό (Riley et al, 1983, Ryan et al, 1986, Ostroff et al, 1990, Pavia et al, 1990, Belongia et al, 1991, Bell et al, 1994, Willshaw et al, 1994, Roberts et al, 1995, Rodrigue et al, 1995) και το μη παστεριωμένο γάλα αγελάδας (Duncan et al, 1987, Keene et al, 1997α). Η μόλυνση του αγελαδινού γάλακτος συμβαίνει κατά τη διάρκεια της άμελης, όταν δεν τηρούνται οι απαραίτητες συνθήκες υγιεινής (Mechie et al, 1997). Επίσης, έχουν ενοχοποιηθεί για πρόκληση επιδημιών ή σποραδικών κρουσμάτων το ρολό γαλοπούλας (Salmon et al, 1989), το γιαούρτι (Morgan et al, 1993), το σαλάμι (Center for Disease Control and Prevention, 1995), το γίδινο γάλα και τυρί (Deschenes et al, 1996, Bielaszewska et al, 1997, McIntyre et al, 2002), τα λουκάνικα (WHO Surveillance Programme, 1996), το κρέας ελαφιού (Keene et al, 1997β) και τα σάντουιτς κρεατικών (McDonnell, 1997).

Από τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης έχουν συσχετιστεί με λοιμώξεις εξαιτίας της *E.coli* O157:H7 πατάτες (Morgan et al, 1988) και μαρούλια (Mermin et al, 1997) μολυσμένα με κόπρανα ζώων-φορέων, μηλίτης οίνος (Besser et al, 1993, Canada Community Disease Report, 1999, Hilborn et al, 2000) και μη παστεριωμένος χυμός μήλου (Center for Disease Control and Prevention, 1996).

Θα πρέπει ωστόσο να αναφερθεί ότι για τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης πιθανολογείται και η επιμόλυνσή τους-μετά την επεξεργασία τους-με μολυσμένο



μοσχαρίσιο κρέας ή απαστερίωτο γάλα, λόγω κακών χειρισμών (κοινά εργαλεία κοπής και σκεύη κουζίνας).

2.2. Μετάδοση από άτομο σε άτομο

Αναφέρονται περιστατικά που αφορούν σε μέλη της ίδιας οικογένειας, στην οποία ένα μέλος νόσησε εξαιτίας κατανάλωσης μολυσμένου τροφίμου, αλλά κάποια μέλη τα οποία δεν ανέφεραν κατανάλωση του συγκεκριμένου ύποπτου τροφίμου επίσης εμφάνισαν νόσο από *E.coli* O157:H7. Ακόμη, έχει αναφερθεί μετάδοση της νόσου σε νοσηλευτικό προσωπικό που ερχόταν σε επαφή με ασθενείς (Karmali et al, 1988), καθώς και σε προσωπικό βρεφονηπιακών σταθμών (Spika et al, 1986, Belongia et al, 1993).

Η μετάδοση από άτομο σε άτομο είναι πάντα δευτερογενής, ακολουθεί δηλαδή την τροφιμογενή ή την υδατογενή μετάδοση και πραγματοποιείται μέσω της πρωκτοστοματικής οδού.

2.3. Υδατογενής μετάδοση

Η υδατογενής μετάδοση μπορεί να προκληθεί είτε με την κολύμβηση σε μολυσμένα νερά κυρίως λιμνών, είτε με την κατανάλωση πόσιμου μη χλωριωμένου νερού. Η μόλυνση με *E.coli* O157:H7 των επιφανειακών υδάτων (λιμνών, ποταμών) οφείλεται σε απόρριψη ανθρώπινων ή ζωικών αποβλήτων σε αυτές τις υδατοσυλλογές. Πειράματα σχετικά με την επιβίωση της *E.coli* O157:H7 στο υδάτινο περιβάλλον έδειξαν ότι μπορεί να επιζήσει στο νερό για 35 ημέρες στους 5-20°C (Swerdlow et al, 1992). Από το 1994 έχουν αναφερθεί τέσσερις τουλάχιστον μεγάλες υδατογενείς επιδημίες από *E.coli* O157:H7 σε άτομα που κολυμπούσαν σε



μολυσμένα νερά (Keene et al, 1994, Brewster et al, 1994, Ackman et al, 1997, Paunio et al, 1999).

Επιδημίες όμως έχουν αναφερθεί και από την κατανάλωση μη χλωριωμένου πόσιμου νερού, τόσο σε αναπτυσσόμενες χώρες της Αφρικής (Isaacson et al, 1993), όσο και σε αναπτυγμένες χώρες, όπως οι Η.Π.Α., όπου η μόλυνση προκλήθηκε σε άτομα που κατανάλωναν μη χλωριωμένο νερό από μικρές δεξαμενές (Dev et al, 1991, Olsen et al, 2002).

Ωστόσο την τελευταία δεκαετία, ολοένα και πιο συχνά αναφέρονται περιστατικά μόλυνσης ανθρώπων μετά από άμεση επαφή τους με ζώα-φορείς του βακτηρίου ή με τα κόπρανά τους, αποδεικνύοντας ότι πρόκειται για μια άμεσα μεταδιδόμενη ζωοανθρωπονόσο. Η πρώτη βιβλιογραφική αναφορά για περιστατικό μόλυνσης ανθρώπου μετά από άμεση επαφή με ζώα-φορείς της *E.coli* O157:H7 έγινε στον Καναδά το 1992, όταν ένα παιδί νόσησε από το βακτήριο μετά από επαφή με μοσχάρια-φορείς (Renwick et al, 1994). Το 1997 επίσης, ένας ιδιοκτήτης αλόγων στη Βρετανία μολύνθηκε από *E.coli* O157:H7 μετά από άμεση επαφή με άλογο-φορέα του βακτηρίου (Chalmers et al, 1997). Τέλος, έχουν αναφερθεί και περιστατικά μετάδοσης του μικροβίου σε άτομα που ήρθαν σε άμεση επαφή με ζώα-φορείς του βακτηρίου, μετά από επίσκεψή τους σε φάρμες εκτροφής αυτών των ζώων (CDRWeekly, 1997, CDRWeekly, 1999α).

Όσον αφορά στη μετάδοση της *E.coli* O157:H7 στα σποραδικά περιστατικά της νόσου, τις περισσότερες φορές είναι δύσκολο να προσδιοριστεί ο αιτιολογικός παράγοντας (Pai et al, 1984, Le Saux et al, 1993).

Γενικά, η εξακρίβωση του αιτίου που προκαλεί τη νόσο είναι τις περισσότερες φορές δύσκολη, δεδομένου ότι από τη μόλυνση ως την εμφάνιση των συμπτωμάτων



μεσολαβούν κάποιες μέρες, κατά τη διάρκεια των οποίων το υπεύθυνο τρόφιμο έχει πιθανόν καταναλωθεί ή έχει απορριφθεί.

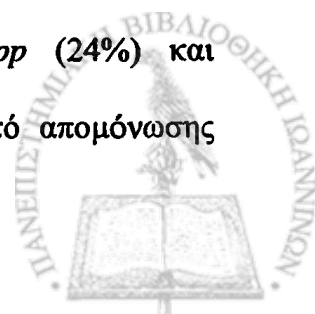
3. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ

Η *E.coli* O157:H7 αποτελεί το τρίτο κατά σειρά συχνότητας εντερικό βακτηριακό παθογόνο του ανθρώπου, με συχνότητα 0,6%, μετά το *Campylobacter* (3,6%) και τη *Salmonella* (1,5%), ενώ η *Shigella* έχει χαμηλότερη συχνότητα ανεύρεσης σε εντερικές λοιμώξεις (0,5%), όπως προέκυψε από την εξέταση 4539 δειγμάτων κοπράνων ασθενών με διάρροια στις Η.Π.Α. (McDonald et al, 1988).

Στον Καναδά η συχνότητα απομόνωσης της *E.coli* O157:H7 ως εντερικό παθογόνο φαίνεται να είναι μεγαλύτερη (2,4%) και έρχεται δεύτερη κατά σειρά μετά τη *Salmonella* (Pai et al, 1988), ενώ στη Βρετανία ακολουθεί σε συχνότητα το *Campylobacter*, έχοντας συχνότητα απομόνωσης 1,9% (Gransden et al, 1986). Και στις δύο αυτές έρευνες η συχνότητα απομόνωσης της *E.coli* O157:H7 από ασθενείς με διάρροια, ξεπερνά κατά πολύ τα γνωστά εντερικά παθογόνα, *Shigella*, *Yersinia* και *Aeromonas*.

Στις Η.Π.Α., σε νεότερη έρευνα εξετάστηκαν 1985 δείγματα κοπράνων ασθενών από 73 Νοσοκομεία και απομονώθηκε η *E.coli* O157:H7 σε ποσοστό 0,1% (Fischer et al, 1996).

Στην Ιαπωνία, καλλιεργήθηκαν 1707 δείγματα κοπράνων από ασθενείς με διάρροια. Περίπου στο 40% των ασθενών απομονώθηκαν βακτήρια, από τα οποία απομονώθηκε *Campylobacter* σε ποσοστό 40%, *Salmonella spp* (24%) και εντεροπαθογόνα στελέχη της *E.coli* (23%). Αντιθέτως, το ποσοστό απομόνωσης



στελεχών *Vibrio spp*, καθώς και εντεροαιμορραγικών στελεχών της *E.coli* ήταν πολύ χαμηλό (Nashimatsu et al, 1997).

Στο Βέλγιο, αντίστοιχη έρευνα σε 17.296 δείγματα κοπράνων ασθενών με διάρροια, έδειξε λοίμωξη από *E.coli* O157:H7 σε ποσοστό 1,17% των ασθενών (Pierard et al, 1997).

Στις Η.Π.Α., εξετάστηκαν 30.463 δείγματα κοπράνων ασθενών με διάρροια και απομονώθηκε *E.coli* O157:H7 σε ποσοστό 0,39% (Slutsker et al, 1997).

Στις Η.Π.Α., επίσης, σε έρευνα που έγινε σε 873 ασθενείς με διάρροια, βρέθηκε ότι 549 ασθενείς εμφάνισαν αιμορραγικά κόπρανα. Στους 168 από αυτούς, ποσοστό περίπου 30,6%, η διάρροια οφειλόταν σε εντεροπαθογόνα βακτήρια και συγκεκριμένα σε *Shigella* (15,3%), *Campylobacter* (6,2%), *Salmonella* (5,8%) και μόνο 2,6% οφειλόταν σε εντεροαιμορραγικά στελέχη της *E.coli* με πιο συχνό αίτιό τον ορότυπο O157 (Talan et al, 2001).

Στη Φινλανδία, εξετάστηκαν 695 δείγματα κοπράνων ασθενών (603 διαρροϊκά και 92 μη διαρροϊκά). Από τα διαρροϊκά κόπρανα απομονώθηκαν *Campylobacter* (3,8%), εντεροπαθογόνα στελέχη *E.coli* (3,2%), *Salmonella enteritidis* (2%), εντεροαιμορραγικά στελέχη *E.coli* (1,3%), εντεροπροσκολλητικά στελέχη *E.coli* (1%), *Yersinia enterocolitica* (0,8%), *E.coli* O157:H7 (0,5%) και *Aeromonas* (0,2%). Η *E.coli* O157:H7 απομονώθηκε και από τα μη διαρροϊκά κόπρανα σε ποσοστό περίπου 1% (Keshimaki et al, 2001).

Στην Ελλάδα τέλος, κατά την πενταετία 1997-2001, εξετάστηκαν 3040 δείγματα κοπράνων ασθενών με οξεία εντερίτιδα. Απομονώθηκαν 270 βακτηριακά στελέχη και συγκεκριμένα, *Salmonella* (73,7%), *Shigella* (10,37%), *Campylobacter* (9,63%), *Aeromonas* (4,07%), *Yersinia enterocolitica* (2,2%), ενώ δεν απομονώθηκε κανένα στέλεχος *E.coli* O157:H7 (Χήτα και συν., 2002).



Γενικά εκτιμάται ότι περίπου το 0,6-2,4% των ασθενών με διάρροια (Cahoon και Thomson, 1987), καθώς και το 15-36% των ασθενών με αιματηρή διάρροια ή αιμορραγική κολίτιδα (Pai et al, 1984, Remis et al, 1984, Ratnam και March, 1986, Smith et al, 1987), οφείλονται στην *E.coli* O157:H7.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει έρευνα των Armstrong et al (1996) σύμφωνα με την οποία υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο νοσούν από *E.coli* O157:H7 περίπου 20.000 άνθρωποι παγκοσμίως, από τους οποίους περίπου 250 πεθαίνουν.

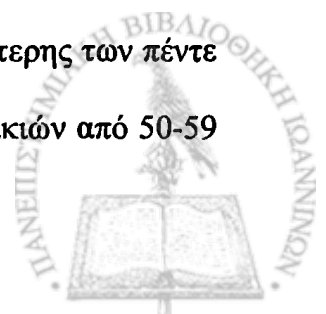
Στον Καναδά, τα περιστατικά λοίμωξης ατόμων από την *E.coli* O157:H7 κυμαίνονται από 3 ως 5,3 ανά 100.000 άτομα (Division of Disease Surveillance, 1997).

Στην Αργεντινή, αναφέρονται 22 περιστατικά αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου ανά 100.000 άτομα το χρόνο σε παιδιά ηλικίας κάτω των 4 ετών (Novillo et al, 1988, Lopez et al, 1989).

Στην Ευρώπη, την υψηλότερη συχνότητα φαίνεται να παρουσιάζει η Σκωτία (4 περιστατικά ανά 100.000 άτομα) και την μικρότερη η Γερμανία με 1 ανά 100.000 άτομα και η Ιταλία με 0,2 ανά 100.000 άτομα (Karch, 1994). Στην Ελλάδα, το ποσοστό είναι σχεδόν μηδενικό, δεδομένου ότι μόνο τέσσερα περιστατικά ατόμων που νόσησαν από την *E.coli* O157:H7 έχουν αναφερθεί από το 1986 έως σήμερα (Κανσουζίδου, 2001).

Τέλος, στη Βρετανία νοσούν από *E.coli* O157:H7 περίπου 1,28-2,1/ 100.000/έτος, από τα οποία το 5-11% είναι ταξιδιώτες που έχουν επισκεφτεί ξένες χώρες, ανάμεσα στις οποίες αναφέρεται και η Ελλάδα (Willshaw et al, 2001).

Όσον αφορά στη συχνότητα εμφάνισης νόσου από *E.coli* O157:H7 με βάση την ηλικία, φαίνεται, ότι συχνότερα προσβάλλει παιδιά ηλικίας μικρότερης των πέντε ετών (6,1 περιστατικά ανά 100.000 άτομα) και σπανιότερα άτομα ηλικιών από 50-59



ετών (0,5 περιστατικά ανά 100.000 άτομα) (Ostroff et al, 1989). Οι ίδιοι ερευνητές επισημαίνουν την εποχική διακύμανση της νόσου και ότι το 60% των λοιμώξεων που προκαλούνται από *E.coli* O157:H7 και το 73% των περιστατικών αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου και θρομβωτικής θρομβοπενικής πορφύρας, συμβαίνουν μεταξύ Ιουνίου και Σεπτεμβρίου.

Επίσης, αντίστοιχη έρευνα των Thomas et al (1993), συμφωνεί με την εποχική διακύμανση που αναφέρουν οι Ostroff et al (1989) και επιβεβαιώνει το γεγονός, ότι το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής εμφανίζεται σε παιδιά και των δύο φύλων και ηλικίας 1-4 ετών (3,3 περιστατικά ανά 100.000 άτομα). Για τις ηλικίες άνω των 5 ετών, το ποσοστό μειώνεται σημαντικά, με κατώτερο ποσοστό για τους άνδρες ηλικίας 35-44 ετών (0,18/100.000) και τις γυναίκες 25-34 ετών (0,40/100.000). Το ποσοστό εμφάνισης νόσου αυξάνεται και πάλι στα άτομα ηλικιών από 85 έτη και πάνω (0,63/100.000 για τους άνδρες και 1,12/100.000 για τις γυναίκες). Για τα παιδιά κάτω του έτους, το ποσοστό είναι ελαφρά υψηλότερο στα αγόρια (2/100.000/έτος) από ό,τι στα κορίτσια (1,5/100.000/έτος). Λίγο υψηλότερη είναι η συχνότητα εμφάνισης στα αγόρια και στις ηλικίες από 5-14 έτη, αλλά στις μεγαλύτερες ηλικίες οι γυναίκες εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής από την *E.coli* O157:H7 και ιδιαίτερα σε ηλικίες μεγαλύτερες των 35 ετών, όπου το ποσοστό προσβολής τους είναι σχεδόν διπλάσιο από αυτό των ανδρών (Thomas et al, 1993).

Γενικά υπολογίζεται, ότι σε 139 συνολικά επιδημίες που έχουν αναφερθεί στις Η.Π.Α. από το 1982 έως το 1996 εξαιτίας της *E.coli* O157:H7, νόσησαν περίπου 3.000 άτομα, από τα οποία 22% νοσηλεύτηκαν σε νοσοκομείο, 6% εμφάνισαν αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο ή θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα και 0,6% πέθαναν (Griffin, 1998).



Το ποσοστό των ασθενών που εισάγονται σε νοσοκομεία μετά από λοίμωξη με *E.coli* O157:H7, σύμφωνα με την έρευνα των Slutsker et al το 1997, ανέρχεται σε 47,1%.

Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί, ότι περίπου το 78-88% των περιστατικών λοίμωξης από *E.coli* O157:H7 δεν δηλώνεται στις υγειονομικές αρχές παγκοσμίως και δεν καταγράφεται. Εκτιμάται δηλαδή, ότι σε κάθε περιστατικό που καταγράφεται αντιστοιχούν τέσσερα έως οκτώ περιστατικά στα οποία οι ασθενείς, είτε είναι ασυμπτωματικοί ή με ελαφρά συμπτώματα και δεν αναζητούν ιατρική περίθαλψη, είτε έχουν συμπτώματα αλλά για διάφορους λόγους τα περιστατικά αυτά δεν καταγράφονται (Michel et al, 2000). Το γεγονός αυτό αυξάνει κατά πολύ τον αριθμό των ατόμων που νοσούν από την *E.coli* O157:H7.

4. ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ ΠΟΥ ΟΦΕΙΛΟΝΤΑΝ ΣΤΗΝ *E. COLI* O157:H7

Οι κυριότερες επιδημίες εξαιτίας της *E.coli* O157:H7 από το 1982 έως σήμερα, καταγράφονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 3. Κυριότερες επιδημίες που οφείλονταν στην *E.coli* O157:H7

Έτος	Τόπος	Αρ.ασθενών	Πηγή μόλυνσης	Βιβλ.Αναφορά
1982	Oregon-Η.Π.Α.	26	Χάμπουργκερς	Riley et al, 1983
1982	Michigan-Η.Π.Α.	21	Χάμπουργκερς	Riley et al, 1983
1984	Η.Π.Α	37	Άγνωστο	Spika et al, 1986

1985	E.Anglia- Βρετανία	24-ένας θάνατος	Πατάτες με χώμα	Morgan et al, 1988
1986	Ontario-Καναδάς	60	Απαστερίωτο γάλα	Borczyk et al, 1987
1987	Birmingham- Βρετανία	26	Σάντουιτς γαλοπούλας	Salmon et al, 1989
1988	Wisconsin-Η.Π.Α	61	Μοσχαρίσιο κρέας	Rodrigue et al, 1995
1988	Minnesota-Η.Π.Α.	32	Μπιφτέκια	Belongia et al, 1991
1988	Minnesota-Η.Π.Α.	68	Άγνωστο, από άτομο σε άτομο(δευτερ.)	Belongia et al, 1993
1990	N.Dakota-Η.Π.Α.	70	Μοσχαρίσιο κρέας	MMWR, 1991
1990	Grampian- Βρετανία	4	Πόσιμο νερό	Dev et al, 1991
1991	Preston-Βρετανία	20	Χάμπουργκερς	CDR, 1991
1991	Oregon-Η.Π.Α.	21	Νερό λίμνης	Keene et al, 1994
1991	Βρετανία	16	Γιαούρτι	Morgan et al, 1993
1991	Masachusetts- ΗΠΑ	18	Μηλίτης οίνος	Besser et al, 1993
1992	N.Αφρική	>100	Υδατογενής	Isaacson et al, 1993
1992	Oregon-ΗΠΑ	16	Αγελαδινό γάλα	Keene et al, 1997β
1992	Σκωτία	6	Νερό	Brewster et al, 1994



			κολύμβησης	
1992	Lothian-Βρετανία	16	Τροφιμογενής	Marsh et al, 1992
1993	Dutchess-ΗΠΑ	12	Νερό λίμνης	Ackman et al, 1997
1993	Washington-ΗΠΑ	230	Μοσχ. κρέας	MMWR, 1993
1993	Λονδίνο- Βρετανία	6-ένας θάνατος	Νερό λίμνης	Hildebrand et al, 1996
1993	Ουαλλία	8	Μοσχαρίσια μπιφτέκια	Willshaw et al, 1994
1993	Connecticut-ΗΠΑ	5	Χάμπουργκερ	Roberts et al, 1995
1993	ΗΠΑ	700-4 θάνατοι	Χάμπουργκερ	Griffin et al, 1994
1995	Βοημία-Τσεχία	4	Γίδινο γάλα	Bielaszewska, 1997
1995	Ontario-Καναδάς	21	Μαρούλι	Can Com Dis Rep, 1997
1995	Ν.Αγγλία	26	Σάντουιτς κρεατικών	McDonnell, 1997
1995	Βρετανία	14	Προμαγειρευμέ νο κρέας	Stevenson et al, 1996
1996	Κυото-Ιαπωνία	47-ένας θάνατος	Ρίζες λαχανικού	Watanabe et al, 1999
1996	Sakai-Ιαπωνία	6561-3 θάνατοι	Τροφιμογενής	Wkly Epid Rec, 1996
1996	ΗΠΑ	66-1 θάνατος	Μηλίτης οίνος	MMWR, 1997
1997	Κανάρια-Ισπανία	14	Νερό δεξαμενής	Pebody et al, 1999
1997	Φινλανδία	14	Νερό λίμνης	Paunio et al, 1999.

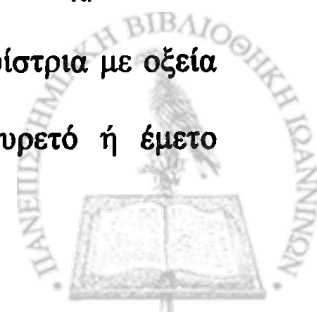
1997	Hertforshire- Βρετανία	3	Άμεση επαφή με γίδες	CDR, 1997α
1997	Somerset- Βρετανία	8	Άμεση επαφή με λάσπη	CDR, 1997α
1997	Virginia-ΗΠΑ	108	Βλαστοί alfalfa	MMWR, 1997β
1997	Λας Βέγκας-ΗΠΑ	58	Χάμπουργκερς	Cieslak et al, 1997
1997- 1998	Καμερούν	298-16,4% ποσοστό θανάτων	Άγνωστο-από άτομο σε άτομο(δευτερ.)	Cunin et al, 1999
1998	Dorset-Βρετανία	10	Άγνωστο	CDR, 1998α
1998	W.Sussex- Βρετανία	7	Κρέμα γάλακτος	CDR, 1998β
1998	Wyoming-ΗΠΑ	157	Μη χλωριωμένο πόσιμο νερό	Olsen et al, 2002
1998	Ontario-Καναδάς	10	Μηλίτης οίνος	Can Com Dis Rep, 1999
1998	Wisconsin-ΗΠΑ	55	Φρέσκο τυρί	MMWR, 2000
1999	E.Sussex- Βρετανία	7	Μοσχαρίσιο κρέας	CDR, 1999γ
1999	N.Cumbria- Βρετανία	60	Απαστερίωτο γάλα	CDR, 1999δ
1999	Βρετανία	3	Απαστερίωτο τυρί	CDR, 1999ε
1999	N.Wales- Βρετανία	8	Επαφή με ζώα	CDR, 1999α

1999	Βρετανία	19 τρόφιμοι φυλακής	Άγνωστο	CDR, 1999β
1999	S.Devon- Βρετανία	4-ένας θάνατος	Μολυσμένο χώμα παραλίας	CDR, 1999στ
1999	Allerdale- Βρετανία	111	Γάλα	CDR, 1999στ
2000	Βρετανία	4	Απαστερίωτο γάλα	CDR, 2000α
2000	Βρετανία	37	Πιθανά τροφιμογενής	CDR, 2000β
2001	Vancouver- Καναδάς	5	Γίδινο γάλα	McIntyre et al, 2002

5. Η *E. COLI* O157:H7 ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

5.1. Στελέχη της *E.coli* O157:H7 που έχουν απομονωθεί από ανθρώπους

Στην Ελλάδα η *E.coli* O157:H7 αναζητείται από το 1986 σε κόπρανα ασθενών με διάρροια, και ιδίως στα περιστατικά της αιμορραγικής κολίτιδας, στο Νοσοκομείο Ειδικών Παθήσεων Θεσσαλονίκης (ΝΕΠΘ), όπου βρίσκεται και το Ελληνικό Κέντρο Αναφοράς για την *E.coli* O157. Μέχρι το 1998 στο ΝΕΠΘ εξετάστηκαν πάνω από 23.000 δείγματα κοπράνων από ασθενείς με γαστρεντερίτιδα. *E.coli* O157:H7 απομονώθηκε από ένα βρέφος ηλικίας εννέα μηνών το οποίο εμφάνιζε ήπια, βλενώδη και όχι αιμορραγική διάρροια, στο οποίο συνυπήρχε ταυτόχρονα και μόλυνση από ροταϊό, καθώς και από μια 23χρονη Αμερικανίδα τουρίστρια με οξεία υδαρή διάρροια, με λευκοκύτταρα στα κόπρανα, αλλά χωρίς πυρετό ή έμετο



(Kansouzidou et al, 1998). Τέλος, απομονώθηκαν άλλα δύο στελέχη του βακτηρίου στο Νοσοκομείο Χατζηκώστα των Ιωαννίνων (Κανσουζίδου, 2001).

Παρόμοια έρευνα πραγματοποιήθηκε και στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά την πενταετία 1997-2001. Στην έρευνα εξετάστηκαν 3040 δείγματα κοπράνων ασθενών με εντερίτιδα, από τα οποία απομονώθηκαν 270 βακτηριακά στελέχη, κανένα όμως της *E.coli* O157:H7 (Χήτα και συν., 2002).

Τέλος, η *E.coli* O157:H7 αναζητήθηκε μαζί με άλλα συνήθη εντερικά παθογόνα στο προσωπικό και στο περιβάλλον του μαγειρίου ενός νοσοκομείου, αλλά και εκεί δεν απομονώθηκε το βακτήριο (Αμπραχίμ και συν., 1997).

Πίνακας 4. Στελέχη *E.coli* O157:H7 που έχουν απομονωθεί από ανθρώπους στην Ελλάδα κατά τα έτη 1986-2000

Έτος	Προέλευση	Ανιχνευτής DNA για VT genes	Ορότυπος	Φαγότυπος
1989	Κορίτσι 9 μηνών (Νοσοκ. Παιδών Αγλαΐα Κυριακού)	Θετικό	O157	8
1998	Νοσοκ. Χατζηκώστα Ιωαννίνων	Θετικό	O157	RDNC*
1998	Αμερικανίδα τουρίστρια 23 ετών (ΝΕΠΘ)	Θετικό	O157	14
1999	Νοσοκ. Χατζηκώστα Ιωαννίνων	Θετικό	O157	8

*Reaction does not conform to standard patterns



5.2. Στελέχη της *E.coli* O157:H7 που έχουν απομονωθεί από ζώα

Εκτός από τους ασθενείς, στο Νοσοκομείο Ειδικών Παθήσεων Θεσσαλονίκης (ΝΕΠΘ) το βακτήριο αναζητήθηκε και σε δείγματα κοπράνων ζώων. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν με τη μέθοδο της κλασικής καλλιέργειας 47 δείγματα κοπράνων από μοσχάρια, 100 από αγελάδες και 40 από κοτόπουλα. Κατά την έρευνα αυτή δεν απομονώθηκε κανένα στέλεχος της *E.coli* O157:H7 (Κανσουζίδου και συν., 1994).

Πρόσφατα, στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων απομονώθηκε ένα στέλεχος της *E.coli* O157:H7 από κόπρανα αίγας. Το στέλεχος αυτό ανήκει στο φαγότυπο 14 και είναι MUG-θετικό, μια ιδιαίτερα σπάνια βιοχημική ιδιότητα. Πρόκειται για την πρώτη απομόνωση της *E.coli* O157:H7 από ζώο στη χώρα μας (Dontorou et al, 2001).

5.3. Στελέχη της *E.coli* O157:H7 που έχουν απομονωθεί από τρόφιμα και νερά

Η *E.coli* O157:H7 αναζητήθηκε από τους Κανσουζίδου και συν. (1994) και σε δείγματα τροφίμων και πιο συγκεκριμένα σε 70 δείγματα νωπού και 17 δείγματα καταψυγμένου μοσχαρίσιου κιμά. Κανένα στέλεχος του βακτηρίου δεν απομονώθηκε.

Τέλος, το βακτήριο αναζητήθηκε στη χώρα μας και σε δείγματα νερών. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν 1267 δείγματα από πόσιμα και τρεχούμενα νερά, αλλά και πάλι τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά (Argvanitidou et al, 1996).



Ε. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η παθογένεια των εντεροαιμορραγικών στελεχών της *E.coli*, και κατά συνέπεια και της *E.coli* O157:H7, βασίζεται στη δημιουργία των χαρακτηριστικών αλλοιώσεων του εντερικού σωλήνα που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία ως «attaching and effacing (A/E) αλλοιώσεις» (Tzipori et al, 1986).

Μετά την είσοδο του βακτηρίου στον εντερικό σωλήνα, ακολουθεί αποικισμός στο εντερικό επιθήλιο και προσκόλλησή του σ' αυτό. Η προσκόλληση αυτή γίνεται με τη βοήθεια της ιντιμίνης, μιας πρωτεΐνης μεγέθους 94-97 KDa, η οποία παράγεται από την *E.coli* O157:H7 και κωδικοποιείται χρωμοσωμικά από το *eae* γονίδιο (Jerse et al, 1990). Ο υποδοχέας της ιντιμίνης στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα δεν είναι ακόμη σαφώς διευκρινισμένος. Φαίνεται όμως, ότι το ρόλο αυτό παίζει μια πρωτεΐνη 90 KDa η οποία ονομάζεται Tir (translocated intimin receptor) και που παράγεται επίσης από το βακτήριο. Παράλληλα και άλλοι παράγοντες είναι υπεύθυνοι για τη δέσμευση του μικροβίου στο κύτταρο του ξενιστή, όπως κάποια ινίδια που κωδικοποιούνται πλασμιδιακά από πλασμίδιο μεγέθους 60 MDa (Karch et al, 1987).

Κατά τον αποικισμό του εντερικού επιθηλίου από την *E.coli* O157:H7 προκαλείται καταστροφή των μικρολαχνών και άμεση επαφή του βακτηρίου με τη μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων. Κάτω από το σημείο επαφής βακτηρίου και εντερικού επιθηλίου πραγματοποιούνται διάφορες μεταβολές στα κύτταρα του ξενιστή, όπως η αύξηση του επιπέδου του ενδοκυτταρικού ασβεστίου (Ca^{2+}), το οποίο φαίνεται ότι είναι υπεύθυνο για τη συσώρευση πολυμερισμένης ακτίνης (βασικό συστατικό του πυρήνα των μικρολαχνών), που οδηγεί στην καταστροφή των μικρολαχνών του εντέρου (Knutton et al, 1989). Ταυτόχρονα, αύξηση του



ενδοκυτταρικού ασβεστίου οδηγεί σε αναστολή της απορρόφησης ιόντων νατρίου και χλωρίου, με αποτέλεσμα διαταραχές της διαπερατότητας του εντερικού επιθηλίου και πρόκληση διάρροιας.

Όσον αφορά στην πρόκληση αιμορραγικής διάρροιας από την *E.coli* O157:H7, σημαντικό ρόλο παίζουν οι τοξίνες του βακτηρίου. Ο μηχανισμός δράσης της προκαλούμενης από τις τοξίνες διάρροιας, δεν είναι σαφώς διευκρινισμένος, ωστόσο η εντεροτοξική τους δράση είναι ήδη γνωστή από το 1972, όπως αναφέρουν οι Keusch et al, μελετώντας τον τρόπο δράσης της τοξίνης της *Shigella dysenteriae* τύπος I, με την οποία ανήκουν στην ίδια ομάδα (Shiga τοξίνες).

Οι αλλοιώσεις του εντερικού σωλήνα εντοπίζονται αρχικά στο τυφλό και στο ανιόν κόλον (Riley et al, 1983). Οι τοξίνες παράγονται και απελευθερώνονται στα κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου, γεγονός που αποδεικνύεται από την εύρεση ανιχνεύσιμων ποσοτήτων τοξινών στα κόπρανα ασθενών (Karmali, 1989). Εκεί παρατηρείται οίδημα και αιμορραγία στον εντερικό βλεννογόνο, με αποτέλεσμα τη διάβρωσή του και το σχηματισμό ψευδομεμβρανών. Ταυτόχρονα, προκαλείται θρόμβωση των μικρών αιμοφόρων αγγείων που οδηγεί σε νέκρωση του εντερικού βλεννογόνου στα σημεία δράσης των τοξινών.

Στη δράση των Shiga τοξινών αποδίδεται η θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια, που μπορεί να εμφανιστεί μετά τη μόλυνση ανθρώπων με την *E.coli* O157:H7 σε όργανα όπως ο νεφρός και το κεντρικό νευρικό σύστημα, και συνεπάγεται την πρόκληση αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου και θρομβωτικής θρομβοπενικής πορφύρας αντίστοιχα. Παρότι η παραγωγή των τοξινών γίνεται στο έντερο, ωστόσο, αν και δεν έχει μέχρι σήμερα αποδειχτεί, θεωρείται σχεδόν βέβαιο ότι οι τοξίνες αυτές αποκτούν πρόσβαση στην κυκλοφορία του αίματος φθάνοντας έτσι στα όργανα-στόχους που βρίσκονται ανατομικά μακριά από τον εντερικό σωλήνα. Είναι



πιθανόν οι τοξίνες να δεσμεύονται επάνω στα ερυθρά αιμοσφαίρια του αίματος (Bitzan et al, 1994) ή σε άλλα έμμορφα συστατικά του αίματος, όπως στα Β λεμφοκύτταρα (Cohen et al, 1998), στα αιμοπετάλια (Yagi et al, 1997), στα μονοκύτταρα και πιθανόν στις λιποπρωτεΐνες (Lingwood, 1996).

Για την πρόκληση του αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου και της θρομβωτικής θρομβοπενικής πορφύρας δεν αρκεί μόνο η δράση των Shiga τοξινών, αλλά πρέπει να δράσουν και άλλοι παράγοντες, όπως οι βακτηριακοί λιποπολυσακχαρίτες και οι κυτοκίνες του ξενιστή (ιντερλευκίνη-1β και φλεγμονώδης νεκρωτικός παράγοντας α), σύμφωνα με τους Louise και Obrig (1991). Οι παράγοντες αυτοί φαίνεται να αυξάνουν την ευαισθησία των ενδοθηλιακών κυττάρων του νεφρικού σπειράματος (κύτταρα-στόχος στον ανθρώπινο νεφρό), ως προς τη δράση των τοξινών. Αυτό συμβαίνει επειδή οι παράγοντες αυτοί αυξάνουν την παραγωγή υποδοχέων Gb3 (Van de Kar et al, 1992).

Γενικά πιστεύεται ότι οι Shiga τοξίνες προκαλούν βλάβες στα ενδοθηλιακά κύτταρα του νεφρικού σπειράματος, αυξάνοντας έτσι την προσκόλληση αιμοπεταλίων στα τοιχώματα των αγγείων και κατά συνέπεια προκαλείται θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια.

Όσον αφορά στην παθογένεια της εγκεφαλοπάθειας, φαίνεται ότι και εδώ οι τοξίνες, επιδρώντας στα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου, προκαλούν βλάβες σ'αυτά, οδηγώντας έτσι σε λύση του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού και σε εγκεφαλικό οίδημα. Στη συνέχεια οι Shiga τοξίνες διαπερνούν τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό και προσβάλλουν τους νευρώνες (Fujii et al, 1994).



1. ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ, ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ SHIGA

ΤΟΞΙΝΩΝ

Η *E.coli* O157:H7 παράγει δύο είδη τοξινών, τις Vero τοξίνη 1 (VT1) και Vero τοξίνη 2 (VT2), οι οποίες ονομάστηκαν έτσι εξαιτίας της κυτταροτοξικής τους δράσης επάνω στα Vero κύτταρα. Οι τοξίνες αυτές παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με την τοξίνη της *Shigella dysenteriae* τύπος I και γι αυτό και ονομάστηκαν επίσης Shiga like τοξίνες (SLT1 και SLT2), καθώς και Shiga τοξίνες (Stx1 και Stx2), όπως επικρατεί να ονομάζονται σήμερα (Calderwood et al, 1996).

Οι τοξίνη Stx1 διαφέρει από την τοξίνη Stx της *Shigella dysenteriae* τύπος I σε ένα μόνο αμινοξύ. Μεταξύ των Stx2 τοξινών υπάρχει αντιγονική διαφοροποίηση με αποτέλεσμα την ύπαρξη υποτύπων, των Stx2, Stx2c, Stx2d και Stx2e (Perera, Marques και O'Brien, 1988).

Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των τοξινών Stx1 και Stx2 βρίσκονται σε βακτηριοφάγους (Brunton, 1990), σε αντίθεση με τις τοξίνες Stx και Stx2e που κωδικοποιούνται χρωμοσωμικά (O'Brien et al, 1992).

Οι Stx τοξίνες αποτελούνται από δύο πολυπεπίδια, το A (32 KDa) και το B (περίπου 7,7 KDa), σε αναλογία 1A:5B. Το B πολυπεπίδιο σχηματίζει ένα πενταμερές που είναι υπεύθυνο για τη σύνδεση της τοξίνης με τον γλυκολιπιδικό υποδοχέα του ευκαρυωτικού κυττάρου, ο οποίος είναι ο globotriaosylceramide (Gb₃) (Waddell et al, 1988). Το A πολυπεπίδιο, είναι υπεύθυνο για την ενζυματική δράση των τοξινών. Διασπώμενο από την τρυψίνη διαχωρίζεται σε A1 (περίπου 28 KDa) και A2 (4 KDa) πεπίδια. Το A2 πεπίδιο είναι υπεύθυνο για τη σύνδεση με το B πενταμερές, ενώ το A1 πεπίδιο μετά την είσοδό του στο κύτταρο-ξενιστή (επιθηλιακά κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου, αλλά και ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του νεφρού και του κεντρικού νευρικού συστήματος) κατευθύνεται στη



συσκευή Golgi και τελικά στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Εκεί, δρώντας σαν γλυκοϋδροχολάση, προκαλεί απόσπαση μιας βάσης αδενίνης κοντά στο 3' άκρο του 28S ριβοσωματικού RNA και αδρανοποίηση έτσι της 60S ριβοσωματικής μονάδας, που αφορά στην πρωτεϊνική σύνθεση, με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο (Endo et al, 1988, Sandvig et al, 1989).

Γενικά, περίπου το 75% των στελεχών της *E.coli* O157:H7 παράγουν μόνο την Stx2, 24% παράγουν και τις δύο τοξίνες και λιγότερο από το 1% παράγουν μόνο την τοξίνη Stx1 (Thomas et al, 1996).

2. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΣ ΔΟΣΗ

Η λοιμογόνος δόση της *E.coli* O157:H7 είναι πολύ μικρή. Σε επιδημία που εμφανίστηκε στις Η.Π.Α. το 1994 και προκλήθηκε από την κατανάλωση σαλαμιού, η λοιμογόνος δόση εκτιμήθηκε περίπου στα 50 βακτήρια (Tilden et al, 1996). Βασισμένοι στην παραπάνω επιδημία οι Samadpour et al (1994) ανέφεραν, ότι 2-45 βακτήρια είναι ικανά να προκαλέσουν νόσο.

Σε άλλη επιδημία στη Βρετανία, η οποία προκλήθηκε από την κατανάλωση μοσχαρίσιου κρέατος, 10 μόνο κύτταρα του βακτηρίου ήταν ικανά να προκαλέσουν νόσο (Willshaw et al, 1994).

ΣΤ. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

1. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Η περίοδος επώασης για τη νόσο από την *E.coli* O157:H7 υπολογίζεται σε τρεις έως τέσσερις ημέρες (Riley et al, 1983). Ωστόσο, από τη μελέτη διαφόρων



επιδημιών προκύπτουν και μεγαλύτερες περιόδοι επώασης, όπως 5,6 ημέρες (Karmali, 1989), 6,8 ημέρες σε μια επιδημία στον Καναδά (Duncan et al, 1987), ακόμη και οκτώ ημέρες σε επιδημία που συνέβη σε παιδικό σταθμό το 1984 (Ryan et al, 1986). Τέλος, έχουν αναφερθεί και περιόδοι επώασης πιο σύντομες, όπως δύο ημέρες σε επιδημία το 1987 (Salmon et al, 1989) ή 2,8 ημέρες σε επιδημία στις Η.Π.Α. το 1993 (Roberts et al, 1995).

Μόλυνση του ανθρώπου με *E.coli* O157:H7 μπορεί να προκαλέσει τέσσερις κλινικές εκδηλώσεις: απλή μη αιμορραγική διάρροια, αιμορραγική κολίτιδα, αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο και θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα.

1.1. Ασυμπτωματική μόλυνση ή μη αιμορραγική διάρροια

Περιστατικά ασυμπτωματικής μόλυνσης ατόμων με *E.coli* O157:H7 έχουν αναφερθεί σε κάποιες επιδημίες (Duncan et al, 1986, Ryan et al, 1986). Ωστόσο, το ποσοστό των ατόμων που εμφανίζουν ασυμπτωματική λοίμωξη είναι δύσκολο να προσδιοριστεί, καθώς τα άτομα αυτά σπανίως εξετάζονται εργαστηριακά.

Μη αιμορραγική διάρροια έχει επίσης αναφερθεί σε άτομα που μολύνθηκαν από το βακτήριο, χωρίς αυτή να εξελιχθεί σε αιμορραγική κολίτιδα (Pai et al, 1984, Remis et al, 1984, Carter et al, 1987, Ostroff et al, 1989, Belongia et al, 1991). Ο Tarr (1995), εκτιμά ότι περίπου 10% των κλινικά διαγνωσμένων περιστατικών μόλυνσης με *E.coli* O157:H7 εμφανίζονται με μη αιμορραγική διάρροια.

1.2. Αιμορραγική κολίτιδα

Ποσοστό περίπου 90-95% των ατόμων που μολύνονται με το μικρόβιο εκδηλώνει αιμορραγική διάρροια (Karmali 1989, Griffin και Tauxe 1991).



Τα πρώτα συμπτώματα που εμφανίζονται στους ασθενείς είναι έντονος κοιλιακός πόνος και υδαρής διάρροια (Karmali, 1989, Griffin και Tauke, 1991, Tang, 1995). Αυτά τα συμπτώματα διαρκούν για 24 ως 48 ώρες και στη συνέχεια ακολουθεί σοβαρότερη νόσος, με εκδήλωση εντονότερου κοιλιακού πόνου και αιμορραγικής διάρροιας. Πυρετός μπορεί να εμφανιστεί, αλλά δεν είναι το κυρίαρχο σύμπτωμα. Λιγότερο από το ένα τρίτο των ασθενών με αιμορραγική διάρροια εμφανίζουν χαμηλό πυρετό (Griffin και Tauke, 1991). Στις δύο πρώτες επιδημίες της *E. coli* O157:H7 στις Η.Π.Α. το 1982, μόνο το 7% από τους συνολικά 47 ασθενείς εμφάνισαν πυρετό πάνω από 38°C (Riley et al, 1983). Γενικά πυρετός μπορεί να εμφανιστεί σε ποσοστό 0-32% των ασθενών (Riley et al, 1983, Pai et al, 1984, Ryan et al, 1986, Spika et al, 1986, Carter et al, 1987, Belongia et al, 1991). Ναυτία και έμετος μπορεί να εκδηλωθούν σε ποσοστό 21-54% των ασθενών (Ryan et al, 1986, Bell et al, 1994).

Η αιμορραγική διάρροια αποτελεί το συχνότερο σύμπτωμα μετά από μόλυνση με *E. coli* O157:H7 και είναι αυτή που οδηγεί τους ασθενείς να αναζητήσουν ιατρική βοήθεια. Η διάρροια έχει διάρκεια από 3 έως 7,5 ημέρες, ενώ η αιμορραγική διάρροια διαρκεί από 2 έως 5 ημέρες (Carter et al, 1987, Griffin et al, 1988, Belongia et al, 1991).

Τα αιματολογικά ευρήματα περιλαμβάνουν λευκοκυττάρωση, με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων περίπου $13-14 \times 10^9/L$. Ο αιματοκρίτης των ασθενών δεν επηρεάζεται σημαντικά, παρά την απώλεια αίματος με τα κόπρανα. Επίσης, ο χρόνος προθρομβίνης, η συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών του ορού, ο χρόνος καθίζησης των ερυθροκυττάρων, καθώς και οι εξετάσεις ούρων των ασθενών είναι συνήθως φυσιολογικές (Riley et al, 1983, Ryan et al, 1986).



Η αιμορραγική κολίτιδα στις περισσότερες περιπτώσεις είναι αυτοϊούμενη. Ωστόσο, ποσοστό ασθενών από 13% (Belongia et al, 1991) έως 73% (Riley et al, 1983) νοσηλεύονται σε νοσοκομεία. Οι περισσότεροι από τους ασθενείς αυτούς θεραπεύονται χωρίς κάποια ειδική φαρμακευτική αγωγή σε μια εβδομάδα και χωρίς να εμφανίζουν επιπλοκές.

Αντίθετα, το 6-8% περίπου των ασθενών, και ιδίως παιδιά και ηλικιωμένοι, εμφανίζουν μια σοβαρότατη επιπλοκή, το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (Lior, 1988, Rowe et al, 1991). Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη και τους ασθενείς που δεν εμφανίζουν αιμορραγική διάρροια, μπορούμε να πούμε ότι συνολικά ποσοστό περίπου 2-7% των λοιμώξεων με *E.coli* O157:H7 εξελίσσονται σε αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (Griffin και Tauxe, 1991).

1.3. Αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο

Το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο περιγράφηκε για πρώτη φορά ως νοσολογική οντότητα από τον Ελβετό ερευνητή Gasser το 1955. Χαρακτηρίζεται από μια τριάδα συμπτωμάτων, την μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία, τη θρομβοκυτταροπενία και την οξεία νεφρική ανεπάρκεια και είναι πιο συχνό σε παιδιά ηλικίας κάτω των πέντε ετών. Αποτελεί το πιο κοινό αίτιο οξείας νεφρικής ανεπάρκειας σε παιδιά (Fong et al, 1982). Η θνητότητα σε αυτό το σοβαρότατο σύνδρομο κυμαίνεται στο 5-10% των ασθενών, ενώ περίπου το ένα τρίτο από αυτούς που επιζούν εμφανίζει κάποια χρόνια βλάβη (Karmali, 1989). Νεότερα δεδομένα αναφέρουν ότι μόνο το 5% των ασθενών εμφανίζει χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, ενώ το 75% αναρρώνει πλήρως (Robson, 2000).



Γενικά, το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο οφείλεται τόσο σε λοιμογόνους όσο και σε μη λοιμογόνους παράγοντες. Τα κυριότερα αίτια του αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5. Αιτιολογία του αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου (Neild, 1994)

Λοιμογόνοι παράγοντες	Μη λοιμογόνοι παράγοντες
Διαρροϊκά στελέχη <i>E.coli</i>	Ιδιοπαθής
<i>Shigella spp</i>	Κληρονομικότητα
Νευραμινιδάση	Φάρμακα
Ιός HIV	Όγκοι
	Εγκυμοσύνη
	Συστηματικός ερυθματώδης λύκος
	Μεταμόσχευση
	Σκληρόδερμα
	Υπέρταση σε σπειραματονεφρίτιδα

Τα περισσότερα περιστατικά αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου συνδέονται με πρόδρομα συμπτώματα αιμορραγικής ή, σπανιότερα, μη αιμορραγικής διάρροιας, μετά από μόλυνση του ασθενούς με στελέχη της *E.coli* και ιδίως του οροτύπου O157:H7 και των τοξινών που παράγει (Karmali et al, 1985).

Αντίθετα, το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο που δεν συνδέεται με πρόδρομα συμπτώματα διάρροιας είναι πολύ σπανιότερο και συνήθως περνούν εβδομάδες ή και μήνες από την έκθεση του οργανισμού στον αιτιολογικό παράγοντα μέχρι την εκδήλωση του συνδρόμου (Charba et al, 1993). Σε αυτά τα περιστατικά το σύνδρομο μπορεί να είναι ιδιοπαθές ή να ακολουθεί μια ελαφρά ιογενή λοίμωξη του



αναπνευστικού συστήματος. Είναι σπάνιο σε παιδιά και συχνότερο στους ενήλικες, αν και ολόένα και περισσότερο το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο και στα ενήλικα άτομα συνδέεται με διάρροια (Neild, 1994).

Οι Shiga τοξίνες που παράγονται από την *E.coli* O157:H7 είναι από τα πιο συχνά αίτια πρόκλησης αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου που συνδέεται με διάρροια. Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, η δράση των τοξινών στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του νεφρικού σπειράματος προκαλεί αγγειακές βλάβες με αποτέλεσμα τη θρόμβωση και τη συγκέντρωση αιμοπεταλίων, με πιθανή συμμετοχή και προθρομβωτικών παραγόντων, όπως ο παράγοντας von Willebrand.

Τα κυριότερα συμπτώματα που παρατηρούνται στους ασθενείς με αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο, εξαιτίας του τρόπου δράσης των τοξινών της *E.coli* O157:H7, όπως αναφέρει ο Neild (1994), είναι τα παρακάτω:

Αιματολογικές διαταραχές

Η αναιμία που παρατηρείται είναι σοβαρή και συνήθως στους ασθενείς απαιτείται μετάγγιση αίματος. Η αιμοσφαιρίνη μπορεί να φτάσει σε 3 g/dL, αλλά συνήθως κυμαίνεται σε τιμές 7-9 g/dL. Συχνά εμφανίζονται στο αίμα και μη φυσιολογικές μορφές ερυθρών αιμοσφαιρίων, όπως σφαιροκύτταρα και σχιστοκύτταρα. Αιμόλυση μπορεί να εμφανιστεί περίπου τρεις εβδομάδες μετά την έναρξη του συνδρόμου και ανάλογα με το βαθμό της αιμόλυσης υπάρχει αύξηση στα δικτυοερυθροκύτταρα, τη μη συνδεδεμένη χολερυθρίνη και την γαλακτική δεϋδρογονάση.

Ο αριθμός των αιμοπεταλίων μπορεί να μειωθεί στα $5 \times 10^9/L$, όμως ο μέσος όρος των αιμοπεταλίων στους ασθενείς κυμαίνεται στα $50 \times 10^9/L$. Η διάρκεια της θρομβοκυτταροπενίας είναι περίπου 7 έως 20 ημέρες και η σοβαρότητά της δεν εξαρτάται από τη σοβαρότητα της νόσου.



Στο αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο παρατηρείται επίσης αύξηση των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, ο αριθμός των οποίων μπορεί να φτάσει τα $30 \times 10^9/L$. Ασθενείς με αυξημένο αριθμό λευκοκυττάρων πάνω από $20 \times 10^9/L$ έχουν συνήθως κακή πρόγνωση (Milford et al, 1991).

Ουροποιητικό σύστημα

Συχνό σύμπτωμα στους ασθενείς με αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο είναι η ολιγουρία, αν και κάποιοι ασθενείς μπορεί να παρουσιάσουν πολυουρία. Τα ούρα περιέχουν συνήθως 1-2 g λευκώματος ανά 24ωρο, ενώ σε κάποιους ασθενείς η πρωτεϊνουρία φτάνει στα 10 g λευκώματος ανά 24ωρο. Συχνή είναι και η μικροσκοπική αιματουρία, ενώ μπορεί να υπάρξει και μακροσκοπική. Επίσης, μπορεί να εμφανιστεί και δυσανάλογη αύξηση του ουρικού οξέος σε σύγκριση με την ουρία και την κρεατινίνη, εξαιτίας της αιμόλυσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Το νάτριο του πλάσματος συχνά είναι μειωμένο, ενώ στις σοβαρές περιπτώσεις μειώνεται και η λευκωματίνη.

Καρδιαγγειακό σύστημα

Ασθενείς με αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο που συνδέεται με διάρροια έχουν συνήθως φυσιολογική πίεση. Σπάνια, το σύνδρομο αυτό μπορεί να οδηγήσει σε καρδιακή ανεπάρκεια εξαιτίας καρδιομυοπάθειας ή μυοκαρδίτιδας.

Κεντρικό νευρικό σύστημα

Τα συμπτώματα που αφορούν στο κεντρικό νευρικό σύστημα είναι αρκετά συχνά στους ασθενείς με αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο. Συχνότερα παρατηρούνται ευερεθιστότητα, επιληπτικές κρίσεις (γενικευμένες ή εντοπισμένες), οφθαλμολογικές διαταραχές, παρεγκεφαλιδική αταξία, μειωμένο επίπεδο συνείδησης, παρεγκεφαλιδικοί σπασμοί και κόμα.



Γαστρεντερικό σύστημα

Ο έντονος κοιλιακός πόνος και η αιμορραγική διάρροια είναι τα πιο συχνά εμφανιζόμενα συμπτώματα που προηγούνται της εκδήλωσης του συνδρόμου. Σε πιο σοβαρές περιπτώσεις έχουν παρατηρηθεί έμφραξη ή και διάτρηση του εντέρου, εξαιτίας της σοβαρής μικροαγγειακής νόσου του εντέρου. Σε ασθενείς με σοβαρή κολίτιδα μπορεί να προκληθεί έως και πρόπτωση του απευθυσμένου, με κακή συνήθως πρόγνωση. Άλλα συμπτώματα που έχουν αναφερθεί είναι η ηπατοσπληνομεγαλία, καθώς και βλάβες στον οισοφάγο.

Σε ασθενείς που εμφανίζουν ξαφνική αιμόλυση είναι πιθανή η δημιουργία ασβεστολίων (Parida et al, 1991).

Βλάβες του παγκρέατος είναι αρκετά συνηθισμένες στους ασθενείς με αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο. Περίπου 10-20% των ασθενών αυτών εμφανίζουν επιπλοκές από το πάγκρεας, με αύξηση της τιμής των παγκρεατικών ενζύμων έως και τέσσερις φορές επάνω από τη φυσιολογική και πρόκληση σακχαρώδη διαβήτη σε ποσοστό 4-15% των ασθενών (Andreoli, 1992).

Δέρμα

Πετέχειες και πορφύρα είναι σπάνια συμπτώματα στους ασθενείς με αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο, με εξαίρεση εκείνους στους οποίους ο αριθμός των αιμοπεταλίων είναι χαμηλότερος από $20 \times 10^9/L$.

Μύες

Σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις έχει αναφερθεί ραβδομυόλυση.

1.4. Θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα.

Το σύνδρομο αυτό περιγράφηκε για πρώτη φορά από το Moschcowitz το 1924. Κατά την εμφάνιση του συνδρόμου αυτού, η συσσώρευση των αιμοπεταλίων

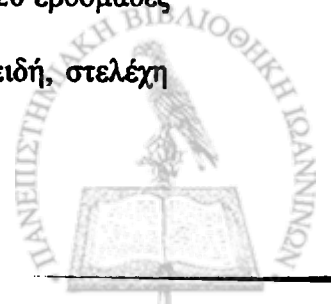


συμβαίνει σε μικρά αιμοφόρα αγγεία διαφόρων οργάνων, προκαλώντας έτσι ισχαιμία (Rock et al, 1991, Bell et al, 1991). Αντίθετα, στο αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο η ισχαιμία αφορά κυρίως-και κάποιες φορές αποκλειστικά-το νεφρό (Cleary, 1988, Ashkenazi, 1993).

Η θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα συνίσταται από μια πεντάδα συμπτωμάτων: θρομβοκυτταροπενία, μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία, πυρετός, νεφρική ανεπάρκεια και νευρολογικά συμπτώματα. Ασθενείς με αιμορραγική κολίτιδα σπάνια μπορεί να εμφανίσουν ως επιπλοκή το σύνδρομο αυτό (ποσοστό περίπου 8%). Θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα εξαιτίας της *E. coli* O157:H7 έχει παρατηρηθεί κυρίως σε ηλικιωμένους ασθενείς, ενώ δεν έχει αναφερθεί σε παιδιά, σε αντίθεση με το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (Ostroff et al, 1990).

2. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ ΣΤΑ ΖΩΑ

Τα βοοειδή, τα οποία αποτελούν την κύρια δεξαμενή του βακτηρίου, φαίνεται ότι είναι ανθεκτικά σ' αυτό και παραμένουν υγιή, σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει στον άνθρωπο (Cray και Moon, 1995). Πειραματικός ενοφθαλμισμός της *E. coli* O157:H7 σε βοοειδή, φαίνεται ότι προκαλεί νόσο μόνο σε νεαρά ζώα ηλικίας έως τριών εβδομάδων (Dean-Nystrom et al, 1997). Ωστόσο, σύμφωνα με τους Cray και Moon (1995), τόσο τα νεαρά όσο και τα ενήλικα υγιή βοοειδή, συνεχίζουν να αποβάλλουν το βακτήριο με τα κόπρανά τους για μακρά χρονικά διαστήματα (μέχρι 20 εβδομάδες τα ανήλικα και μέχρι 14 εβδομάδες τα ενήλικα). Στα νεογέννητα βοοειδή, στελέχη



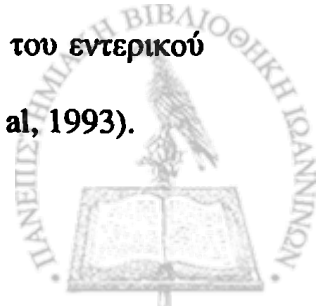
της *E.coli* O157:H7 μπορούν να προκαλέσουν διάρροια με τις χαρακτηριστικές βλάβες «attaching and effacing (A/E)» στο λεπτό και παχύ έντερο, ανάλογες με εκείνες που προκαλούν στον άνθρωπο (Dean-Nystrom et al, 1997). Η διαφορά αυτή μεταξύ ενήλικων και νεαρών βοοειδών οφείλεται στο γεγονός, ότι τα μεγαλύτερα ζώα, σε αντίθεση με τα νεογέννητα, έχουν πλήρως σχηματισμένους τους στομάχους, με αποτέλεσμα η υψηλή συγκέντρωση λιπαρών οξέων και το χαμηλό pH να αποτρέπουν τον αποικισμό των στομάχων από την *E.coli* O157:H7.

Η ανθεκτικότητα των βοοειδών στην προσβολή τους από την *E.coli* O157:H7 οφείλεται στο γεγονός ότι στα βοοειδή, σε αντίθεση με τον άνθρωπο, οι Shiga τοξίνες δεν αποκτούν πρόσβαση σε άλλα όργανα, αφού δεν έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται πάνω στα αιμοφόρα αγγεία αυτών (Cray και Moon, 1995) και επιπλέον, τα βοοειδή φέρουν το γλυκολιπιδικό υποδοχέα Gb3 (που είναι απαραίτητος για τη δέσμευση των τοξινών πάνω στα κύτταρα του ξενιστή) μόνο στον εντερικό σωλήνα και όχι στα νεφρά ή στον εγκέφαλο, όπως συμβαίνει με τον άνθρωπο (Pruimboom-Brees et al, 2000).

Στα άλλα είδη μηρυκαστικών η *E.coli* O157:H7 δεν φαίνεται να προκαλεί νόσο. Έρευνα των Blanco et al (1996α), αποκαλύπτει ότι κάποια εντεροαιμορραγικά στελέχη της *E.coli* οροτύπων O11, O166 και O117 προκαλούν διάρροια σε αρνιά όχι όμως και ο ορότυπος O157:H7.

Όμοια και στους χοίρους, φαίνεται ότι το συγκεκριμένο βακτήριο δεν προκαλεί νόσο, παρότι άλλα εντεροαιμορραγικά στελέχη που παράγουν τη Shiga τοξίνη 2 προκαλούν τη νόσο του οιδήματος (McLeod et al, 1991).

Επίσης και στα πουλερικά το βακτήριο δεν προκαλεί νόσο, παρότι πειραματικός ενοφθαλμισμός τους έχει ως αποτέλεσμα τον αποικισμό του εντερικού σωλήνα και την για 14 ημέρες αποβολή του στο περιβάλλον (Stavric et al, 1993).



Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει στους σκύλους της ράτσας Greyhound, μια νοσολογική οντότητα, η ιδιοπαθής νεφρική σπειραματική αγγειοπάθεια των Greyhound, η οποία φαίνεται να προσομοιάζει το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο του ανθρώπου και οφείλεται σε προσβολή των ζώων αυτών από εντεροαιμορραγικά στελέχη της *E.coli* συμπεριλαμβανομένου και του ορότυπου O157:H7 (Carpenter et al, 1988). Μελέτη της νόσου αυτής μπορεί ενδεχομένως να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση του αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου.

Z. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

1. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ *E.COLI* O157:H7 ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

1.1. Συλλογή του κλινικού δείγματος

Η *E.coli* O157:H7 αποβάλλεται από τους ασθενείς με τα κόπρανά τους για χρονικό διάστημα έως μία εβδομάδα μετά την έναρξη των συμπτωμάτων (Wells et al, 1983, Tarr et al, 1990). Για το λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητη η λήψη κοπράνων ασθενών αμέσως μετά την έναρξη της διάρροιας.

1.2. Απομόνωση και ταυτοποίηση της *E.coli* O157:H7

Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για την απομόνωση και ταυτοποίηση της *E.coli* O157:H7 στον άνθρωπο, είναι ίδιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται για την αναζήτηση του βακτηρίου στα τρόφιμα και αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω. Σε αντίθεση όμως με τα τρόφιμα, στα κλινικά δείγματα από ασθενείς δε χρειάζεται προεμπλουτισμός του δείγματος, όπως αυτός περιγράφεται στο επόμενο κεφάλαιο.



2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

2.1. Τρόπος λήψης των δειγμάτων τροφίμων

Τα δείγματα τροφίμων συλλέγονται με άσηπτο τρόπο σε αποστειρωμένους περιέκτες και διατηρούνται στην ψύξη μέχρι την εξέτασή τους.

2.2. Απομόνωση της *E. coli* O157:H7

2.2.1. Μέθοδος της κλασικής καλλιέργειας

Για την καλλιέργεια της *E. coli* O157:H7, οι ερευνητές εκμεταλλεύτηκαν τα δύο βασικά χαρακτηριστικά του μικροβίου, δηλαδή την αδυναμία ζύμωσης της σορβιτόλης μέσα σε 24 ώρες, καθώς και την αδυναμία παραγωγής του ενζύμου β-D-γλυκουρονιδάση.

Βασισμένοι στο πρώτο χαρακτηριστικό οι March και Ratnam (1986), αντικατέστησαν, στο ήδη γνωστό για την καλλιέργεια κολοβακτηριοειδών MacConkey άγαρ, τη λακτόζη με 1% D-σορβιτόλη.

Επίσης, για να αυξήσουν την εκλεκτικότητα αυτού του υποστρώματος, άλλοι ερευνητές πρόσθεσαν σ' αυτό διάφορα αντιβιοτικά. Συγκεκριμένα, οι Charman και συν. (1991) πρόσθεσαν cefixime για την αναστολή του *Proteus spp* και ραμνόζη την οποία ζυμώνουν τα περισσότερα από τα στελέχη της *E. coli* που δεν ζυμώνουν τη σορβιτόλη, όχι όμως και η *E. coli* O157:H7.

Μεγαλύτερη εκλεκτικότητα επιτυγχάνεται με το υπόστρωμα που περιέγραψαν οι Zadik και συν. (1993), στο οποίο προσθέτονται cefixime και tellurite. Με τα αντιβιοτικά αυτά επιτυγχάνεται η αναστολή μικροοργανισμών οι οποίοι, όπως και η *E. coli* O157:H7, δεν ζυμώνουν τη σορβιτόλη, όπως *Aeromonas spp.*, *Plesiomonas spp.*, *Morganella morganii*, *Providencia spp.* και *Hafnia alvei*.



Διαφοροποιήσεις του εκλεκτικού υποστρώματος Sorbitol MacConkey άγαρ έγιναν και με την προσθήκη από τους Okrend και συν. (1990) του 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδοξυ-β-D-γλυκουρονικού (BCIG). Η χρήση αυτού του υποστρώματος για την απομόνωση της *E.coli* O157:H7 μείωσε κατά 36% τον αριθμό των ψευδώς θετικών αποικιών σε σχέση με το κλασικό υπόστρωμα.

Οι Padhye και Doyle (1991α), χρησιμοποιώντας επίσης την ιδιότητα του βακτηρίου αυτού να μην παράγει το ένζυμο β-D-γλυκουρονιδάση, πρόσθεσαν στο Sorbitol MacConkey άγαρ 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG). Στο υπόστρωμα αυτό, η *E.coli* O157:H7, εξαιτίας της έλλειψης του παραπάνω ενζύμου, δεν έχει την ικανότητα να διασπάσει το MUG και επομένως ούτε να παράγει το φθορίζον προϊόν αυτής της διάσπασης, σε αντίθεση με τα περισσότερα άλλα στελέχη της *E.coli*.

Ωστόσο, η μικρή λοιμογόνος δόση του συγκεκριμένου ορότυπου επιβάλλει την ικανότητα ανίχνευσης στα τρόφιμα ακόμη και μικρού αριθμού κυττάρων του βακτηρίου. Για το λόγο αυτό, και καθώς τα εκλεκτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται δεν έχουν μεγάλη ευαισθησία, κρίνεται απαραίτητος ο προεμπλουτισμός, τουλάχιστον για τα δείγματα τροφίμων, τα οποία φέρουν μεγάλο μικροβιακό φορτίο εκτός της *E.coli* O157:H7. Ο προεμπλουτισμός των τροφίμων επιτρέπει στα κύτταρα της *E.coli* O157:H7, ακόμη κι όταν βρίσκονται σε μικρό αριθμό στο τρόφιμο να πολλαπλασιαστούν φτάνοντας σε ανιχνεύσιμα όρια.

Οι Doyle και Schoeni (1987) χρησιμοποίησαν ως προεμπλουτιστικό υλικό το Tryptone Soya Broth εμπλουτισμένο με χολικά άλατα, όξινο φωσφορικό κάλιο και novobiocin. Το αντιβιοτικό αυτό βοηθά στην αναστολή της ανάπτυξης των άλλων Gram αρνητικών μικροοργανισμών.



Οι Padhye και Doyle (1991α) πρόσθεσαν στο παραπάνω προεμπλουτιστικό υλικό και ακριφλαβίνη για την αποτελεσματικότερη αναστολή των Gram αρνητικών μικροοργανισμών.

Τέλος, οι Charman και συν. (1994) εισήγαγαν ως προεμπλουτιστικό υλικό το Buffered Peptone Water στο οποίο πρόσθεσαν vancomycin, cefixime και cefsulodin για την αναστολή της *Aeromonas spp.* και του *Proteus spp.*

2.2.2. Μέθοδος του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε για να αυξήσει την ευαισθησία ως προς την ανίχνευση της *E.coli* O157:H7 στα τρόφιμα.

Συγκεκριμένα, παραμαγνητικά σωματίδια καλυμμένα με αντισώματα ειδικά για την *E.coli* O157:H7 προσθέτονται μέσα στο προεμπλουτιστικό υλικό που περιέχει το δείγμα του τροφίμου που εξετάζεται. Τα κύτταρα της *E.coli* O157:H7 που ενδεχομένως υπάρχουν στο τρόφιμο που εξετάζεται, δεσμεύονται στο αντίσωμα και το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος απομακρύνεται από το τρόφιμο με την εφαρμογή μαγνητικού πεδίου.

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε για πρώτη φορά σε τρόφιμα από τους Fratamico και συν. (1992), ενώ οι Wright και συν. (1994) χρησιμοποιώντας παραμαγνητικά σωματίδια του οίκου Dynal, ανέφεραν ότι η μέθοδος είναι 100 φορές πιο ευαίσθητη από τη μέθοδο της κλασικής καλλιέργειας ανιχνεύοντας έως 20 cfu/10g μοσχαρίσιου κρέατος.

Γενικά, η μέθοδος του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού είναι ταχεία, δεν απαιτεί ιδιαίτερα εξειδικευμένο εξοπλισμό, είναι ειδική για την *E.coli* O157:H7 και είναι λιγότερο δαπανηρή σε σχέση με ανοσολογικές ή μοριακές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του βακτηρίου.



Συμπερασματικά, η μέθοδος που περιλαμβάνει προεμπλουτισμό σε TSB και πονοβιοσίνη, ανοσομαγνητικό διαχωρισμό και καλλιέργεια σε Sorbitol MacConkey άγαρ εμπλουτισμένο με cefixime και tellurite, θεωρείται η πιο ευαίσθητη και ειδική όσον αφορά στην απομόνωση της *E.coli* O157:H7 από τα τρόφιμα (Bolton και συν., 1996).

2.3. Ανίχνευση της *E.coli* O157:H7

2.3.1. Μέθοδοι βασισμένες στην αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος

α. Συγκόλληση με σωματίδια latex καλυμμένα με αντιγόνο

Οι March και Ratnam (1989) εξέτασαν με αντιγόνο ειδικό για την *E.coli* O157:H7 κλινικά δείγματα κοπράνων και η μέθοδος εμφάνισε 100% ευαισθησία και ειδικότητα. Ωστόσο, μη ειδική συγκόλληση με τον αντιγόνο μπορεί να παρατηρηθεί σε στελέχη της *Escherichia hermanii* (Lior και Borczyk, 1987), καθώς και με τους οροτύπους της *E.coli* O148:NM και O117:H27 (Borczyk et al, 1990), οπότε κρίνεται απαραίτητη η εφαρμογή επιβεβαιωτικών δοκιμασιών.

β. Elisa

Οι Padhye και Doyle (1991α) εφάρμοσαν για πρώτη φορά την ανοσολογική αυτή μέθοδο για την ανίχνευση της *E.coli* O157:H7 και γενικά των εντεροαιμορραγικών στελεχών της *E.coli* σε καλλιέργειες δειγμάτων τροφίμων. Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα ως αντίσωμα δέσμησης και μονοκλωνικό αντίσωμα, ειδικό δύο πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης του κυττάρου της *E.coli* O157:H7, ως αντίσωμα ανίχνευσης.



Σύμφωνα με τους ερευνητές αυτούς, η μέθοδος παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα και είναι ταχεία και απλή.

Μέθοδο Elisa έχουν εφαρμόσει κι άλλοι ερευνητές, τόσο σε δείγματα τροφίμων (Bennett et al, 1995, Flint και Hartley, 1995), όσο και σε δείγματα κοπράνων ασθενών (Dylla et al, 1995, Park et al, 1996), επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα των αρχικών ερευνητών.

γ. Χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων

Η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων για την ανίχνευση της *E.coli* O157:H7 ήταν ήδη γνωστή από το 1988, όταν οι Peppy και συν. χρησιμοποίησαν μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για τον O πολυσακχαρίτη.

Για να βελτιώσουν την ειδικότητα του μονοκλωνικού αντισώματος και να μειώσουν τις διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα στελέχη, οι Padhye και Doyle (1991β) δημιούργησαν το μονοκλωνικό αντίσωμα Mab 4E8C12, ειδικό δύο πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης της *E.coli* O157:H7.

Τέλος, οι Johnson και συν. (1995), βελτίωσαν τη μέθοδο των προηγούμενων ερευνητών αυξάνοντας την ειδικότητά της.

Ωστόσο, τα παραπάνω μονοκλωνικά αντισώματα έχουν βρεθεί και σε άλλα εντεροαιμορραγικά στελέχη της *E.coli* που προκαλούν αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο, όπως στην *E.coli* O26:H111. Για το λόγο αυτό, στην καλλιέργεια του τροφίμου που προηγείται, κρίνεται απαραίτητη η εφαρμογή της μεθόδου του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού με παραμαγνητικά σωματίδια καλυμένα με αντίσωμα ειδικό για την *E.coli* O157:H7.



2.3.2. Μέθοδοι βασισμένες στο DNA του βακτηρίου

α. Χρήση ανιχνευτών DNA

Οι Levine και συν. (1987) δημιούργησαν έναν ανιχνευτή DNA από τμήμα πλασμιδιακού DNA, το οποίο κωδικοποιεί την παραγωγή ινιδίων υπεύθυνων για τη δέσμευση της *E.coli* O157:H7 επάνω στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου του ξενιστή. Ο ανιχνευτής DNA παρουσίαζε υβριδισμό με το 99% των στελεχών της *E.coli* O157:H7, αλλά και με το 77% των στελεχών της *E.coli* O26:H111, καθώς και με το 81% άλλων εντεροαιμορραγικών στελεχών.

Πιο πρόσφατα και άλλοι ερευνητές εφάρμοσαν τη μέθοδο των ανιχνευτών DNA, ειδικών για το eae γονίδιο που κωδικοποιεί την παραγωγή της ιντιμίνης (Louie et al, 1994) καθώς και για το hlyA γονίδιο που κωδικοποιεί την παραγωγή της εντεροαιμολυσίνης (Schmidt et al, 1995).

β. Μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase chain reaction-PCR)

Με τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται εκκινητές (primers) για την αναπαραγωγή του γονιδίου eae της *E.coli* O157:H7 που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της παραγωγής ιντιμίνης. Ακολουθεί ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (Fratamico et al, 1995, Meng et al, 1997). Σήμερα κυκλοφορούν στο εμπόριο έτοιμα αντιδραστήρια για τη διάγνωση της *E.coli* O157:H7 με τη μέθοδο PCR. Τα αντιδραστήρια κυκλοφορούν με την εμπορική ονομασία BAX (Qualicon, Wilmington, Del) και ανιχνεύουν κύτταρα της *E.coli* O157:H7 από δείγματα τροφίμων. Η δοκιμασία έχει ως στόχο μια συγκεκριμένη περιοχή του DNA του βακτηρίου. Το τμήμα αυτό είναι σταθερό και δεν επηρεάζεται από το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται η καλλιέργεια. Για τα δείγματα τροφίμων



απαιτείται μόνο προεμπλουτισμός στον κοινό θρεπτικό ζωμό που χρησιμοποιείται για την *E.coli* O157:H7. Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι είναι πολύ απλή, καθώς όλα τα υλικά που χρειάζονται για την PCR (εκκινητές, πολυμεράση, νουκλεοτίδια) περιλαμβάνονται μέσα στα σωληνάρια της PCR. Επίσης, υπάρχουν και άλλες αυτοματοποιημένες μέθοδοι ανίχνευσης του βακτηρίου με τη μέθοδο της PCR, το σύστημα LightCycler (Bioanalytica), το οποίο επιτυγχάνει και ποσοτικό προσδιορισμό της *E.coli* O157:H7 στα τρόφιμα.

Γενικά, τα έτοιμα αντιδραστήρια που κυκλοφορούν στο εμπόριο για τη μέθοδο PCR είναι απλά στη χρήση και ειδικά για την ανίχνευση της *E.coli* O157:H7. Ωστόσο, το υψηλό κόστος, τόσο του εξοπλισμού που απαιτείται, όσο και των αντιδραστηρίων, καθιστούν τη μέθοδο ιδιαίτερα δαπανηρή.

2.4. Επιβεβαιωτικές δοκιμασίες για την ταυτοποίηση της *E.coli* O157:H7

Όλες οι ύποπτες αποικίες που απομονώνονται από την καλλιέργεια του δείγματος, πρέπει να επιβεβαιωθούν με βιοχημικό έλεγχο, για να αποκλειστεί η πιθανότητα ψευδώς θετικών στελεχών.

Ένα τέτοιο βακτήριο είναι η *Escherichia hermanii*, ένα βακτήριο που απομονώνεται συχνά από τα τρόφιμα και το οποίο βιοχημικά και ορολογικά είναι παρόμοιο με την *E.coli* O157:H7 και δίνει διασταυρούμενη αντίδραση με τον πολυκλωνικό αντιγόνο (Lior και Borezyk, 1987). Για τη διάκριση των δύο μικροοργανισμών χρησιμοποιούνται οι δοκιμασίες του κυανιούχου καλίου και της κυτταροβιόζης. Η *E.coli* O157:H7 δεν ζυμώνει την κυτταροβιόζη και δεν μπορεί να αναπτυχθεί στην παρουσία κυανιούχου καλίου (KCN), ενώ η *E. hermanii* είναι θετική και στις δύο παραπάνω δοκιμασίες (Ratnam et al, 1988).



Επίσης, για την ταυτοποίηση της *E.coli* O157:H7 πρέπει να ελέγχεται και το βλεφαριδικό αντιγόνο. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται σωματίδια latex καλυμμένα με αντιορό ειδικό για το αντιγόνο H7. Θα πρέπει εδώ να αναφερθεί ότι τα στελέχη της *E.coli* O157 σε ποσοστό 12% δεν διαθέτουν το βλεφαριδικό αντιγόνο, ενώ υπάρχουν και στελέχη της *E.coli* O157 που έχουν βλεφαριδικά αντιγόνα διαφορετικά από το H7 (Thomas et al, 1993, Fields et al, 1997).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, όσον αφορά στη διάγνωση και στην ταυτοποίηση του συγκεκριμένου βακτηρίου, παρουσιάζει η ανεύρεση φαινοτυπικών παρεκκλίσεων της *E.coli* O157:H7. Συγκεκριμένα, κάποια στελέχη του βακτηρίου έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν τη σορβιτόλη εντός 24 ωρών και να παράγουν β-γλυκουρονιδάση. Τέτοια στελέχη απομονώθηκαν για πρώτη φορά στη Γερμανία σε μια επιδημία αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου (Gunzer et al, 1992), ενώ και στις Η.Π.Α. έχουν απομονωθεί τέτοια στελέχη (Feng, 1995, Hayes et al, 1995).

Πρόσφατα, απομονώθηκε και από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στέλεχος της *E.coli* O157:H7 από κόπρανα αίγας, το οποίο παρόλο που δεν ζύμωνε τη σορβιτόλη εντός 24 ωρών, ήταν MUG-θετικό (Dontorou et al, 2001).

2.5. Μέθοδοι για την ανίχνευση της παραγωγής τοξινών και των υπεύθυνων γονιδίων

2.5.1. Κυτταροκαλλιέργεια

Η κυτταροτοξική δράση των Shiga τοξινών της *E.coli* O157:H7 επάνω στα Vero κύτταρα, ήταν ήδη γνωστή από τα πειράματα των Konowalchuk και συν. (1977). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, καλλιέργειες μικροβίου μετά τον προεμπλουτισμό τους σε ζωμό Tryptone Soya Broth προστίθενται σε κυτταρικές



σειρές Vero κυττάρων. Παρουσία των τοξινών, τα κύτταρα αποκολλώνται και το αποτέλεσμα γίνεται ορατό μετά από επώασή τους για 3-4 ημέρες και χρώση των κυττάρων (Smith και Scotland, 1993).

2.5.2. Ειδικοί αντιοροί

Για να επιβεβαιωθεί ότι το παραπάνω κυτταροτοξικό αποτέλεσμα οφείλεται στις Shiga τοξίνες, πρέπει να πραγματοποιούνται δοκιμασίες εξουδετέρωσης με αντιορό ειδικό για την κάθε Shiga τοξίνη (Scotland et al, 1988).

2.5.3. Elisa

Έχουν εφαρμοστεί διάφορες μέθοδοι Elisa για την ανίχνευση των Shiga τοξινών με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων ειδικών για τις τοξίνες (Basta et al, 1989, Acheson et al, 1990).

2.5.4. Χρήση ανιχνευτών DNA

Έχουν εφαρμοστεί μέθοδοι ανίχνευσης των γονιδίων που κωδικοποιούν τις τοξίνες οι οποίες χρησιμοποιούν τόσο πολυνουκλεοτιδικούς ανιχνευτές DNA (Willshaw et al, 1985), όσο και ολιγονουκλεοτιδικούς (Levine et al, 1987, Thomas et al, 1991, Smith και Scotland, 1993).

2.5.5. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Με τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται εκκινητές (primers) για την αναπαραγωγή του τμήματος εκείνου του DNA της *E.coli* O157:H7 που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της παραγωγής των τοξινών του μικροβίου.



Ακολουθεί ανάλυση σε πηκτή αгарόζης με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (Read et al, 1992).

2.6. Έλεγχος στα Εργαστήρια Αναφοράς

2.6.1. Φαγοτυπία

Με τη μέθοδο της φαγοτυπίας και τη χρήση 16 φάγων, όπως εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τους Ahmed και συν. (1987), σήμερα έχουν αναγνωριστεί περισσότεροι από 80 φαγότυποι της *E.coli* O157:H7 (Khahria et al, 1990).

Σύμφωνα με έρευνα της Υπηρεσίας Εργαστηρίων Δημόσιας Υγείας της Βρετανίας (PHLS), από τα διάφορα είδη φαγοτύπων πιο συχνός είναι ο PT21/28 (περίπου 59% του συνόλου των στελεχών), ενώ ακολουθούν οι PT2 (14%), PT8 (7%), PT4 (6%) και PT32 (6%) (CDR Wkly, 1999β).

2.6.2. Πλασμιδιακή ανάλυση

Όλα τα στελέχη της *E.coli* O157:H7 φέρουν ένα πλασμίδιο μοριακού βάρους 60 MDa, ωστόσο κάποια στελέχη διαθέτουν και άλλα πλασμίδια. Η πλασμιδιακή ανάλυση χρησιμοποιείται για να διαπιστωθεί η προέλευση της μόλυνσης, τόσο σε επιδημίες, όσο και σε σποραδικά περιστατικά (Scotland et al, 1987).

2.6.3. Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)

Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για επιδημιολογικές έρευνες. Οι Harsono et al (1993), χρησιμοποίησαν τις ενδονουκλεάσες XbaI και SfiI. Με τα ένζυμα αυτά αποκαλύφθηκαν αντίστοιχα έξι και δέκα διαφορετικά γονιδιακά προφίλ για τα στελέχη της *E.coli* O157:H7 που εξετάστηκαν.



Η. ΠΡΟΛΗΨΗ-ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΦΥΛΑΞΗΣ

1. ΓΕΝΙΚΑ ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΦΥΛΑΞΗΣ

Για την αποφυγή μετάδοσης της *E.coli* O157:H7 στον άνθρωπο είναι απαραίτητο να τηρούνται κάποιοι βασικοί κανόνες υγιεινής, τόσο από τους κτηνοτρόφους που ασχολούνται με τα ζώα, όσο και από τους καταναλωτές τροφίμων ζωικής προέλευσης. Πιο συγκεκριμένα:

1. Πολύ καλός καθαρισμός του μαστού του ζώου από τους κτηνοτρόφους πριν από την άμελη του γάλακτος, προς αποφυγή μόλυνσής του από κόπρανα.
2. Αποφυγή κατανάλωσης μη παστεριωμένου γάλακτος και τυριών.
3. Επαρκής θερμική επεξεργασία των κρεάτων πριν την κατανάλωσή τους.
4. Καλό πλύσιμο των λαχανικών και ιδιαίτερα αυτών που καταναλώνονται ωμά.
5. Διατήρηση των ωμών κρεάτων χωριστά από τα λαχανικά και τα μαγειρευμένα κρέατα.
6. Σχολαστικό καθάρισμα των χεριών, των εργαλείων και επιφανειών κοπής των τροφίμων μετά την κατεργασία των ωμών κρεάτων.

2. ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η *E.coli* O157:H7 μεταδίδεται κυρίως τροφιμογενώς. Η τροφιμογενής μετάδοση του βακτηρίου το καθιστά ιδιαίτερα σημαντική παράμετρο όσον αφορά στην υγιεινή των τροφίμων, με αποτέλεσμα να



είναι απαραίτητη η σωστή επεξεργασία των τροφίμων πριν αυτά δοθούν στην κατανάλωση, ώστε να διασφαλιστεί η δημόσια υγεία.

Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο να αναφερθούν κάποια χαρακτηριστικά του βακτηρίου, που αφορούν στην ανθεκτικότητά του ή μη, σε ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές καταστροφής των μικροβίων στα τρόφιμα.

2.1. Επίδραση της θερμοκρασίας

Η *E.coli* O157:H7 αναπτύσσεται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, από 10 °C έως 45°C, ενώ κάποια στελέχη μπορούν να αναπτυχθούν ακόμη και στους 8°C (Palumbo et al, 1995).

Το βακτήριο δεν παρουσιάζει ιδιαίτερη ανθεκτικότητα σε θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται για την καταστροφή και άλλων μικροβίων, όπως η *Salmonella*, από την οποία φαίνεται να είναι πιο θερμοευαίσθητο. Θέρμανση του τροφίμου στους 68,3°C για 16,2 δευτερόλεπτα καταστρέφει την *E.coli* O157:H7 (Meng και Doyle, 1998).

Ανθεκτικότητα όμως παρουσιάζει το βακτήριο στις χαμηλές θερμοκρασίες. Επιζεί για 10-31 ημέρες στο μηλίτη οίνο στους 8°C (Zhao et al, 1993) και περίπου τρεις ημέρες στους 5°C σε σαλάτες με μαγιονέζα (Abdul-Rauf et al, 1993). Επίσης, επιβιώνει για 35 ημέρες στους 7°C στη μαγιονέζα, ενώ μόνο για τρεις ημέρες στους 25°C (Weagant et al, 1994).

Σε άλλα τρόφιμα, όπως τα αλλαντικά, θέρμανση στους 58,3°C για 61,3 λεπτά ή στους 61°C για 17,9 λεπτά προκαλεί μείωση του πληθυσμού της *E.coli* O157:H7 κατά 5- \log_{10} (Riordan et al, 2000).

Στο ωμό βόειο κρέας και στο γάλα η *E.coli* O157:H7 επιζεί τόσο στους 7°C όσο και στους 15°C για περισσότερες από πέντε ημέρες, ενώ στο απαστερίωτο γάλα



παρουσιάζεται ακόμη και αύξηση του πληθυσμού του βακτηρίου μετά τις 24 ώρες επώασης. Ωστόσο, στο γάλα η επιβίωση ή και η αύξηση της *E.coli* O157:H7 εξαρτάται από την ολική μικροβιακή χλωρίδα του γάλακτος (Heuvelink et al, 1998β).

Σε διάφορα άλλα είδη κρεάτων, θέρμανση με εσωτερική θερμοκρασία 65°C σκοτώνει την *E.coli* O157:H7 σε 1,45 λεπτά στο κρέας της γαλοπούλας, σε 1,90 λεπτά στο αρνίσιο κρέας, σε 1,6 λεπτά στο χοιρινό κρέας (Juneja και Marger, 1999), σε 7,25 λεπτά στο μοσχαρίσιο κρέας και σε 2,6 λεπτά στο κοτόπουλο (Juneja et al, 1997).

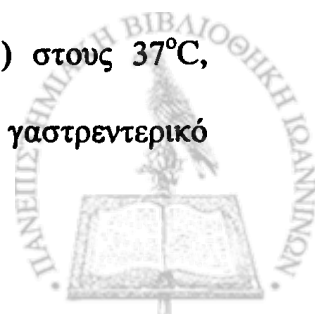
Η *E.coli* O157:H7 είναι ιδιαίτερα ανθεκτική και στην κατάψυξη, αφού μπορεί να επιζήσει χωρίς σημαντική μείωση του πληθυσμού της για εννέα μήνες στους -20°C έως τους -80°C (Doyle και Schoeni, 1984).

2.2. Επίδραση του χλωριούχου νατρίου

Η *E.coli* O157:H7 δεν φαίνεται να παρουσιάζει ιδιαίτερη ανθεκτικότητα στο χλωριούχο νάτριο δεδομένου, ότι δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 8,5% (Glass et al, 1992).

2.3. Επίδραση του pH

Η *E.coli* O157:H7 μπορεί να επιζήσει, ή ακόμη και να αναπτυχθεί, σε ένα μεγάλο εύρος pH και συγκεκριμένα από pH 4,5, στο οποίο μάλιστα επιβιώνει για 14 ημέρες, μέχρι pH 9,0, με ιδανικό για το χρόνο διπλασιασμού του βακτηρίου σε 25 λεπτά, το pH 7,3. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στελέχη της *E. coli* O157:H7 μπορούν να επιζήσουν για πάνω από πέντε ώρες σε pH από 2,5 ως 3,0. Η ικανότητα του βακτηρίου να επιζεί για πέντε ώρες σε χαμηλό pH (2,5-3,0) στους 37°C, συνθήκες δηλαδή παρόμοιες με αυτές που επικρατούν στον ανθρώπινο γαστρεντερικό



σωλήνα, εξηγούν την ικανότητα επιβίωσής του στον ανθρώπινο οργανισμό και την πρόκληση νόσου, με πολύ χαμηλή μάλιστα λοιμογόνο δόση (50-100 μικροοργανισμοί), (Benjamin και Datta, 1995).

2.4. Επίδραση των οξέων

Η δράση των οργανικών οξέων όσον αφορά στην καταστροφή του βακτηρίου εξαρτάται από το pH καθώς και από τη θερμοκρασία κατά την επεξεργασία του τροφίμου. Πάντως φαίνεται, ότι και για το συγκεκριμένο βακτήριο, πιο αποτελεσματική είναι η χρήση του οξικού οξέος, ενώ ακολουθούν το γαλακτικό και μετά το κιτρικό οξύ. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα του οξικού οξέος να διεισδύει στα κύτταρα εξαιτίας του χαμηλού του μοριακού βάρους (Abdul-Raouf et al, 1993).

2.5. Επίδραση των συντηρητικών

Χρήση συνδυασμού 0,1% βενζοϊκού νατρίου και 0,1% σορβικού καλίου ή μόνο 0,1% βενζοϊκού νατρίου ως συντηρητικό μέσο, μπορεί να θεωρηθεί ασφαλής για το τρόφιμο, όσον αφορά στην καταστροφή της *E.coli* O157:H7 (Zhao et al, 1993).

2.6. Επίδραση της τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Εφαρμογή τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε διάφορα είδη τροφίμων φαίνεται, ότι δεν έχει καμία επίδραση στην επιβίωση της *E.coli* O157:H7, δεδομένου ότι κανένα από τα έξι μείγματα αερίων (CO₂/O₂/N₂: 0/5/95, 0/10/90/, 5/10/85, 5/20/75, 10/5/85 και 10/20/70), που χρησιμοποίησαν οι Hao και Brackett το 1993, δεν κατάφερε να αναστείλει την ανάπτυξη του βακτηρίου στους 5, 10 και 20°C.



2.7. Επίδραση της ζύμωσης και της ξήρανσης

Από έρευνες σε λουκάνικα, που είχαν υποστεί τις δοκιμασίες της ζύμωσης και της ξήρανσης, αποκαλύπτεται, ότι αυτές δεν είναι αρκετές να σκοτώσουν την *E.coli* O157:H7 σε τρόφιμα τα οποία δεν έχουν υποστεί ικανοποιητική θερμική επεξεργασία. Για το λόγο αυτό λουκάνικα ή άλλα είδη αλλαντικών, που παρασκευάζονται με αυτό τον τρόπο, δεν πρέπει να θεωρούνται ασφαλή για τον καταναλωτή, παρά μόνο αν έχουν ελάχιστα ή καθόλου κύτταρα της *E.coli* O157:H7 (Glass et al, 1992).

Θ. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ-ΘΕΡΑΠΕΙΑ

1. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Ο έλεγχος για την ευαισθησία της *E.coli* O157:H7 στα αντιβιοτικά πραγματοποιείται με τις παρακάτω μεθόδους:

α) Μέθοδος διάχυσης στο άγαρ από δισκία χαρτιού εμποτισμένα με αντιβιοτικά ή μέθοδος Kirby-Bauer (Bauer et al, 1966).

β) Μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) του αντιβιοτικού, κατά την οποία το βακτήριο χαρακτηρίζεται ως ευαίσθητο, μετρίως ευαίσθητο ή ανθεκτικό σύμφωνα με τις οδηγίες που προτείνονται από την National Committee for Clinical Standards (NCCLS 2001).



2. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Ο σκοπός της θεραπείας των ασθενών που νοσούν μετά από μόλυνση με *E.coli* O157:H7 είναι τριπλός:

α) Να μειωθεί η σοβαρότητα και η διάρκεια των συμπτωμάτων της νόσου.

β) Να αποφευχθούν οι επιπλοκές, όπως το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο και η θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα.

γ) Να αποφευχθεί η μετάδοση του μικροβίου και σε άλλα άτομα.

Για τους παραπάνω σκοπούς έχουν κατά καιρούς εφαρμοστεί στους ασθενείς διάφορα θεραπευτικά σχήματα ανάλογα με την κλινική εκδήλωση της νόσου, όπως περιγράφονται παρακάτω.

2.1. Αιμορραγική κολίτιδα

Γενικά η *E.coli* O157:H7 είναι ευαίσθητη στα κοινά αντιβιοτικά. Πιο συγκεκριμένα, όπως προκύπτει από έρευνα των Ratnam και συν.(1988), το 97% των στελεχών της είναι ευαίσθητο σε αντιβιοτικά όπως η αμπικιλίνη, η κεφαλοθίνη, η καρμπενικιλίνη, η τετρακυκλίνη, η καναμυκίνη, η γενταμικίνη, η τομπραμυκίνη, η αμικασίνη, η τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη, σουλφισοξαζόλη, το ναλιδιξικό οξύ και η νιτροφουραντοΐνη. Στην ίδια έρευνα, ποσοστό 0,5% των στελεχών ήταν ανθεκτικό στην αμπικιλίνη, στην καρμπενικιλίνη και στη σουλφισοξαζόλη και περίπου 2,2% ήταν ανθεκτικά στη σουλφισοξαζόλη και τετρακυκλίνη.

Ωστόσο, χορήγηση αντιβιοτικών σε ασθενείς με αιμορραγική κολίτιδα και με αιτιολογία την *E.coli* O157:H7 δεν φαίνεται να μειώνει τη διάρκεια της νόσου, ούτε να αποτρέπει τις επιπλοκές.

Κατά τους Riley και συν.(1983) χορήγηση αντιβιοτικών σε 11 από τους ασθενείς των πρώτων επιδημιών του μικροβίου (Η.Π.Α. 1982), και συγκεκριμένα



τετρακυκλίνη σε οκτώ ασθενείς και ερυθρομυκίνη σε τρεις, δεν μείωσε τη διάρκεια της νόσου σε σχέση με εκείνους στους οποίους δεν χορηγήθηκαν αντιβιοτικά.

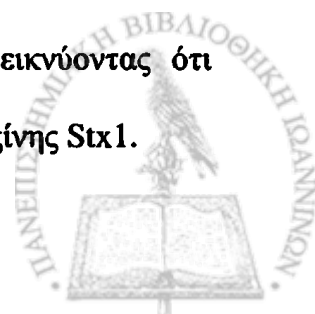
Σε άλλη επιδημία στον Καναδά, χορήγηση αντιβιοτικών όχι μόνο δεν βελτίωσε την κατάσταση των ασθενών, αλλά αύξησε τη θνησιμότητα, καθώς και τη δευτερογενή μετάδοση του μικροβίου (Carter et al, 1987).

Εξάλλου, το 1990 δόθηκε αντιμικροβιακή αγωγή σε ασθενείς με διάρροια εξαιτίας της *E.coli* O157:H7, που νοσηλευόταν σε ίδρυμα για άτομα με νοητική υστέρηση, καθώς και στο προσωπικό του ιδρύματος. Και σ' αυτήν την περίπτωση τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν (αμπικιλλίνη, σουλφοναμίδες) δεν βελτίωσαν την κλινική εικόνα των ασθενών, αντίθετα συνδέθηκαν με αύξηση των περιστατικών αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου (Pavia et al, 1990).

Στις παραπάνω περιπτώσεις μετάβαση της νόσου από αιμορραγική κολίτιδα σε αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο οφείλεται στο γεγονός, ότι η χρήση ορισμένων αντιβιοτικών έχει αποδειχτεί ότι προκαλεί έκλυση τοξινών από το μικρόβιο. Πιο συγκεκριμένα, πειράματα με *in vitro* χορήγηση αμπικιλλίνης, τριμεθοπρίμης- σουλφαμεξαζόλης, σιπροφλοξασίνης και φωσφομυκίνης σε ποσότητες ίσες με το $\frac{1}{2}$ ή $\frac{1}{4}$ του MIC, είχαν ως αποτέλεσμα σημαντική αύξηση στην παραγωγή Shiga τοξινών (Wolf et al, 1997).

Αντίθετα, οι ερευνητές Takeda και συν. (1997) υποστηρίζουν ότι χρήση του αντιβιοτικού φωσφομυκίνη κατά τη διάρκεια των τριών πρώτων ημερών της νόσου, όχι μόνο δεν αυξάνει, αλλά μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου.

Ωστόσο, τη χρήση και αυτού του αντιμικροβιακού παράγοντα αμφισβητούν κάποιοι άλλοι Ιάπωνες ερευνητές (Yoh και Honda, 1997), αποδεικνύοντας ότι προκαλεί *in vitro* αύξηση της έκλυσης από την *E.coli* O157:H7 της τοξίνης Stx1.



Γενικά μέχρι σήμερα οι επιστήμονες δεν μπορούν να απαντήσουν με βεβαιότητα, εάν η χρήση αντιβιοτικών ενδείκνυται ή όχι για τη θεραπεία των ασθενών με αιμορραγική κολίτιδα εξαιτίας της *E.coli* O157:H7.

Αυτό, που με απόλυτη βεβαιότητα μπορεί να υποστηριχθεί είναι ότι αντενδείκνυται η χορήγηση αντιδιαρροϊκών παραγόντων.

Στον Καναδά, χορήγηση αυτών των παραγόντων σε ασθενείς με αιμορραγική κολίτιδα για περισσότερες από 24 ώρες είχε ως συνέπεια την εμφάνιση αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου (Cimolai et al, 1993), ενώ οι ίδιοι ερευνητές συνδέουν τη χορήγηση αυτών των φαρμάκων και με αυξημένο κίνδυνο επιπλοκών από το ΚΝΣ (Cimolai et al, 1992).

Επίσης στις Η.Π.Α., κατά τη διάρκεια μιας επιδημίας από *E.coli* O157:H7, χορήγηση αντιδιαρροϊκών φαρμάκων όχι μόνο αύξησε τα περιστατικά αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου, αλλά ακόμη και στους ασθενείς που δεν προκάλεσε το σύνδρομο, αύξησε τη διάρκεια της αιμορραγικής διάρροιας (Bell et al, 1997).

Τέλος, απαραίτητη κρίνεται η αναπλήρωση υγρών και ηλεκτρολυτών στους ασθενείς προς αποφυγή της αφυδάτωσης και της βλάβης των νεφρών (Taap, 1995).

2.2. Αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο

Ιδιαίτερα σημαντική στη θεραπεία του αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου είναι η χορήγηση στους ασθενείς υγρών και ηλεκτρολυτών στις κατάλληλες δόσεις. Υπερβολική όμως χορήγηση μπορεί να προκαλέσει καρδιακή ανεπάρκεια και πνευμονικό οίδημα, καθώς και ηλεκτρολυτικές διαταραχές, κυρίως υπονατρίαμια, εξαιτίας της μειωμένης πειραματικής διήθησης, καθώς και της απώλειας αλάτων από το γαστρεντερικό σύστημα.



Για τη θεραπεία της κολίτιδας, η οποία συνήθως προηγείται των άλλων συμπτωμάτων, έχει ήδη γίνει αναφορά.

Ξαφνική αιμόλυση που μπορεί να συμβεί στους ασθενείς με αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο ενδέχεται να προκαλέσει δημιουργία ασβεστολίων, οπότε κρίνεται απαραίτητη η χολοκυστεκτομή (Parida et al, 1991).

Για τη θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη σε ασθενείς με προσβολή του παγκρέατος χορηγείται ινσουλίνη.

Για τις αιματολογικές διαταραχές, κυριότερες των οποίων είναι η αιμολυτική αναιμία και η αλλαγή στο σχήμα των ερυθροκυττάρων, εφαρμόζονται μεταγγίσεις τόσο ολικού αίματος όσο και παραγώγων αυτού. Μετάγγιση σε ασθενείς με αιμόλυση ενδείκνυται, όταν τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης είναι χαμηλότερα από 6 g/dL. Περίπου στο 50% των ασθενών απαιτούνται πολλαπλές μεταγγίσεις, ενώ το 20% δεν έχει ανάγκη μεταγγίσεων (Meyers et al, 1998).

Σε ασθενείς με συμπτώματα ουραιμίας, καθώς και σε εκείνους που εμφανίζουν νεφρική ανεπάρκεια, η οποία δεν μπορεί να ελεγχθεί με συντηρητική αγωγή, συνιστάται περιτοναϊκή διάλυση.

Μεταμόσχευση νεφρού είναι απαραίτητη σε ποσοστό ασθενών χαμηλότερο από 5% στη Βρετανία (Milford, 1992) και στη Ν. Αφρική (Thomson, 1992), ενώ αντίθετα κρίνεται απαραίτητη σε ποσοστό 20% των ασθενών στην Αργεντινή (Lopez et al, 1992).

Τα νευρολογικά συμπτώματα, τόσο του αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου όσο και της θρομβωτικής θρομβοπενικής πορφύρας, είναι συνήθως σοβαρά και οδηγούν σε μη αναστρέψιμες βλάβες ή θάνατο. Έλεγχος των επιληπτικών κρίσεων των ασθενών μπορεί να επιτευχθεί με χορήγηση ενδοφλεβίως διαζεπάμης ή φαινυντοΐνης.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



A. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η ανίχνευση της *E.coli* O157:H7 σε ορισμένα είδη τροφίμων ζωικής προέλευσης και ο προσδιορισμός της συχνότητάς της σε αυτά.

B. ΥΛΙΚΟ

Για τον σκοπό αυτό εξετάσθηκαν συνολικά 600 δείγματα από τις εξής κατηγορίες τροφίμων:

1) 300 δείγματα μη παστεριωμένου γάλακτος, και συγκεκριμένα 100 δείγματα αγελαδινού, 100 πρόβειου και 100 γίδινου.

2) 175 δείγματα από προϊόντα κρέατος που δεν έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία. Αναλυτικότερα, εξετάστηκαν α) 50 καταψυγμένα προμαγειρευμένα μπιφτέκια (χάμπουργκερς) από βόειο κρέας, β) 64 δείγματα από νωπό μοσχαρίσιο κιμά και γ) 61 έτοιμα σάντουιτς αλλαντικών, τα οποία περιείχαν ζαμπόν ή γαλοπούλα, μαγιονέζα ή ρωσική σαλάτα και μαρούλι.

3) 75 δείγματα αλλαντικών. Αναλυτικότερα, επρόκειτο για δείγματα χωριάτικων λουκάνικων που παρασκευάζονται από χοιρινό ή ανάμεικτο χοιρινό και μοσχαρίσιο κρέας, σκόρδο, μαύρο πιπέρι, μπαχαρικά και μυρωδικά, μέσα σε χοιρινά έντερα.



4) 50 δείγματα εντέρων χοίρων, που χρησιμοποιούνταν για την παρασκευή διαφόρων εδεσμάτων (παραδοσιακών αλλαντικών και κοκορέτσι). Το κοκορέτσι παρασκευάζεται από αρνίσια εντόσθια τυλιγμένα σε αρνίσια έντερα ή σπανιότερα σε χοιρινά έντερα.

Η δειγματοληψία των παραπάνω τροφίμων ζωικής προέλευσης έγινε ως εξής:

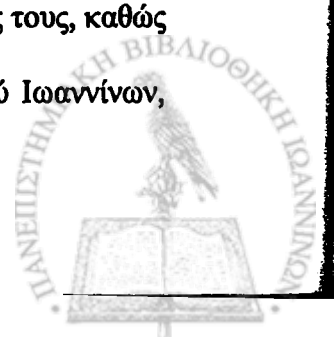
1) Τα δείγματα γάλακτος ελήφθησαν από εκτροφές ζώων των νομών Ιωαννίνων και Άρτας. Η λήψη των δειγμάτων γινόταν από τα δοχεία συλλογής του γάλακτος κάθε εκτροφής, σε αποστειρωμένους περιέκτες. Η μεταφορά των δειγμάτων γινόταν σε ισόθερμα κιβώτια με πάγο και η διάρκειά της δεν ξεπερνούσε τις δύο ώρες. Η εξέτασή τους γινόταν αμέσως μετά την άφιξή τους στο εργαστήριο.

2) Τα προμαγειρευμένα μπιφτέκια ελήφθησαν από καταστήματα λιανικής πώλησης και σούπερ-μάρκετ της πόλης των Ιωαννίνων. Η μεταφορά τους στο εργαστήριο γινόταν σε ισόθερμα κιβώτια με πάγο και η εξέτασή τους γινόταν αμέσως μετά το ξεπάγωμά τους σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα δείγματα νωπού μοσχαρίσιου κιμά ελήφθησαν από κρεοπωλεία και σούπερ-μάρκετ της πόλης των Ιωαννίνων. Η μεταφορά τους στο εργαστήριο γινόταν σε ισόθερμα κιβώτια με πάγο και η εξέτασή τους ήταν άμεση.

Τα έτοιμα σάντουιτς αλλαντικών ελήφθησαν από τα εργαστήρια παρασκευής τους και από σούπερ-μάρκετ των νομών Ιωαννίνων και Άρτας. Η μεταφορά των δειγμάτων γινόταν σε ισόθερμα κιβώτια με πάγο και η διάρκειά της δεν ξεπερνούσε τις δύο ώρες. Η εξέτασή τους γινόταν αμέσως μετά την άφιξή τους στο εργαστήριο.

3) Τα λουκάνικα ελήφθησαν από τα εργαστήρια παρασκευής τους, καθώς και από καταστήματα λιανικής πώλησης και σούπερ-μάρκετ του νομού Ιωαννίνων,



αλλά και από καταστήματα λιανικής πώλησης της Αθήνας και Θεσσαλονίκης. Η μεταφορά τους στο εργαστήριο Μικροβιολογίας γινόταν σε αποστειρωμένους περιέκτες σε ισόθερμα κιβώτια με πάγο και η εξέτασή τους γινόταν αμέσως μετά την άφιξή τους.

4) Τα δείγματα από τα έντερα των χοίρων ελήφθησαν από βιοτεχνίες παρασκευής τέτοιων τροφίμων στην πόλη των Ιωαννίνων. Η μεταφορά τους στο εργαστήριο γινόταν σε αποστειρωμένους περιέκτες και μέσα σε ισόθερμα δοχεία με πάγο και η εξέτασή τους ήταν άμεση.

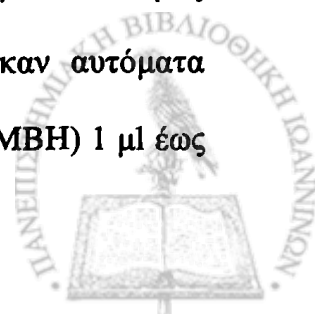
Η συλλογή των παραπάνω δειγμάτων άρχισε το Δεκέμβριο του 1999 και ολοκληρώθηκε τον Ιούνιο του 2001.

Γ. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Για την εξέταση των δειγμάτων τροφίμων και την απομόνωση της *E.coli* O157:H7 εφαρμόστηκαν δύο μέθοδοι:

- 1) Η μέθοδος του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού και στη συνέχεια μέθοδος της κλασικής καλλιέργειας, με την οποία εξετάστηκαν όλα τα δείγματα τροφίμων εκτός του γάλακτος.
- 2) Η μέθοδος της κλασικής καλλιέργειας, με την οποία εξετάστηκαν όλα τα δείγματα του γάλακτος.

Για την εξέταση όλων των δειγμάτων τροφίμων χρησιμοποιήθηκαν γυάλινες κωνικές φιάλες χωρητικότητας 100 ml έως 1 l, καθώς και ογκομετρικοί σωλήνες ίδιου όγκου. Για την παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν αυτόματα σιφώνια ρυθμιζόμενου όγκου τύπου Clinipette (Clinicon Mannheim GMBH) 1 μl έως



1 ml και αντίστοιχα πλαστικά ρύγγη μιας χρήσης. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης και γυάλινα σιφώνια χωρητικότητας 1-10 ml.

1. Ομογενοποίηση των δειγμάτων τροφίμων

Η ομογενοποίηση των τροφίμων ήταν ίδια και στις δύο μεθόδους.

Τα δείγματα του γάλακτος τοποθετούνταν σε κωνικές φιάλες μαζί με τον προεμπλουτιστικό ζωμό και ομογενοποιούνταν με απλή ανάδευση.

Τα στερεά τρόφιμα, δηλαδή τα καταψυγμένα προμαγειρευμένα μπιφτέκια, τα δείγματα του νωπού μοσχαρίσιου κιμά, τα σάντουιτς αλλαντικών και τα χωριάτικα λουκάνικα τοποθετούνταν σε ειδικές σακούλες στις οποίες προσθέτονταν ο προεμπλουτιστικός ζωμός και ομογενοποιούνταν σε συσκευή τύπου stomacher (BagMixer-Interscience).

Τα δείγματα εντέρων χοίρων τοποθετούνταν σε γυάλινα φιαλίδια μαζί με τον προεμπλουτιστικό ζωμό και ομογενοποιούνταν με ανάδευση σε συσκευή τύπου vortex.

1. Προεμπλουτισμός των δειγμάτων τροφίμων

Για τον προεμπλουτισμό των δειγμάτων χρησιμοποιείτο ζωμός Tryptic Soy Broth (TSB, bioMerieux), που είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/l):

Πεπτόνη από καζεΐνη 17,0

Πεπτόνη από σόγια 3,0

D+ Γλυκόζη 2,5

Χλωριούχο Νάτριο 5,

Όξινο φωσφορικό κάλιο 2,5.



Το pH του ζωμού ήταν $7,3 \pm 0,2$ στους 25°C . Για την παρασκευή του αναμιγνύονταν 30 g έτοιμης σκόνης σε 1 l αποσταγμένου νερού μέχρι πλήρους διάλυσης. Ακολουθούσε αποστείρωση σε αυτόκαστο στους 121°C για 15 λεπτά.

Στο παραπάνω διάλυμα μετά την αποστείρωση και την πτώση της θερμοκρασίας του στους 45°C , προσθέτονταν διάλυμα του αντιβιοτικού novobiocin (Sigma N-1628). Η αποστείρωση με διήθηση του διαλύματος του παραπάνω αντιβιοτικού γινόταν με συσκευή διήθησης υγρών (Vacuum Manifold Nalgene M46664 και Nalgene for 47 mm filter F2036). Χρησιμοποιήθηκαν μικροβιοκρατή φίλτρα αποστείρωσης με διάμετρο πόρων $0,2 \mu\text{m}$, (Supor® 200-Gelman Laboratory 9014507). Η ανάμειξη του διαλύματος του αντιβιοτικού novobiocin γινόταν σε αναδευτήρα (stirrer) τύπου Drehzahl Heidolph με τη βοήθεια ειδικού αποστειρωμένου μαγνήτη τύπου Plastilab Kartell μεγέθους $4,5 \times 15 \text{ mm}$ (Ancoretta Magnetica). Το διάλυμα του αντιβιοτικού novobiocin ήταν πυκνότητας 10 mg/ml αποσταγμένου νερού και από το διάλυμα αυτό προσθέτονταν 2 ml σε 998 ml ζωμού TSB.

Η τεχνική που ακολουθούνταν για τον προεμπλουτισμό των δειγμάτων ήταν η εξής:

2.1. Δείγματα γάλακτος

Ποσότητα 25 ml από το κάθε δείγμα γάλακτος, τοποθετείτο μέσα σε σακούλα stomacher η οποία περιείχε 225 ml ζωμού TSB με novobiocin. Κάθε σακούλα με δείγμα επωαζόταν στους 37°C για 16-18 ώρες αεροβίως.



2.2. Δείγματα κρέατος που δεν είχαν υποστεί θερμική επεξεργασία

Ποσότητα 25 γραμμαρίων από κάθε είδος των τροφίμων αυτών, δηλαδή από τα προμαγειρευμένα καταψυγμένα μπιφτέκια, τον κιμά και τα σάντουιτς αλλαντικών, τοποθετείτο σε σακούλα stomacher, η οποία περιείχε 225 ml ζωμού TSB με πονοβιοσίνη. Στη συνέχεια, κάθε σακούλα ξεχωριστά τοποθετείτο στη συσκευή stomacher για τουλάχιστον δύο λεπτά, ανάλογα με τη σύσταση του τροφίμου, μέχρι να επιτευχθεί πλήρης ομογενοποίηση του δείγματος. Η επώαση και αυτών των δειγμάτων γινόταν στους 37° C για 16-18 ώρες αεροβίως.

2.3. Δείγματα αλλαντικών

Ποσότητα 25 γραμμαρίων από κάθε δείγμα χωριάτικων λουκάνικων τοποθετείτο σε σακούλα stomacher, η οποία περιείχε 225 ml ζωμού TSB με πονοβιοσίνη. Στη συνέχεια, κάθε σακούλα ξεχωριστά τοποθετείτο στη συσκευή stomacher για τουλάχιστον δύο λεπτά, ανάλογα με τη σύσταση του τροφίμου, μέχρι να επιτευχθεί πλήρης ομογενοποίηση του δείγματος. Η επώαση και αυτών των δειγμάτων γινόταν όπως και προηγουμένως στους 37° C για 16-18 ώρες αεροβίως.

2.4. Δείγματα εντέρων χοίρων

Ποσότητα 1 gr λαμβάνονταν με απόξεση του βλεννογόνου των παχέων εντέρων με τη βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού. Η ποσότητα αυτή προσθέτονταν σε 9 ml ζωμού TSB με πονοβιοσίνη. Η επώαση γινόταν όπως και στα άλλα δείγματα, δηλαδή στους 37° C για 16-18 ώρες αεροβίως.



3. Μέθοδος της κλασικής καλλιέργειας

3.1. Θρεπτικά υποστρώματα

Για την καλλιέργεια της *E.coli* O157:H7 γινόταν ενοφθαλμισμός κάθε δείγματος τροφίμων ταυτόχρονα σε δύο θρεπτικά υποστρώματα. Το πρώτο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ήταν το Sorbitol MacConkey Agar (Oxoid CM813) με την παρακάτω σύνθεση (σε g/L):

Πεπτόνη 20,0

Σορβιτόλη 10,0

Χολικά άλατα No 3 1,5

Χλωριούχο νάτριο 5,0

Φυσικό ιώδες 0,03

Κρυσταλλικό ιώδες 0,001

Άγαρ 15,0.

Το pH του υποστρώματος ήταν $7,1 \pm 0,2$. Για την παρασκευή ενός λίτρου από το παραπάνω θρεπτικό υπόστρωμα προσθέτονταν 51,5 g έτοιμης σκόνης σε 1 l αποσταγμένου νερού και ακολουθούσε θέρμανση μέχρι πλήρους διάλυσης και αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά. Μετά την αποστείρωση, το διάλυμα τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο μέχρι η θερμοκρασία του να πέσει στους 55°C , οπότε προσθέτονταν το μείγμα των αντιβιοτικών cefixime και tellurite (Cefixime Tellurite Selective Supplement, Oxoid SR172E). Κάθε ένα από τα φιαλίδια της συσκευασίας περιείχε 1,25 mg Potassium Tellurite και 0,025 mg Cefixime, στα οποία προσθέτονταν ασήπτως 2 ml αποσταγμένο αποστειρωμένο νερό, ενώ το περιεχόμενο του φιαλιδίου προσθέτονταν σε 500 ml Sorbitol MacConkey Agar. Στη συνέχεια το θρεπτικό υπόστρωμα διανεμόταν σε τρυβλία πετρί διαμέτρου 10 cm (Vive-Anapliotis).



Το δεύτερο θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Fluorocult Agar (Merck 1.040036). Η σύνθεσή του (σε g/l) είχε ως εξής:

Πεπτόνη από καζεΐνη 20,0

Meat extract 2,0

Yeast extract 1,0

Χλωριούχο νάτριο 5,0

Σορβιτόλη 10,0

Διοξυχολικό νάτριο 1,12

Sodium thiosulfate 2,0

Ferric ammonium citrate (III) 0,5

Άγαρ-άγαρ 13,0

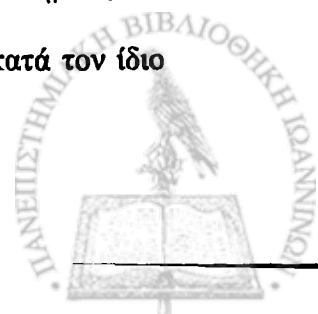
4-methyl-β-D-glucuronide 0,1

Bromothymol blue 0,025.

Το pH του παραπάνω υλικού ήταν $7,4 \pm 0,2$ στους 25°C . Για την παρασκευή του παραπάνω θρεπτικού υποστρώματος γινόταν ανάμειξη 55 g από τη σκόνη σε ένα λίτρο αποσταγμένου νερού. Ακολούθως, το υλικό θερμαινόταν μέχρι πλήρους διάλυσης και αποστειρωνόταν σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά. Τέλος διανεμόταν στα τρυβλία πετρί.

3.2. Ενοφθαλμισμός στα στερεά θρεπτικά υποστρώματα

Ο ενοφθαλμισμός κάθε δείγματος τροφίμου γινόταν με κρικοφόρο στυλεό 100 μl στα δύο θρεπτικά υποστρώματα. Αναλυτικότερα, ο ενοφθαλμισμός γινόταν ξεκινώντας από τη μία άκρη του τρυβλίου προς την απέναντι άκρη με παράλληλες γραμμές, καταλαμβάνοντας το άνω τρίτο του τρυβλίου. Από το τελευταίο σημείο, και αφού πρώτα καιγόταν ο κρικοφόρος στυλεός, γινόταν ενοφθαλμισμός κατά τον ίδιο



τρόπο με κατεύθυνση κάθετη προς την προηγούμενη. Τέλος, ακολουθούσε και πάλι κάψιμο του κρικοφόρου στυλεού και τρίτος ενοφθαλμισμός κάθετα προς τον αμέσως προηγούμενο.

3.3. Επώαση των δειγμάτων τροφίμων

Τα δείγματα των τροφίμων μετά τον ενοφθαλμισμό τους στα στερεά θρεπτικά υποστρώματα, επωάζονταν για 18-24 ώρες στους 37°C αεροβίως.

3.4. Επισκόπηση-ανάγνωση των θρεπτικών υποστρωμάτων

Ως ύποπτες θεωρούνταν οι αποικίες που στο Sorbitol MacConkey Agar ήταν άχρωμες, μικρής διαμέτρου και με ομαλή επιφάνεια. Για να διαπιστωθούν οι ύποπτες αποικίες στο Fluorocult Agar, τα τρυβλία τοποθετούνταν κάτω από ειδική λάμπα με ακτινοβολία UV (μήκος κύματος 340 nm). Ύποπτες θεωρούνταν οι αποικίες που στο υπόστρωμα αυτό ήταν πράσινου χρώματος, οι οποίες δεν παρουσίαζαν φθορισμό σε ακτινοβολία UV.

3.5. Ταυτοποίηση της *E.coli* O157:H7

3.5.1 Βιοχημική ταυτοποίηση

Η βιοχημική ταυτοποίηση έγινε με το σύστημα API 20E (bioMerieux). Με τη μέθοδο αυτή ελέγχονταν οι εξής βιοχημικές ιδιότητες: η παραγωγή των ενζύμων β-γλυκοσιδάση, δευδρολάση της αργινίνης, δεκαρβοξυλάση της λυσίνης, ουρεάση και δεαμινάση της τρυπτοφάνης, η παραγωγή υδρόθειου, και ινδόλης καθώς και η ζύμωση τηςμανιτόλης, της ινοσιτόλης, της γλυκόζης, της σορβιτόλης, της ραμνόζης, της σακχαρόζης και της μελοβιόζης.



3.5.2. Ορολογική ταυτοποίηση

Για την ορολογική ταυτοποίηση των ύποπτων αποικιών χρησιμοποιήθηκαν σωματίδια latex καλυμένα με αντιορό, ειδικά για την *E.coli* O157 (Oxoid DR 620M). Η συσκευασία των αντιορών περιείχε ένα φιαλίδιο με test latex (DR 621M), δηλαδή παραμαγνητικά σωματίδια latex σε μπλε χρώμα που έφεραν αντίσωμα ειδικό για το O157 σωματικό αντιγόνο, καθώς και ένα φιαλίδιο με control latex (DR 622M), που περιείχε σωματίδια μπλε χρώματος επίσης, καλυμμένα με άνοσο ορό κουνελιού. Επίσης στη συσκευασία περιεχόταν ένα φιαλίδιο με αδρανοποιημένο εναιώρημα κυττάρων *E.coli* O157 σε ρυθμιστικό διάλυμα (DR 623M) ως θετικός μάρτυρας και ένα εναιώρημα κυττάρων *E.coli* O116 σε ρυθμιστικό διάλυμα (DR 624M) ως αρνητικός μάρτυρας. Τέλος, στη συσκευασία συμπεριλαμβάνονταν και 35 κάρτες μιας χρήσης για την πραγματοποίηση της ορολογικής δοκιμής (DR 500G).

Για το εναιώρημα των μικροβιακών αποικιών που ελέγχονταν ορολογικά, χρησιμοποιείτο ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου (0,85 g/dl).

Για την διενέργεια της ορολογικής ταυτοποίησης, τα αντιδραστήρια μεταφέρονταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ανακινούνταν καλά με τη βοήθεια αναδευτήρα τύπου vortex. Στη συνέχεια τοποθετείτο μία σταγόνα από τον ειδικό αντιορό για την *E.coli* O157 μέσα στον κύκλο της κάρτας και κοντά στην άκρη του. Στην άλλη άκρη τοποθετείτο μία σταγόνα ισότονου διαλύματος χλωριούχου νατρίου με προσοχή ώστε να μην έρθει σε επαφή, σ' αυτό το στάδιο, με τον αντιορό. Με τη βοήθεια αποστειρωμένου κρίκου λαμβανόταν μία ύποπτη αποικία από το τρυβλίο και γινόταν πλήρης ομογενοποίησή της με το ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Στη συνέχεια, με τον ίδιο κρίκο γινόταν ανάμειξη του αντιορού με την αποικία. Ακολουθούσε αποστείρωση του κρίκου σε φλόγα και περιστροφή της κάρτας προς ανάμειξη των υγρών για λιγότερο από ένα λεπτό.



Σε περίπτωση που παρατηρείτο συγκόλληση μέσα σε χρόνο λιγότερο του ενός λεπτού, η αποικία δοκιμαζόταν και με τον άνοσο ορό κουνελιού (control latex) για να αποκλειστεί η πιθανότητα της αυτοσυγκόλλησης του στελέχους. Θετικές θεωρούνταν οι αποικίες που εμφάνιζαν συγκόλληση με τον αντιορό για την *E.coli* O157:H7 και δεν παρουσίαζαν συγκόλληση με το control latex.

3.6. Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Από καθαρή καλλιέργεια του κάθε στελέχους που απομονώθηκε, λαμβάνονταν μια έως δύο αποικίες και εναιωρούνταν σε 10 ml ισότονου διαλύματος NaCl, έτσι ώστε το εναιώρημα να έχει θολερότητα ίση με 0,5 της κλίμακας McFarland. Ακολουθούσε επίστρωση του εναιωρήματος στο θρεπτικό υπόστρωμα Mueller-Hinton (bioMerieux) με τη βοήθεια βαμβακοφόρου στυλεού. Στη συνέχεια τοποθετούνταν στο τρυβλίο δισκία (BBL) εμποτισμένα με τα εξής αντιβιοτικά: αμπικιλίνη, χλωραμφαινικόλη, καναμυκίνη, ναλιδιξικό οξύ, νορφλοξασίνη, στρεπτομυκίνη, σουλφομεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη και τετρακυκλίνη (NCCLS, 2001). Τα τρυβλία επωάζονταν για 18-24 ώρες στους 37° C και η ανάγνωση του αποτελέσματος γινόταν με τη μέτρηση των ζωνών αναστολής. Τα στελέχη χαρακτηρίζονταν ως ευαίσθητα, μέτρια ευαίσθητα ή ανθεκτικά βάσει των πινάκων που προτείνονται από την NCCLS 2001.



4. Μέθοδος του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού (Immunomagnetic Separation-IMS)

Για τη μέθοδο του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού εφαρμόστηκε ακριβώς η ίδια μεθοδολογία με εκείνη της κλασικής καλλιέργειας, με τη διαφορά ότι τα δείγματα τροφίμων μετά την επώασή τους στο υγρό προεμπλουτιστικό υλικό υφίσταντο τη διαδικασία του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού όπως αναφέρεται αναλυτικά παρακάτω. Στη συνέχεια, ακολουθούσε ο ενοφθαλμισμός στα στερεά υποστρώματα και η εξέταση των ύποπτων αποικιών όπως και στην κλασική καλλιέργεια.

4.1. Αρχή της μεθόδου

Κατά τη μέθοδο αυτή, παραμαγνητικά σωματίδια καλυμένα με αντισώματα ειδικά για την *E.coli* O157:H7 προσθέτονται στο δείγμα τροφίμων. Το βακτήριο, αν υπάρχει στο τρόφιμο, δεσμεύεται πάνω στα παραμαγνητικά σωματίδια. Ακολούθως, όλο το σύμπλοκο σωματιδίου-βακτηρίου-αντισώματος κάτω από την επίδραση μαγνητικού πεδίου απομακρύνεται από τη μικροβιακή χλωρίδα του τροφίμου και γίνεται σπορά του σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.

Η μέθοδος του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού θεωρείται σήμερα η πιο αξιόπιστη για την απομόνωση της *E.coli* O157:H7, γιατί μπορεί να ανιχνεύσει τον βακτήριο ακόμη και όταν αυτός βρίσκεται σε πολύ μικρό αριθμό μέσα στο τρόφιμο. Επίσης, ένα πλεονέκτημα της μεθόδου είναι, ότι έχει τη δυνατότητα εύκολα να απομονώσει την *E.coli* O157:H7 από την υπόλοιπη μικροβιακή χλωρίδα του τροφίμου, έτσι ώστε να αναπτυχθεί στη συνέχεια στο καλλιεργητικό υλικό.



4.2. Μεθοδολογία του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού

Για τη διενέργεια της μεθόδου αυτής χρησιμοποιήθηκαν παραμαγνητικά σωματίδια καλυμένα με αντιορό ειδικό για την *E.coli* O157:H7 (Dynabeads anti-*E.coli* O157, Dynal Prod. No.710.03), μαγνητική ράβδος, συσκευή υποδοχής των σωληναρίων erpendorf για δέκα δείγματα (Dynal MPC-M) και αναδευτήρας (Dynal MX3). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και ρυθμιστικό διάλυμα PBS-tween (Sigma No. P3563). Το τελευταίο περιείχε:

0,15 M χλωριούχο νάτριο

0,01 ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου και

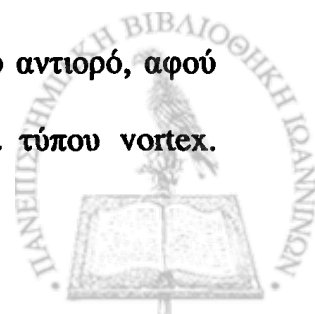
0,05% Tween-20 (Feinbiochemica-Heidelberg 37470).

Το pH του διαλύματος ήταν 7,4. Το παραπάνω διάλυμα αποστειρωνόταν σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά.

4.3. Τεχνική της μεθόδου του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού

Μετά τον προεμπλουτισμό των δειγμάτων τροφίμων και την επώασή τους, εφαρμοζόταν η μέθοδος του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού σε όλα τα δείγματα εκτός των δειγμάτων γάλακτος και στη συνέχεια ακολουθούσε ο ενοφθαλμισμός τους στα στερεά θρεπτικά υποστρώματα, όπως περιγράφηκε στη μέθοδο της κλασικής καλλιέργειας.

Για την μέθοδο του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού, χρησιμοποιούνταν σωληνάκια erpendorf χωρητικότητας 1,5 ml, στο κάθε ένα από τα οποία προσθέτονταν 20 μl από τα παραμαγνητικά σωματίδια με τον ειδικό αντιορό, αφού πρώτα ο αντιορός αναδεύονταν καλά με τη βοήθεια αναδευτήρα τύπου vortex.



Επίσης, σε κάθε σωληνάριο errendorf προστίθετο και 1 ml από το κάθε δείγμα τροφίμου μετά την επώασή του στον προεμπλουτιστικό ζωμό. Τα δείγματα τοποθετούνταν στις ειδικές θέσεις της ράβδου MPC-M, η οποία στη συνέχεια εφαρμόζονταν στην ειδική θέση του αναδευτήρα MX3 και αναδευόταν με περιστροφή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 λεπτά. Στη συνέχεια τα δείγματα απομακρύνονταν από τον αναδευτήρα και εφαρμόζονταν σ' αυτά μαγνητική ράβδος. Τα δείγματα ανακινούνταν για λίγο και στη συνέχεια αφήνονταν σε ηρεμία για τρία λεπτά. Με την εφαρμογή του μαγνητικού πεδίου, τα κύτταρα της *E.coli* O157:H7, που ενδεχομένως υπήρχαν στο τρόφιμο, δεσμεύονταν από τον αντιορό στο τοίχωμα του περιέκτη που ερχόταν σε επαφή με τη μαγνητική ράβδο. Έτσι γινόταν δυνατή η απομάκρυνση του υπολοίπου περιεχομένου σε κάθε σωληνάριο errendorf. Ακολούθως, απομακρυνόταν η μαγνητική ράβδος και προσθέτονταν 1 ml διαλύματος PBS-Tween. Εφαρμόζονταν και πάλι η μαγνητική ράβδος, οι περιέκτες ανακινούνταν ξανά όπως και προηγουμένως και αφήνονταν σε ηρεμία για τρία λεπτά. Ακολουθούσε και πάλι αφαίρεση του υγρού και επαναλαμβανόταν μία ακόμη φορά η ίδια διαδικασία με προσθήκη 1 ml διαλύματος PBS-Tween, ανακίνηση και στη συνέχεια ηρεμία και τελικά αφαίρεση, προσεκτικά, και αυτού του υγρού. Στη συνέχεια απομακρυνόταν η μαγνητική ράβδος και προσθέτονταν σε κάθε δείγμα 100 μl διαλύματος PBS-Tween. Ακολουθούσε καλή ανάδευση κάθε δείγματος σε αναδευτήρα τύπου Vortex και λαμβανόταν 50 μl για να γίνει εμβολιασμός σε CT-Sorbitol MacConkey Agar και τα υπόλοιπα 50 μl για εμβολιασμό σε Fluorocult Agar.

Ακολουθούσε επώαση των τρυβλίων κατά τον ίδιο τρόπο όπως και στην κλασική καλλιέργεια, καθώς και εξέταση των ύποπτων αποικιών βιοχημικά και ορολογικά.



5. Φαγοτυπία, ανίχνευση παραγωγής τοξινών, ταυτοποίηση βλεφαριδικού αντιγόνου.

Τα στελέχη της *E.coli* O157:H7 που απομονώθηκαν και με τις δύο μεθόδους στάλθηκαν στο Ελληνικό Κέντρο Αναφοράς για την *E.coli* O157:H7, στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Νοσοκομείου Ειδικών Παθήσεων της Θεσσαλονίκης για εξέτασή τους με τη δοκιμή της φαγοτυπίας, καθώς και για τη διαπίστωση της παρουσίας ή όχι βλεφαριδικού αντιγόνου και τη δυνατότητα παραγωγής τοξινών.

5.1. Φαγοτυπία

Τα στελέχη της *E.coli* O157:H7 που εξετάζονταν με τη μέθοδο αυτή υφίσταντο λύση από 16 φάγους. Πιο αναλυτικά, τα στελέχη του βακτηρίου ενοφθαλμιζόνταν σε Nutrient Agar και επωάζονταν στους 37° C για 18 ώρες. Ακολούθως μια αποικία ενοφθαλμιζόνταν σε Difco broth και επωάζονταν σε υδατόλουτρο στους 37° C για 2-3 ώρες. Στη συνέχεια η καλλιέργεια της *E.coli* O157:H7 ενοφθαλμιζόταν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Difco Agar) στο οποίο ενοφθαλμιζόνταν και οι φάγοι. Ακολουθούσε επώαση στους 37° C για 18 ώρες και ανάγνωση του αποτελέσματος της λύσης.

5.2. Ανίχνευση παραγωγής τοξινών

Η ανίχνευση παραγωγής τοξινών των στελεχών της *E.coli* O157:H7 γινόταν με τη μέθοδο της PCR η οποία χρησιμοποιεί εκκινητές (primers) ειδικούς για τις τοξίνες Stx1 και Stx2.



5.3. Ταυτοποίηση του βλεφαριδικού αντιγόνου

Η ταυτοποίηση του βλεφαριδικού αντιγόνου γινόταν με σωματίδια latex καλυμμένα με αντιορό ειδικό για το βλεφαριδικό αντιγόνο H7.

6. Εξέταση δειγμάτων κοπράνων ζώων

Παράλληλα με την αναζήτηση της *E.coli* O157:H7 στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, διεξήχθη έρευνα προκειμένου να προσδιοριστεί η συχνότητα απομόνωσης του βακτηρίου και στα ζώα. Αναλυτικότερα, εξετάστηκαν 351 δείγματα κοπράνων ζώων και πιο συγκεκριμένα:

- 1) 171 δείγματα κοπράνων προβάτων
- 2) 81 δείγματα κοπράνων αιγών
- 3) 99 δείγματα κοπράνων αγελάδων.

Για την εξέταση αυτών των δειγμάτων εφαρμόστηκε η μέθοδος της κλασικής καλλιέργειας, βιοχημική και ορολογική ταυτοποίηση, φαγοτυπία, ανίχνευση παραγωγής τοξινών και ταυτοποίηση του βλεφαριδικού αντιγόνου, όπως έχουν ήδη περιγραφεί.



Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (πίνακας 6) απομονώθηκαν τρία στελέχη της *E.coli* O157. Αναλυτικότερα, ένα στέλεχος απομονώθηκε από πρόβειο μη παστεριωμένο γάλα, ένα από χωριάτικο λουκάνικο και ένα από τα έντερα χοίρων (κοκορέτσι). Και τα τρία στελέχη ήταν σορβιτόλη-αρνητικά, MUG-αρνητικά, έφεραν το βλεφαριδικό αντιγόνο H7 και παρήγγαν και τις δύο τοξίνες. Με τη μέθοδο της φαγοτυπίας αποκαλύφθηκε ότι το στέλεχος του γάλακτος ανήκε στο φαγότυπο 21/28, ενώ τα άλλα δύο στο φαγότυπο 21. Και τα τρία στελέχη που απομονώθηκαν ήταν ευαίσθητα και στα οκτώ αντιβιοτικά, στα οποία δοκιμάστηκαν.

Από τις υπόλοιπες σορβιτόλη-αρνητικές ή MUG-αρνητικές αποικίες ταυτοποιήθηκαν τα παρακάτω στελέχη με τη μέθοδο API: *Rahnella aquatilis*, *Enterobacter cloacae* (sorbitol+), *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter cancerogenus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Citrobacter braaki*, *Acinetobacter baumannii*, *Serratia liquefaciens*.

Επίσης, δύο στελέχη που απομονώθηκαν από χωριάτικα λουκάνικα, θετικά στη σορβιτόλη και MUG-αρνητικά, εμφάνισαν ψευδοκροκιδώση στον αντιορό και με τη μέθοδο API διαπιστώθηκε ότι επρόκειτο για *Citrobacter freundii*.



Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής αποκαλύπτουν, ότι το ποσοστό ανίχνευσης της *E.coli* O157:H7 στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης ανέρχεται σε ποσοστό 0,5% επί του συνόλου των 600 εξετασθέντων δειγμάτων.

Πιο συγκεκριμένα τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας ανά κατηγορία τροφίμων έχουν ως εξής:

1) Από τα 300 δείγματα μη παστεριωμένου γάλακτος που εξετάστηκαν απομονώθηκε ένα στέλεχος της *E.coli* O157:H7 (ποσοστό θετικών 0,3%).

2) Από τα 175 δείγματα κρεάτων που δεν είχαν υποστεί θερμική επεξεργασία δεν απομονώθηκε κανένα στέλεχος του βακτηρίου (0%).

3) Από τα 75 δείγματα των αλλαντικών απομονώθηκε ένα στέλεχος της *E.coli* O157:H7 (1,3%).

4) Από τα 50 δείγματα εντέρων χοίρων απομονώθηκε ένα στέλεχος της *E.coli* O157:H7 (2%).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6. Συχνότητα απομόνωσης της *E.coli* O157:H7 ανά κατηγορία τροφίμων.

Κατηγορία τροφίμων	Αρ. δειγμάτων	Αρ. στελεχών	Ποσοστό
Γάλα	300	1	0,3%
Κρέατα χωρίς θερμική επεξεργασία	175	0	0%
Αλλαντικά	75	1	1,3%
Έντερα χοίρων (κοκορέτσι)	50	1	2%
Σύνολο	600	3	0,5%



Αναλύοντας τα παραπάνω αποτελέσματα και ανά είδος τροφίμου, προκύπτουν τα εξής:

1) Από τα 100 δείγματα μη παστεριωμένου αγελαδινού γάλακτος που εξετάστηκαν δεν απομονώθηκαν στελέχη της *E.coli* O157:H7 (0%).

2) Από τα 100 δείγματα μη παστεριωμένου πρόβειου γάλακτος απομονώθηκε ένα στέλεχος του βακτηρίου (1%).

3) Από τα 100 δείγματα μη παστεριωμένου γίδινου γάλακτος δεν απομονώθηκε κανένα στέλεχος (0%).

4) Από τα 50 κατεψυγμένα προμαγειρευμένα μπιφτέκια (χάμπουργκερς) δεν απομονώθηκαν στελέχη του βακτηρίου (0%).

5) Από τα 64 δείγματα νωπού μοσχαρίσιου κιμά δεν απομονώθηκε κανένα στέλεχος του βακτηρίου (0%).

6) Από τα 61 δείγματα σάντουιτς αλλαντικών δεν απομονώθηκαν στελέχη του βακτηρίου (0%).

7) Από τα 75 δείγματα χωριάτικων λουκάνικων απομονώθηκε ένα στέλεχος του βακτηρίου (1,3%).

8) Τέλος, από τα 50 δείγματα παραδοσιακών αλλαντικών και το κοκορέτσι απομονώθηκε ένα στέλεχος του βακτηρίου (2%).

Τα αποτελέσματα της έρευνας ανά είδος τροφίμου παρουσιάζονται στον πίνακα 7.



Πίνακας 7. Συχνότητα απομόνωσης της *E.coli* O157:H7 ανά είδος εξετασθέντων τροφίμων.

Είδος δείγματος	Αρ.δειγμάτων	Αρ.στελεχών	Ποσοστό
Αγελαδινό γάλα	100	0	0%
Πρόβειο γάλα	100	1	1%
Γίδινο γάλα	100	0	0%
Σάντουιτς αλλαντικών	61	0	0%
Χάμπουργκερς	50	0	0%
Μοσχαρίσιος κιμάς	64	0	0%
Χωριάτικα λουκάνικα	75	1	1,3%
Έντερα χοίρων (κοκορέτσι)	50	1	2%
Σύνολο	600	3	0,5%

Τα χαρακτηριστικά των στελεχών της *E.coli* O157:H7 που απομονώθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8. Χαρακτηριστικά των στελεχών της *E.coli* O157:H7 που απομονώθηκαν.

Είδος δείγματος τροφίμου	Ζύμωση σορβιτόλης	MUG	VT1	VT2	Φάγος	Συγκόλληση με αντιορό
Πρόβειο γάλα	-	-	+	+	21/28	+
Λουκάνικο	-	-	+	+	21	+
Έντερο χοίρου	-	-	+	+	21	+



Οι κυριότερες βιοχημικές ιδιότητες των απομονωθέντων στελεχών της *E.coli* O157:H7 παρουσιάζονται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9. Βιοχημικές ιδιότητες των απομονωθέντων στελεχών της *E.coli* O157:H7.

Είδος δείγματος	Γλυκόζη	Ινδόλη	Ουρεάση	Κινητικότητα
Πρόβειο γάλα	+	+	-	H7
Λουκάνικο	+	+	-	H7
Έντερο χοίρου	+	+	-	H7

Τα αποτελέσματα της δοκιμής ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών της *E.coli* O157:H7 που απομονώθηκαν, παρουσιάζονται στον πίνακα 10.

Πίνακας 10. Αποτελέσματα της δοκιμής ευαισθησίας σε οκτώ αντιβιοτικά των στελεχών της *E.coli* O157:H7 ανάλογα με την προέλευσή τους.

Αντιβιοτικό	Στέλεχος από πρόβειο γάλα	Στέλεχος από λουκάνικο	Στέλεχος από έντερο χοίρου
Αμπικιλίνη	E	E	E
Χλωραμφαινικόλη	E	E	E
Καναμυκίνη	E	E	E
Ναλιδιξικό οξύ	E	E	E
Νορφλοξασίνη	E	E	E
Στρεπτομυκίνη	E	E	E
Σουλφομεθοξαζόλη-τριμεθοπρίνη	E	E	E
Τετρακυκλίνη	E	E	E

E: Ευαίσθητο



Τα αποτελέσματα της εξέτασης των δειγμάτων κοπράνων ζώων παρουσιάζονται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11. Συχνότητα απομόνωσης της *E.coli* O157:H7 από κόπρανα ζώων.

Είδος δείγματος	Αρ.εξετασθέντων	Αρ.απομονωθέντων στελεχών	Ποσοστό θετικών (%)
Κόπρανα προβάτων	171	0	0
Κόπρανα γιδιών	81	1	1,2
Κόπρανα αγελάδων	99	0	0
Σύνολο	351	1	0,28

Το στέλεχος που απομονώθηκε από τα κόπρανα αίγας ήταν επίσης ευαίσθητο σε όλα τα παραπάνω αντιβιοτικά.

Τέλος, στον πίνακα 12 παρουσιάζεται σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτής της εργασίας με αντίστοιχες εργασίες από χώρες του εξωτερικού.



Πίνακας 12. Σύγκριση ποσοτών απομόνωσης της *E.coli* O157:H7 από τρόφιμα ζωικής προέλευσης ανά χώρα

Χώρα	Ποσοστό απομόνωσης (%)	Επίπεδο σημαντικότητας (p)	Σύγκριση με την παρούσα εργασία	Βιβλ.αναφορά
Γαλλία	2,4	0,014	Δεν διαφέρουν	Vernozy-Rozand et al, 1997
Γαλλία	1,8	0,04	»	Vernozy-Rozand et al, 1998
Γερμανία	0,3	0,78	»	Klie et al, 1997
Δανία	0,33	0,5	»	Boel et al, 1997
Ολλανδία	1,09	0,2	»	Heuvelink et al, 1999β
Βρετανία	0,11	0,02	»	Little et al, 1998
Βρετανία	0,5	0,9	»	Little et al, 1999β
Βρετανία	1,43	0,06	»	Chapman et al, 2000
Ιρλανδία	1,06	0,34	»	Duffy et al, 1999
Ελβετία	0	0,15	»	Fantelli et al, 2001
Κροατία	0	0,44	»	Uhitil et al, 2001
Σκωτία	0,08	0,03	»	Coia et al, 2001
Σλοβακία	9,2	<0,01	Διαφέρουν	Pilipcinec et al, 1999
Η.Π.Α.	0,67	0,68	Δεν διαφέρουν	Doyle και Schoeni, 1987
Η.Π.Α.	0	0,57	»	Ansay και Kaspar, 1997
Η.Π.Α.	1,13	0,18	»	Samadpour et al, 1998
Η.Π.Α.	1,46	0,08	»	Murinda et al, 2002
Καναδάς	0	0,06	»	Read et al, 1990
Βραζιλία	0	0,35	»	Silveira et al, 1999
Αίγυπτος	5,14	<0,01	Διαφέρουν	Abdul-Raouf et al, 1996
Κίνα	4,29	»	»	Zhou et al, 1997
Κολομβία	8,67	»	»	Mattar και Vasquez, 1998
Μαλαισία	36	»	»	Radu et al, 1998
Ταϊλάνδη	4,21	»	»	Vuddhakul et al, 2000



Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής, η συχνότητα εμφάνισης της *E.coli* O157:H7 σε διάφορα είδη τροφίμων ζωικής προέλευσης στη χώρα μας είναι αρκετά χαμηλή.

Συγκεκριμένα, από τα συνολικά 600 δείγματα τροφίμων που εξετάστηκαν, απομονώθηκαν τρία στελέχη από το συγκεκριμένο ορότυπο (ποσοστό 0,5%). Το μεγαλύτερο ποσοστό εμφανίζει η κατηγορία των εδεσμάτων που παρασκευάζονται από έντερα χοίρων (2%), ακολουθεί η κατηγορία των αλλαντικών (1,3%) και τέλος του μη παστεριωμένου γάλακτος (0,3%), ενώ κανένα στέλεχος δεν απομονώθηκε από τα ωμά κρέατα.

Αναλύοντας τα αποτελέσματα ανά είδος τροφίμου, γίνεται φανερό ότι το μεγαλύτερο ποσοστό θετικότητας ως προς την *E.coli* O157:H7 εμφανίζουν τα παραδοσιακά εδέσματα (κοκορέτσι), με ένα στέλεχος από τα 50 δείγματα που εξετάστηκαν (2%) και ακολουθούν τα λουκάνικα με ένα επίσης στέλεχος στα 75 που εξετάστηκαν (1,3%) και το μη παστεριωμένο πρόβειο γάλα με ένα στέλεχος στα 100 εξετασθέντα δείγματα (1%)

Αντίθετα, από τα υπόλοιπα είδη τροφίμων, δηλαδή το μη παστεριωμένο αγελαδινό και γίδινο γάλα, τα έτοιμα σάντουιτς αλλαντικών, τα προμαγειρευμένα μπιφτέκια (hamburgers) και το νωπό μοσχαρίσιο κιμά δεν απομονώθηκε κανένα στέλεχος της *E.coli* O157:H7.

Στην Ελλάδα η μοναδική μέχρι σήμερα παρόμοια μελέτη ως προς τη συχνότητα ανεύρεσης της *E.coli* O157:H7 σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης,



διεξήχθη από τους Κανσουζίδου και συν. το 1994, στο Νοσοκομείο Ειδικών Παθήσεων Θεσσαλονίκης. Στην έρευνα αυτή εξετάσθηκαν 70 δείγματα νωπού μοσχαρίσιου κιμά και 17 δείγματα καταψυγμένου, με τη μέθοδο της κλασικής καλλιέργειας, αλλά δεν απομονώθηκε κανένα στέλεχος του βακτηρίου.

Αντίθετα, στην υπόλοιπη Ευρώπη, όπου έχουν εμφανιστεί πολλές επιδημίες εξαιτίας της *E.coli* O157:H7 μετά από κατανάλωση τροφίμων ζωικής προέλευσης, έχουν διεξαχθεί πολλές έρευνες για να προσδιοριστεί το ποσοστό μόλυνσης των τροφίμων αυτών.

Συγκεκριμένα, στην Ισπανία οι Blanco και συν. (1996β), εξέτασαν 58 δείγματα μοσχαρίσιου κρέατος και απομόνωσαν τρία στελέχη του βακτηρίου (5%).

Στη Γαλλία οι Vernozzy-Rozand και συν. (1997) εξέτασαν 250 δείγματα από ωμά τυριά, κοτόπουλα, λουκάνικα και μοσχαρίσιο κρέας και απομόνωσαν έξι στελέχη της *E.coli* O157:H7 (ποσοστό θετικότητας 2,4%) και ειδικότερα τέσσερα στελέχη από τα κοτόπουλα, ένα από τα λουκάνικα και ένα από το μοσχαρίσιο κρέας.

Στη Γερμανία, οι Klie και συν. (1997) εξέτασαν 273 δείγματα από δύο τύπους ωμού γάλακτος, από τα οποία απομόνωσαν ένα μόνο στέλεχος του βακτηρίου (0,3%).

Στην Αυστρία, οι Allerberger και Dierich (1997) εξέτασαν δείγματα μη παστεριωμένου γάλακτος και μοσχαρίσιου κρέατος από τα οποία απομόνωσαν την *E.coli* O157:H7 σε ποσοστό 3% και 10% αντίστοιχα.

Στη Δανία, οι Boel και συν. (1997) εξέτασαν 1584 δείγματα μοσχαρίσιου κιμά και 528 δείγματα χοιρινού κιμά. Από τα τρόφιμα αυτά απομόνωσαν συνολικά επτά στελέχη της *E.coli* O157:H7 (0,3%).

Στη Γαλλία, οι Vernozzy-Rozand και συν. (1998) εξέτασαν 496 δείγματα από ωμά τυριά, κοτόπουλα, λουκάνικα και μοσχαρίσιο κρέας, από τα οποία απομόνωσαν εννέα στελέχη (1,8%).



Στην Ολλανδία οι Heuvelink και συν.(1998β) εξέτασαν 1011 δείγματα μη παστεριωμένου αγελαδινού γάλακτος χωρίς να απομονώσουν κάποιο στέλεχος του βακτηρίου.

Στη Βρετανία, οι Little και De Louvois (1998) εξέτασαν 2330 δείγματα ωμών κρεάτων και 2192 μαγειρευμένων. Από τα ωμά κρέατα απομόνωσαν τρία στελέχη της *E.coli* O157:H7 (0,12%), ενώ από τα μαγειρευμένα δύο στελέχη (0,09%).

Στη Βρετανία, οι ίδιοι ερευνητές (1999α) εξέτασαν 100 δείγματα γίδινου και 26 δείγματα πρόβειου γάλακτος, αλλά δεν απομόνωσαν κανένα στέλεχος της *E.coli* O157:H7.

Στην ίδια χώρα, οι Little και συν. (1999β) εξέτασαν 183 δείγματα από διάφορα κρέατα σε κρεοπωλεία, από όπου απομόνωσαν ένα στέλεχος του βακτηρίου (0,5%).

Στη Σλοβακία, οι Pilircinac και συν. (1999) εξέτασαν 216 δείγματα κοτόπουλων. Απομόνωσαν 20 στελέχη *E.coli* O157:H7, ποσοστό ιδιαίτερα υψηλό (9,2%).

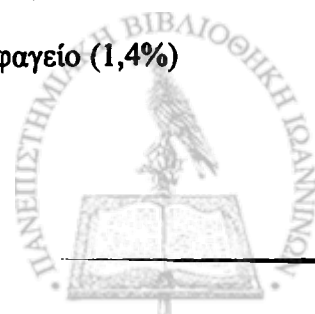
Στην Ολλανδία, οι Heuvelink και συν. (1999β) εξέτασαν 571 δείγματα μοσχαρίσιου κιμά, 402 ανάμεικτου μοσχαρίσιου και χοιρινού κιμά, 76 χοιρινού, 393 ωμά χοιρινά προϊόντα και 328 προμαγειρευμένα κρέατα από διάφορα καταστήματα πώλησης. Από τα τρόφιμα αυτά απομόνωσαν έξι στελέχη της *E.coli* O157:H7 από το μοσχαρίσιο κιμά (ποσοστό 1,1%), δύο στελέχη από τον ανάμεικτο κιμά (0,5%), 1 από τον χοιρινό κιμά (1,3%), ένα από τα ωμά χοιρινά προϊόντα (0,3%) και ένα από τα προμαγειρευμένα τρόφιμα (0,3%). Αντίθετα, άλλα προϊόντα μοσχαρίσιου κρέατος, καθώς και κοτόπουλα, αρνίσιο και πρόβειο κρέας και κρέας άγριων ζώων ήταν αρνητικά ως προς το βακτήριο.



Στην Ιρλανδία, οι Duffy και συν. (1999) εξέτασαν 71 δείγματα μοσχαρίσιου κιμά, 32 χάμπουργκερς, 31 δείγματα ζαμπόν, 32 κορν-μπιφ, 30 ροζμπίφ, 30 πεπερόνι, και 56 δείγματα από σαλάμι. Κατά την έρευνα αυτή απομόνωσαν μόνο τρία στελέχη της *E.coli* O157:H7, από τα εξετασθέντα δείγματα σαλαμιού (5,3%).

Στη Βρετανία, οι Charman και συν. (2000) εξέτασαν 3216 δείγματα από προϊόντα μοσχαρίσιου κρέατος και 1320 δείγματα από προϊόντα χοιρινού κρέατος. Από αυτά απομόνωσαν 36 στελέχη του μικροβίου από το μοσχαρίσιο κρέας (ποσοστό 1,1%) και 29 στελέχη από το χοιρινό κρέας (2,19%). Πιο συγκεκριμένα, εξέτασαν 1120 δείγματα από μοσχαρίσια προμαγειρευμένα μπιφτέκια (hamburgers), από τα οποία απομόνωσαν 13 στελέχη της *E.coli* O157 (1,2%), 2075 δείγματα μοσχαρίσιου κιμά με θετικά 23 δείγματα (1,1%) και 21 δείγματα μοσχαρίσιων λουκάνικων, χωρίς να απομονώσουν στέλεχος του βακτηρίου (0%). Από τα προϊόντα αρνίσιου κρέατος, εξέτασαν 484 δείγματα προμαγειρευμένων μπιφτεκιών με ποσοστό θετικών 3,7%, 463 δείγματα αρνίσιου κιμά με ποσοστό θετικών 1,7% και 73 δείγματα λουκάνικων με θετικό το 4,1%. Τέλος, εξέτασαν 80 δείγματα προμαγειρευμένων μπιφτεκιών από ανάμεικτο κρέας, με ποσοστό θετικών 1,3%, 526 δείγματα από ανάμεικτο κιμά με θετικό το 1% και 251 λουκάνικα από ανάμεικτο κρέας με ποσοστό θετικών 0,4%. Το υψηλότερο ποσοστό θετικότητας ως προς την *E.coli* O157:H7 εμφάνιζαν τα λουκάνικα από αρνίσιο κρέας (4,1%) και τα μπιφτέκια από αρνίσιο κρέας, με ποσοστό 3,7%.

Στη Βρετανία, επίσης, οι Charman και συν. (2001) εξέτασαν 1500 δείγματα αρνίσιου κρέατος και 1500 δείγματα μοσχαρίσιου κρέατος στο σφαγείο, καθώς και 4983 δείγματα από ωμά προϊόντα κρέατος από καταστήματα πώλησης. Από αυτά απομόνωσαν στελέχη της *E.coli* O157:H7 από 10 δείγματα αρνίσιου κρέατος στο σφαγείο (ποσοστό 0,7%), από 21 δείγματα μοσχαρίσιου κρέατος στο σφαγείο (1,4%)



και από 22 ωμά προϊόντα κρέατος (0,44%). Από τα τελευταία τα προϊόντα αρνίσιου κρέατος ήταν θετικά σε ποσοστό 0,8%, ενώ τα υπόλοιπα προϊόντα κρέατος σε ποσοστό 0,4%.

Στην Ελβετία, οι Fantelli και Stephan (2001) εξέτασαν 211 δείγματα μοσχαρίσιου κιμά και 189 δείγματα χοιρινού κιμά, χωρίς να απομονώσουν στελέχη της *E.coli* O157:H7.

Στην Κροατία, επίσης, δεν απομονώθηκε στέλεχος του βακτηρίου κατά την εξέταση 114 δειγμάτων μοσχαρίσιου και χοιρινού κρέατος (Uhitil et al, 2001).

Στη Σκωτία, οι Coia και συν. (2001) εξέτασαν 1190 δείγματα ωμού μοσχαρίσιου κρέατος από τα οποία απομόνωσαν δύο στελέχη του βακτηρίου. Αντίθετα, κανένα από τα 500 δείγματα νωπού αγελαδινού γάλακτος, καθώς και τα 739 δείγματα νωπών τυριών που εξετάστηκαν δεν ήταν μολυσμένα με την *E.coli* O157.

Τέλος, στη Βρετανία, οι Little και συν. (2001), εξέτασαν 3128 δείγματα έτοιμων προμαγειρευμένων μπιφτεκιών (burgers) από διάφορα καταστήματα λιανικής πώλησης, από τα οποία δεν απομόνωσαν κανένα στέλεχος της *E.coli* O157:H7.

Αντίστοιχες έρευνες έχουν διεξαχθεί και στις Η.Π.Α. σε διάφορα είδη τροφίμων.

Πρώτοι οι Doyle και Schoeni (1987) εξέτασαν 164 δείγματα μοσχαρίσιου κρέατος, 264 δείγματα χοιρινού, 263 δείγματα κοτόπουλου και 205 δείγματα αρνίσιου κρέατος. Από αυτά απομόνωσαν έξι στελέχη *E.coli* O157:H7 από το μοσχαρίσιο κρέας (3,7%), τέσσερα στελέχη από το χοιρινό κρέας (1,5%), τέσσερα στελέχη από το κοτόπουλο (1,5%) και τέσσερα στελέχη από το κρέας αρνιών (2%).



Οι Ansay και Kaspar (1997) εξέτασαν 19 δείγματα από μαλακά και ημίσκληρα τυριά και 42 δείγματα γάλακτος, χωρίς να απομονώσουν κανένα στέλεχος του βακτηρίου.

Οι Samadpour και συν. (1998) εξέτασαν 1238 δείγματα μοσχαρίσιου κρέατος για διάφορα παθογόνα εντεροβακτηριοειδή. Στην έρευνα απομόνωσαν μεταξύ των άλλων και 14 στελέχη της *E.coli* O157:H7 (1,1%).

Αντίθετα, οι Taft και συν. (1999), εξετάζοντας 1400 δείγματα μοσχαρίσιου κρέατος δεν απομόνωσαν κανένα στέλεχος του βακτηρίου.

Οι Jayarao και Henning (2001) εξέτασαν 131 δείγματα αγελαδινού γάλακτος από τους κάδους συλλογής αντίστοιχων εκτροφών. Από τα δείγματα αυτά δεν απομόνωσαν κανένα στέλεχος της *E.coli* O157:H7.

Τέλος, οι Muringa και συν. (2002) εξέτασαν 683 δείγματα αγελαδινού γάλακτος, επίσης από κάδους συλλογής των εκτροφών. Απομονώθηκαν συνολικά δέκα στελέχη του βακτηρίου (1,46%).

Έρευνες για τον προσδιορισμό της συχνότητας της *E.coli* O157:H7 στα τρόφιμα έχουν διεξαχθεί και σε άλλες χώρες.

Συγκεκριμένα, στον Καναδά οι Read και συν. (1990) εξέτασαν 225 δείγματα μοσχαρίσιου κρέατος, 235 χοιρινού και 200 κοτόπουλου. Απομόνωσαν εντεροαιμορραγικά στελέχη της *E.coli* σε ποσοστό 10,4% του μοσχαρίσιου κρέατος, 3,8% του χοιρινού, ενώ ήταν αρνητικά όλα τα δείγματα του κοτόπουλου. Ωστόσο, κανένα από τα στελέχη που απομόνωσαν δεν ανήκε στον ορότυπο O157:H7.

Στην Αίγυπτο οι Abdul-Raouf και συν. (1996) εξέτασαν 50 δείγματα μοσχαρίσιου κρέατος, 50 δείγματα κοτόπουλου, 25 δείγματα κρέατος αρνιού και 50 δείγματα γάλακτος. Συνολικά απομόνωσαν εννέα στελέχη του βακτηρίου, τρία από το



μοσχαρίσιο κρέας (6%), δύο από το κοτόπουλο (4%), ένα από το κρέας αρνιού (4%) και τρία από το γάλα (6%).

Στην Κίνα οι Zhou και συν. (1997) εξέτασαν 40 δείγματα μοσχαρίσιου κρέατος και 30 χοιρινού. Απομόνωσαν δύο στελέχη του βακτηρίου από το μοσχαρίσιο κρέας (5%) και ένα στέλεχος από το χοιρινό κρέας (3,3%).

Στην Κολομβία οι Mattar και Vásquez (1998) εξέτασαν 150 δείγματα από μοσχαρίσια μπιφτέκια και απομόνωσαν 13 στελέχη του βακτηρίου (8,7%).

Στην Αυστραλία οι Vanderlinde και συν. (1998) εξέτασαν 1063 δείγματα από ωμό μοσχαρίσιο κρέας και 929 δείγματα από καταψυγμένο μοσχαρίσιο κρέας. Από τα εξετασθέντα δείγματα βρέθηκε ποσοστό θετικού ωμού κρέατος 0,45% και θετικό καταψυγμένο κρέας σε ποσοστό 0,38%.

Στη Μαλαισία οι Radu και συν. (1998) εξέτασαν 25 δείγματα από μοσχαρίσιο κρέας. Τα στελέχη που απομόνωσαν ήταν αξιοσημείωτα πολλά (εννέα θετικά στελέχη, ποσοστό 36%).

Στη Βραζιλία οι Silveira και συν. (1999) εξέτασαν 886 προμαγειρευμένα μπιφτέκια (hamburgers), αλλά δεν απομόνωσαν κανένα στέλεχος της *E.coli* O157:H7.

Στην Ταϊλάνδη οι Vuddhakul και συν. (2000) εξέτασαν 95 δείγματα μοσχαρίσιου κρέατος από τα οποία απομόνωσαν τέσσερα στελέχη του βακτηρίου (2,4%).

Τέλος, στην Αργεντινή οι Chinen και συν. (2001) εξέτασαν 160 δείγματα ωμού μοσχαρίσιου κρέατος, 83 νωπά λουκάνικα, 30 αποξηραμένα λουκάνικα και πέντε χάμπουργκερς. Από αυτά, 3,8%, 4,8%, 3,3% και 0% αντίστοιχα, ήταν θετικά για το βακτήριο.



Αναλύοντας ένα ένα τα εξετασθέντα είδη τροφίμων στην παρούσα μελέτη και συγκρινοντάς τα με τις αντίστοιχες μελέτες των άλλων ερευνητών, θα μπορούσαμε να πούμε ότι:

Το μη παστεριωμένο αγελαδινό γάλα, φαίνεται ότι στις αναπτυγμένες χώρες σπάνια είναι μολυσμένο με *E.coli* O157:H7. Συγκεκριμένα, κανένα από τα 42 δείγματα νωπού αγελαδινού γάλακτος που εξετάστηκαν στις Η.Π.Α. (Ansary και Kaspar, 1997), κανένα από τα 1011 δείγματα στην Ολλανδία (Heuvelink et al, 1998β), καθώς και κανένα από τα 500 δείγματα στη Σκωτία (Coia et al, 2001), δεν βρέθηκε μολυσμένο με το συγκεκριμένο ορότυπο. Επίσης, κανένα από τα 131 δείγματα γάλακτος που λήφθηκαν από κάδους συλλογής γάλακτος σε εκτροφές των Η.Π.Α.(όπως και στην παρούσα εργασία), δεν βρέθηκε θετικό για το βακτήριο (Jayarao και Henning, 2001), ενώ στην ίδια χώρα απομονώθηκαν δέκα στελέχη της *E. coli* O157:H7 από τα 683 δείγματα αγελαδινού γάλακτος που εξετάστηκαν (1,46%), σύμφωνα με έρευνα των Murinda και συν. (2002). Χαμηλό ήταν και το ποσοστό ανεύρεσης του βακτηρίου σε έρευνα των Klie και συν. (1997) στη Γερμανία, όπου εξετάστηκαν 273 δείγματα νωπού αγελαδινού γάλακτος, από τα οποία 0,3% ήταν μολυσμένα με την *E.coli* O157:H7. Στην Αυστρία, το ποσοστό των θετικών δειγμάτων ήταν κάπως υψηλότερο (3%) σε έρευνα των Allerberger και Dierich (1997), ενώ πολύ υψηλότερο ήταν στην Αίγυπτο (6% από τα 50 εξετασθέντα δείγματα) (Abdul-Raouf et al, 1996). Στην παρούσα εργασία, κανένα από τα 100 δείγματα νωπού αγελαδινού γάλακτος που εξετάστηκαν δεν βρέθηκε μολυσμένο από την *E.coli* O157:H7, όπως συνέβη και με τις άλλες αναπτυγμένες χώρες όπου πραγματοποιήθηκαν παρόμοιες έρευνες.

Για το νωπό πρόβειο γάλα είναι περιορισμένα τα στοιχεία που έχουμε από τη διεθνή βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, μία μόνο έρευνα έχει πραγματοποιηθεί στη



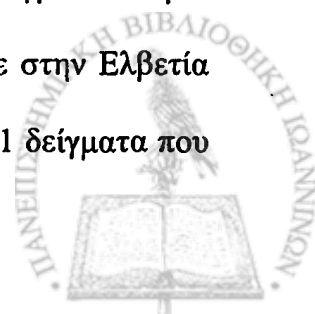
Βρετανία από τους Little και de Louvois (1999α) σε 26 δείγματα πρόβειου γάλακτος, από τα οποία δεν απομονώθηκε κανένα στέλεχος του μικροβίου. Στην παρούσα εργασία, από τα 100 εξετασθέντα δείγματα απομονώθηκε ένα στέλεχος της *E.coli* O157:H7 (1%).

Στην ίδια έρευνα των Little και de Louvois (1999) κανένα από τα 100 εξετασθέντα δείγματα νωπού γίδινου γάλακτος δεν βρέθηκε μολυσμένο από την *E.coli* O157:H7, όπως ακριβώς και στην παρούσα εργασία.

Όσον αφορά στα χοιρινά λουκάνικα, στην Αργεντινή οι Chinen και συν. (2001) αναφέρουν ποσοστό θετικών ως προς την *E.coli* O157:H7 4,8% από τα 83 εξετασθέντα νωπά λουκάνικα και 3,3% από τα 30 αποξηραμένα. Στη δική μας έρευνα, το ποσοστό ήταν χαμηλότερο, 1,3%.

Για τα προμαγειρευμένα μπιφτέκια (hamburgers), έρευνα στην Κολομβία (Mattar και Vásquez, 1998), αποκαλύπτει αξιοσημείωτα υψηλό ποσοστό θετικών δειγμάτων (8,7%). Στη Βρετανία (Charman et al, 2000), ποσοστό 1,2% από τα 1120 μοσχαρίσια μπιφτέκια που εξετάστηκαν βρέθηκε μολυσμένο από την *E.coli* O157:H7, ενώ στην ίδια χώρα κανένα από τα 3128 εξετασθέντα μπιφτέκια δεν βρέθηκε θετικό ως προς το συγκεκριμένο στέλεχος (Little et al, 2001). Επίσης, τόσο στη Βραζιλία (Silveira et al, 1999) κανένα από τα 886 εξετασθέντα προμαγειρευμένα μπιφτέκια, όσο και στην Ιρλανδία (Duffy et al, 1999) κανένα από τα 32 δείγματα, δεν ήταν θετικό ως προς το συγκεκριμένο ορότυπο, όπως συνέβη και στην παρούσα εργασία.

Όσον αφορά στο μοσχαρίσιο κιμά, σε προηγούμενη έρευνα στην Ελλάδα από τους Κανσουζίδου και συν. (1994), δεν απομονώθηκε κανένα θετικό στέλεχος τόσο από τα 70 δείγματα νωπού όσο και από τα 17 δείγματα καταψυγμένου κιμά. Αρνητικά ήταν και τα αποτελέσματα έρευνας που πραγματοποιήθηκε στην Ελβετία (Fantelli και Stephan, 2001) σε 211 δείγματα κιμά, αλλά και από τα 71 δείγματα που



εξετάστηκαν στην Ιρλανδία (Duffy et al, 1999). Αντίθετα στη Δανία, σε έρευνα των Boel και συν. (1997), 0,3% από τα 1584 δείγματα που εξετάστηκαν, βρέθηκαν μολυσμένα με την *E.coli* O157:H7. Τέλος, στην Ολλανδία το ποσοστό ήταν ελαφρά υψηλότερο (1,1%), σε έρευνα των Heuvelink και συν. (1999β). Το ίδιο ποσοστό (1,1%) αναφέρουν και οι Charman και συν. (2000) στη Βρετανία, από την εξέταση 2075 δειγμάτων. Στην παρούσα εργασία κανένα στέλεχος της *E.coli* O157:H7 δεν απομονώθηκε από τα 64 δείγματα νωπού μοσχαρίσιου κιμά που εξετάστηκαν, συμφωνώντας έτσι τα δικά μας αποτελέσματα, τόσο με εκείνα προγενέστερης έρευνας στην Ελλάδα, όσο και με αυτά άλλων προηγμένων χωρών.

Ανάλογες έρευνες σε σάντουιτς και σε έντερα που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή παραδοσιακών τροφίμων, δεν αναφέρονται στην ελληνική και διεθνή βιβλιογραφία.

Ο φαγότυπος 21/28 στον οποίο ανήκει το στέλεχος της *E.coli* O157:H7 που απομονώθηκε στην έρευνά μας από το πρόβειο γάλα, θεωρείται ο συχνότερα εμφανιζόμενος και στη Βρετανία, σύμφωνα με έρευνα του εργαστηρίου PHLS της χώρας αυτής (CDR Wkly, 1999β). Συγκεκριμένα, περίπου το 59% των στελεχών της *E.coli* O157:H7 που απομονώνονται στη Βρετανία ανήκουν στο φαγότυπο 21/28. Αντίθετα, πολύ σπανιότερος είναι ο φαγότυπος 21 (λιγότερο από 6% των στελεχών), στον οποίον ανήκουν τα άλλα δύο στελέχη που απομονώθηκαν κατά την παρούσα έρευνα.

Τα στελέχη που απομονώθηκαν κατά την παρούσα εργασία ήταν ευαίσθητα και στα οκτώ αντιβιοτικά στα οποία δοκιμάστηκαν. Αντίθετα, οι Meng και συν. (1998) αναφέρουν ότι από τα 125 στελέχη της *E.coli* O157:H7 από ανθρώπους, ζώα και τρόφιμα που ελέγχθηκαν ως προς την ευαισθησία τους στα αντιβιοτικά, περίπου 24% ήταν ανθεκτικά σε ένα αντιβιοτικό και 19% σε δύο ή τρία. Επίσης, έρευνα των



Radu και συν. (2001), αποκαλύπτει ότι 28 στελέχη που απομονώθηκαν από μοσχαρίσιο κρέας και μπιφτέκια από κοτόπουλο, ήταν ανθεκτικά σε δύο ή τρία από τα 14 αντιβιοτικά στα οποία δοκιμάστηκαν. Τέλος, έρευνα των Schroeder και συν. (2002) αναφέρει ότι όλα τα στελέχη της *E.coli* O157:H7 που απομονώθηκαν από τρόφιμα ήταν ευαίσθητα και στα 13 αντιβιοτικά στα οποία δοκιμάστηκαν.

Από τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας και μετά από σύγκρισή τους με τα παραπάνω αποτελέσματα παρόμοιων ερευνών σε διάφορες χώρες, προκύπτουν συνοπτικά τα εξής συμπεράσματα:

- Η συχνότητα απομόνωσης της *E.coli* O157:H7 στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης στη χώρα μας είναι αρκετά χαμηλή (0,5%). Το γεγονός αυτό, οδήγησε στην πραγματοποίηση έρευνας, η οποία είχε σκοπό τον προσδιορισμό της συχνότητας απομόνωσης της *E.coli* O157:H7 στα ζώα στην Ελλάδα, τα οποία αποτελούν και τους φορείς του βακτηρίου. Για το λόγο αυτό, εξετάστηκαν 351 δείγματα κοπράνων ζώων και συγκεκριμένα, 81 δείγματα κοπράνων γιδιών, 171 δείγματα κοπράνων προβάτων και 99 δείγματα κοπράνων βοοειδών. Από αυτά απομονώθηκε μόνο ένα στέλεχος *E.coli* O157:H7 από τα κόπρανα αίγας, ποσοστό 0,28%. Το στέλεχος αυτό δε ζύμωνε τη σορβιτόλη αλλά ήταν MUG-θετικό, γεγονός που αποτελεί σπάνια βιοχημική ιδιότητα (Dontorou et al, 2001).

- Η συχνότητα απομόνωσης της *E.coli* O157:H7 στα τρόφιμα, κυμαίνεται στα ίδια περίπου ποσοστά με αυτήν των αναπτυγμένων κρατών, ενώ είναι πολύ χαμηλότερη από εκείνη των αναπτυσσόμενων.

- Το απαστερίωτο γάλα και τα ωμά παραδοσιακά αλλαντικά είναι τρόφιμα πιο επικίνδυνα για τη μετάδοση της *E.coli* O157:H7 στον άνθρωπο, από ό,τι τα έτοιμα και προμαγειρευμένα τρόφιμα.



- Η απουσία μέχρι σήμερα επιδημιών από την *E.coli* O157:H7 στη χώρα μας, ίσως να οφείλεται στον παραδοσιακό τρόπο μαγειρεύματος των τροφίμων με ικανοποιητική θερμική επεξεργασία, καθώς και στην κατανάλωση παστεριωμένου γάλακτος, που καταστρέφουν το μικρόβιο.

- Η απουσία επιδημιών από την *E.coli* O157:H7 στη χώρα μας, σε αντίθεση με άλλες αναπτυγμένες χώρες που εμφανίζουν περίπου την ίδια συχνότητα μολυσμένων τροφίμων, θα μπορούσε ίσως να αποδοθεί και στη δυσκολία ανίχνευσης του βακτηρίου από τους ασθενείς, καθώς και στην μη αναζήτησή του από τα κλινικά δείγματα ασθενών.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *E.coli* O157:H7 χαρακτηρίστηκε ως εντερικό παθογόνο για πρώτη φορά το 1982, όταν προκάλεσε δύο μεγάλες επιδημίες αιμορραγικής κολίτιδας στις Η.Π.Α. Από τότε έως σήμερα έχει προκαλέσει παγκοσμίως πολλές επιδημίες αλλά και μεμονομένα περιστατικά λοίμωξης, κατατάσσοντας το βακτήριο ως μια σοβαρότατη απειλή για τη δημόσια υγεία.

Η *E.coli* O157:H7 μεταδίδεται κυρίως τροφιμογενώς με το βόειο κρέας και το αγελαδινό γάλα, αλλά και υδατογενώς, από άτομο σε άτομο καθώς και μετά από άμεση επαφή με τα ζώα-φορείς του βακτηρίου. Στον άνθρωπο μπορεί να προκαλέσει ένα ευρύ φάσμα νόσων, όπως απλή διάρροια, αιμορραγική κολίτιδα, αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο και θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα, έως και θάνατο.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αναζήτηση στελεχών του βακτηρίου σε διάφορα είδη τροφίμων ζωικής προέλευσης.

Υλικό για την εργασία αυτή απετέλεσαν 600 δείγματα τροφίμων ζωικής προέλευσης (100 δείγματα μη παστεριωμένου αγελαδινού γάλακτος, 100 δείγματα μη παστεριωμένου πρόβειου γάλακτος, 100 δείγματα μη παστεριωμένου γίδινου γάλακτος, 61 σάντουιτς αλλαντικών, 50 χάμπουργκερς, 64 δείγματα μοσχαρίσιου κιμά, 75 χωριάτικα λουκάνικα και 50 δείγματα εντέρων χοίρων). Από αυτά, τα δείγματα γάλακτος εξετάστηκαν με τη μέθοδο της κλασικής καλλιέργειας και τα υπόλοιπα με τη μέθοδο του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού.



Από την εξέταση των παραπάνω δειγμάτων τροφίμων απομονώθηκαν τρία στελέχη της *E.coli* O157:H7, ένα από πρόβειο γάλα, ένα από χωριάτικο λουκάνικο και ένα από τα έντερα των χοίρων. Και τα τρία στελέχη του βακτηρίου που απομονώθηκαν ήταν ευαίσθητα στα οκτώ αντιβιοτικά στα οποία δοκιμάστηκαν.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτής της εργασίας και τη σύγκρισή της με αποτελέσματα άλλων ερευνών προκύπτουν συνοπτικά τα παρακάτω συμπεράσματα:

-Η συχνότητα απομόνωσης της *E.coli* O157:H7 σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης στη χώρα μας είναι αρκετά χαμηλή (0,5%).

-Η συχνότητα απομόνωσης του βακτηρίου από τα τρόφιμα είναι περίπου ίδια με εκείνη των ανεπτυγμένων κρατών και πολύ χαμηλότερη από αυτή των αναπτυσσόμενων.

-Το απαστερίωτο γάλα και τα ωμά παραδοσιακά αλλαντικά είναι τρόφιμα πιο επικίνδυνα για τη μετάδοση της *E.coli* O157:H7 στον άνθρωπο από ό,τι τα προμαγειρευμένα.

-Η απουσία επιδημιών από τον βακτήριο στη χώρα μας, σε αντίθεση με άλλες χώρες, ίσως να οφείλεται στην καλή θερμική επεξεργασία των τροφίμων που καταναλώνονται, αλλά και στη δυσκολία ανίχνευσης της *E.coli* O157:H7.



ISOLATION OF *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 FROM FOODS

Ph.D. THESIS

By

CATHERINE AP. DODOROU

VETERINARIAN

SUMMARY

E.coli O157:H7 was first recognized as a human enteric pathogen in the U.S.A., in 1982, when it caused two major outbreaks of haemorrhagic colitis. Since then, *E.coli* O157:H7 has caused many outbreaks and sporadic cases too and it is considered to be one of the most important threats for public health.

E.coli O157:H7 is usually transmitted by food, mainly beef and cow's milk, but also by water, person-to-person and by direct contact with infected animals. Infection in humans can vary from diarrhea to haemorrhagic colitis, haemolytic uraemic syndrome, thrombotic thrombocytopenic purpura and sometimes death.

The purpose of the present study was to identify the presence of *E.coli* O157:H7 in foods of animal origin.

For this purpose, 600 food samples (100 unpasteurised cow milk, 100 sheep milk, 100 goat milk, 61 meat sandwiches, 50 hamburgers, 64 beef minced meat, 75 traditional sausages and 50 swine intestines) were examined for the presence of *E.coli*



O157:H7. All milk samples were examined by conventional culture method, while the rest food samples were examined by immunomagnetic separation method.

Three strains of *E.coli* O157:H7 were isolated, one from sheep milk, one from traditional sausages and one from swine intestines. All three strains were susceptible to eight antibiotics tested.

The analysis of results indicates that:

-The presence of *E.coli* O157:H7 in foods of animal origin in Greece is rather low (0,5%).

-The incidence of *E.coli* O157:H7 in foods in Greece is similar to this of developed countries and lower than that of developing countries.

-Unpasteurised sheep milk and traditional sausages are the kinds of foods most unsafe for the transmission of the pathogen to humans.

-The absence of outbreak reports in Greece-in contrast with other western countries-can be attributed to the dietary and cooking habits and probably to the difficulty of *E.coli* O157:H7 isolation.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abaas S., Franklin A., Kuhn I., Orskov F., Orskov I (1989). Cytotoxin activity on vero cells among *Escherichia coli* strains associated with diarrhoea in cats. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1294-2196.
2. Abdul-Rauf UM, Beuchat LR, Amman MS. (1993). Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants and temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2364-2368.
3. Abdul-Raouf UM, Amman MS, Beuchat LR (1996). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from some Egyptian foods. *Int J Food Microbiol.* 29: 423-426.
4. Acheson DW, Keusch GT, Lightowers M, et al (1990). Enzyme-linked immunosorbent assay for Shiga-like toxin II using P1 glycoprotein from hydatid cysts. *J Infect Dis* 161: 134-137.
5. Ackman D., Marks S, Mack P, et al (1997). Swimming-associated haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7 infection: evidence of prolonged contamination of a fresh water lake. *Epid Infect* 119:1-8.
6. Ahmed R, Bopp C, Borczyk A, Kasatiya S (1987). Phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis* 155: 806-809.
7. Albihn A., Zimmerman U, Rehbinder V, et al (1997). Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)-a nation-wide Swedish survey of bovine faeces. *Epidémiol Santé Anim* 31-32, 04.13.1-04.13.3.
8. Allerberger F, Dierich MP (1997). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Austria. VTEC '97 3rd International Symposium and Workshop on Shiga toxin



(Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* Infections, Baltimore, Maryland, USA. V37/I.

9. Anderson ME, Marshall RT, Dickson JS (1992). Estimating depths of bacterial penetration into post-rigor carcass tissue during washing. *J Food Safety* 12: 191-198.
10. Andreoli S. Pancreatic involvement in the hemolytic uremic syndrome, p. 131-141 (1992) In B.S. Caplan, R.S. Trompeter, J.L. Moake, Hemolytic Uremic Syndrome and Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. Marcel Dekker, Inc., New York.
11. Ansary SE, Kaspar CW (1997). Survey of retail cheeses, dairy processing environments and raw milk for *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* 25(2): 131-134.
12. Armstrong GL, Hollingsworth J, Morris JG (1996). Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidem Rev* 18: 29-51.
13. Arvanitidou M, Constantinidis TC, Katsouyannopoulos V (1996). Searching for *Escherichia coli* O157 in drinking and recreational waters in northern Greece. *Wat Res* 30(2): 493-494.
14. Ashkenazi S (1993). Role of bacterial cytotoxins in hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Annu Rev Med* 44: 11-18.
15. Basta M., Karmali M, Lingwood C (1989). Sensitive receptor-specified enzyme linked immunosorbent assay for *Escherichia coli* Verocytotoxin. *J Clin Microbiol* 27: 1617-1622.



16. Bauer AW, Kirby W, Sherris JC, Truck M (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45: 493-496.
17. Bell BP, Goldoft M, Griffin PM, et al (1994). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers: The Washington experience. *JAMA* 272: 1349-1353.
18. Bell BP, Griffin P, Lozano P, et al (1997). Predictors of hemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Pediatrics* 100:127.
19. Bell WR, Braine HG, Ness PM, et al (1991). Improved survival in thrombotic thrombocytopenic purpura hemolytic uremic syndrome- clinical experience in 108 patients. *N Engl J Med* 325: 398-402.
20. Belongia EA, MacDonald KL, Parham GL, et al (1991). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 colitis associated with consumption of precooked meat patties. *J Infect Dis* 164: 338-343.
21. Belongia EA, Osterholm MT, Soler JT, Ammend DA, Braun JE, McDonald KL (1993). Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day-care facilities. *JAMA* 269: 883-888.
22. Benjamin MM, Datta AR (1995). Acid tolerance of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 61: 1669-1672.
23. Bennett AR, MacPhee S, Betts RP (1995). Evaluation of methods for the isolation and detection of *Escherichia coli* O157 in minced beef. *Lett Appl Microbiol* 20: 375-379.



24. Besser RE, Lett SM, Weber JT, Doyle M, Barrett T, Wells J, Griffin P (1993). An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA* 269: 2217-2220.
25. Bettelheim KA (1991). The genus *Escherichia*. In: Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H. eds. *The procaryotes: A handbook on the biology of bacteria. Ecophysiology, isolation, identification, applications.* New York: Springer-Verlag, p. 2696-2736.
26. Beutin L, Montenegro MA, Orskov I, Orskov F, Prada J, Zimmermann S, Stephan R (1989). Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 27: 2559-2564.
27. Bielaszewska M, Janda J, Blahova K, Karch H, Karmali MA, Preston MA, Khakhria R, Nyc O (1997). Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with consumption of unpasteurized goat's milk. *Epid Infect* 119: 299-305.
28. Bitzan M, Richardson S, Huang C, Boyd B, Karmali M (1994). Patterns and determinants of Verotoxin binding of human and animal red blood cells *in vitro*. *Recent advances in Verotoxin-producing Escherichia coli infections* by M. Karmali and A. Goglio, p. 193-195, Elsevier.
29. Blanco J, Cid D, Blanco JE, Blanco M, Ruiz Santa Quiteira JA, de la Fuente R (1996α). Serogroups, toxins and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic lambs in Spain. *Veter Microb* 49:209-217.
30. Blanco JE, Blanco M, Mora A, Prado C, Rio M, Fernandez L, Fernandez MJ, Sainz V, Blanco J (1996β). Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli*



- O157:H7 in minced beef using immunomagnetic separation. *Microbiologia* 12(3): 385-394.
31. Blanco M, Blanco J, Blanco JE, Ramos J (1993). Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *Am J Vet Res* 54: 1446-1451.
32. Boel J, Aabo S, Mariager B, Jacobsen B (1997). Prevalence of *Escherichia coli* O157 in meat in Denmark. VTEC '97 3rd International Symposium and Workshop on Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* Infections, Baltimore, Maryland, USA. V129/II.
33. Bolton JF, Crozier L, Williamson JK (1996). Isolation of *Escherichia coli* O157 from raw meat products. *Lett Appl Microbiol* 23: 317-321.
34. Bonardi S, Maggi E, Bottarelli A, Pacciarini ML, Ansuini A, Vellini G, Morabito S, Caprioli A (1999). Isolation of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from-cattle at slaughter in Italy. *Veterin Microbiol* 67: 203-211.
35. Borczyk AA, Harnett N, Lombos M, Lior H (1990). False positive identification of *Escherichia coli* O157 by commercial latex agglutination test. *Lancet* 226: 946-947.
36. Borzyck AA, Karmali MA, Lior H, Duncan LMC (1987). Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *The Lancet*, i: 98.
37. Brewster DH, Brown MI, Robertson D, Houghton GL, Bimson J, Shari CM (1994). An outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with a children's paddling pool. *Epidemiol Infect* 112: 441-447.
38. Cahoon FE, Thomson JS (1987). Frequency of *Escherichia coli* O157:H7 isolation from stool specimens. *Can J Microbiol* 33: 914-915.



39. Calderwood SB, Acheson DWK, Keusch GT, Barrett TJ, et al (1996). Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. ASM News 62: 118-119.
40. Canada Communicable Disease Report (1997). Outbreaks of *Escherichia coli* O157 infection and Cryptosporidiosis associated with drinking unpasteurized apple cider-Connecticut and New York, October 1996. Vol 23-5: 37-40.
41. Canada Communicable Disease Report (1999). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with unpasteurized non-commercial, custom-pressed apple cider –Ontario, 1998. Vol 25-13, 113-117.
42. Carpenter JL, Andelman NC, Moore FM, King NW (1988). Idiopathic cutaneous and renal glomerular vasculopathy of greyhounds. Vet Pathol 25: 401-407.
43. Carter AO, Borczyk AA, Carlson JA, et al (1987). A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home. N Engl J Med 316: 1496-1500.
44. CDR Weekly (1991). Haemorrhagic colitis: *Escherichia coli* O157. Vol 1-6.
45. CDR Weekly (1998 α). Outbreak of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection in Dorset. Vol 8-21: 183.
46. CDR Weekly (1998 β). Cases of *Escherichia coli* O157 infection associated with unpasteurized cream. Vol 8-43: 377.
47. CDR Weekly (1999 ζ). General outbreaks of foodborne illness, England and Wales: weeks 27-31/99. Vol 9 No 33: 290.
48. CDR Weekly (1999 $\sigma\tau$). General outbreaks of foodborne illness in humans, England and Wales: quarterly report. Vol 9 No 37: 335.
49. CDR Weekly (2000 α). Outbreaks of VTEC O157 infection linked to consumption of unpasteurized milk. Vol 10-23: 205.



50. CDR Weekly (2000β). Outbreaks of *Escherichia coli* O157 infection in two prisons. Vol 10-42.
51. CDR Weekly. (1999α) VTEC O157 outbreak associated with a farm visitor center in North Wales. 9(26): 230
52. CDR Weekly (1999β) Verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157: phage types reported in 1998. 9 (33): 291.
53. CDR Weekly (1999γ). Outbreak of VTEC O157 infection in East Sussex. Vol 9-25: 219.
54. CDR Weekly (1999δ). VTEC O157 phage type 21/28 infection in North Cumbria: update. Vol 9-12: 105.
55. CDR Weekly (1999ε). *Escherichia coli* O157 associated with eating unpasteurized cheese-update. Vol 9-15: 131.
56. CDR Weekly (1997) Two outbreaks of Vero cytotoxin producing *E. coli* O157 infection associated with farms. 7(30): 263
57. Centers for Disease Control and Prevention (1995). *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami-Washington and California, 1994. Morbid Mortal Weekly Rep. 44:157-160.
58. Centers for Disease Control and Prevention (1996). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice-British Columbia, California, Colorado and Washington, October 1996. Morb Mort Weekly Rep 45: 975.
59. Chalmers RM, Salmon RL, Willshaw GA, Cheasty T, Looker N, Davies I, Wray C (1997). Vero-cytotoxin-producing *E. coli* O157 in a farmer handling horses. The Lancet, 349: 1816



60. Chapman PA, Siddons CA, Cerdan Malo AT, Harkin MA (1997). A 1-year study of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidem Infect* 119: 245-250.
61. Chapman PA, Siddons CA, Cerdan Malo AT, Harkin MA (2000). A one year study of *Escherichia coli* O157 in raw beef and lamb products. *Epidemiol Infect* 124(2): 207-213.
62. Chapman PA, Cerdan-Malo AT, Ellin M, Ashton R, Harkin MA (2001). *Escherichia coli* O157:H7 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire UK. *Int J Food Microbiol* 64(1-2): 139-150.
63. Chapman PA, Siddons CA, Zadik PM, Jewes L (1991). An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. *J Medical Microbiol* 35: 107-110.
64. Chapman PA, Wright DJ, Siddons CA (1994). A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces. *J Med Microbiol* 40: 424-427.
65. Charba D, Moake JL, Harris ML, Hester JP (1993). Abnormalities of von Willebrand factor multimers in drug-associated thrombotic microangiopathies. *Am J Hematol* 42: 268-277.
66. Chinen I, Tanaro JD, Miliwebsky E, Lound LH, Chillemi G, Ledri S, Baschkier A, Scarpin M, Manfredi E, Rivas M (2001). Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *J Food Prot* 64(9):1346-1351.



67. Cieslak PR, Noble SJ, Maxson DJ, Empey LC, Ravenholt O, Legarza G, Tuttle J, Doyle MP, Barrett TJ, Wells JG, McNamara AM, Griffin PM (1997). Hamburger-associated *Escherichia coli* O157:H7 infection in Las Vegas: a hidden epidemic. *Am J Publ Health* 87(2): 176-180.
68. Cimolai N, Basalyga S, Mah DG, Morrison BJ, Carter JE (1993). A continuing assessment of risk factors for the development of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin Nephrol* 42:85-89.
69. Cimolai N, Morrison BJ, Carter JE (1992). Risk factors for the central nervous system manifestations of gastroenteritis-associated hemolytic uremic syndrome. 1992 *Pediatrics* 90: 616-621.
70. Cleary TG (1988). Cytotoxin producing *E. coli* and the hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Clin North Am* 35: 485-501.
71. Cohen A, Madrid-Marina V, Estrov Z, Freedman M, Lingwood CA, Dosch HH (1998). Expression of glycolipid receptors to Shiga-like toxin of human B lymphocyte: a mechanism for the failure of long-lived antibody response to dysenteric disease. *Int Immunol* 2: 11-18.
72. Coia JE, Johnston Y, Steers NJ, Hanson MF (2001). A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland. *Int J Food Microb* 66(1-2): 63-69.
73. Cray WC, Moon HW (1995). Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 61: 1586-1590.
74. Cunin P, Tedjouka E, Germani Y, Chouaobou N, Bercion R, Morvan J, Martin PMV (1999). An epidemic of bloody diarrhea: *Escherichia coli* O157 emerging in Cameroon? *Emerg Infect Dis* 5(2).



75. Davidson CM, Taylor M, Zellerman GG (1978). Method for sampling beef carcasses. *Appl Environ Microbiol* 35: 811-812.
76. Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, Cray WC, Moon HW (1997). Pathogenicity of *Escherichia coli* O157 in the intestines of neonatal calves. *Infect Immun* 65: 1842-1848.
77. Deschenes G, Casenave C, Grimont F, Desenclos JC, Benoit S, et al (1996). Cluster of cases of haemolytic uraemic syndrome due to unpasteurized cheese. *Pediatr Nephrol* 10: 203-205.
78. Dev VJ, Main M, Gould I (1991). Waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157. *The Lancet* 337: 1412.
79. Division of Disease Surveillance (1997). Notifiable Diseases Annual Summary 1995. *Canada Communicable Disease Report* 23S9.
80. Dontorou A, Papadopoulou C, Filioussis G, Apostolou I, Economou E, Kansouzidou A (2001). Isolation of a verotoxin producing *Escherichia coli* O157:H7 strain from goat feces. First reported case in Greece, abstr 50 in 6th Congress of Balkan Military Medical Committee, Plovdiv, Bulgaria.
81. Doyle MP, Schoeni JL (1987). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl Environ Microbiol* 53:2394-2396.
82. Doyle MP, Schoeni JL (1984). Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with haemorrhagic colitis. *Appl Environ Microbiol* 48:855-856.
83. Duffy G, Garvey P, Sheridan JJ (1999). Detection and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from fresh and processed retail meat samples in Ireland. Concerted Action CT98-3935, Verotoxigenic *E.coli* in



- Europe, Methods for Verotoxigenic *E.coli*, p. 169. Proceedings of a meeting hosted by the University of Liege, Belgium.
84. Duncan L, Mai V, Carter A, Carlson JAK, Borczyk A, Karmali MA (1986). Outbreak of gastrointestinal disease in Sarnia, Ontario. Ontario Disease Surveillance Report 7: 604-611.
85. Duncan L, Mai V, Carter A, Borczyk A, Karmali MA (1987). Outbreak of gastrointestinal disease-Ontario. Canada Diseases Weekly Report Vol 13-2: 5-8.
86. Dylla BL, Vetter EA, Hughes JG, Cockerill FR (1995). Evaluation of an immunoassay for direct detection of *Escherichia coli* O157 in stool specimens. J Clin Microbiol 33(1): 222-224.
87. Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, et al (1988). Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eucaryotic ribosomes. Eur J Biochem 171: 45-50.
88. Fantelli K, Stephan R (2001). Prevalence and characteristics of shigatoxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. Int J Food Microb 70(1-2): 63-69.
89. Farmer JJIII, Davis BR (1985). H7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single tubescreeing medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis. J Clin Microbiol 22: 620-625.
90. Feng P, Hartman PA (1982). Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 41: 1320-1329.
91. Feng P (1995). *Escherichia coli* serotype O157:H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. Emerg Infect Dis 1: 16-21.

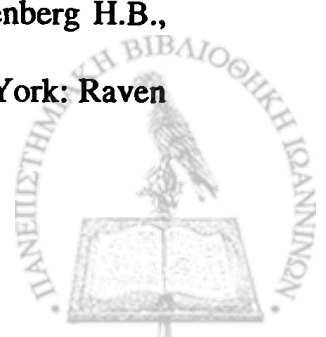


92. Fields PI, Blom K, Hughes HJ, et al (1997). Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and development of a PCR-restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM. *J Clin Microbiol* 35: 1066-1070.
93. Fischer SA, Harris AA, Segreti J, Goodman LJ, et al (1996). Screening for *Escherichia coli* O157:H7 in Illinois. *Clin Microbiol Infect* 1(3): 175-178.
94. Flint SH, Hartley NJ (1995). Evaluation of the TECRA *Escherichia coli* O157 visual immunoassay for tests on dairy products. *Lett Appl Microbiol* 21: 79-82.
95. Fong JS, de Chadarevian JP, Kaplan BS (1982). Hemolytic-uremic syndrome. Current concepts and management. *Pediatr Clin North Amer* 29: 835-856.
96. Fratamico PM, Schultz FJ, Buchanan RL (1992). Rapid isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from enrichment cultures of foods using an immunomagnetic separation method. *Food Microbiol* 9: 105-113.
97. Fratamico PN, Sackitey SK, Wiedmann M, Deng MY (1995). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 33: 2188-2191.
98. Fujii J, Kita T, Yoshida SI, et al (1994). Direct evidence of neuron impairment by oral infection with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H- in mitomycin-treated mice. *Infect Immun* 62: 3447-3453.
99. Furowicz AJ, Ørskov F (1972). Two new *Escherichia coli* O antigens, O150 and O157 and one new K antigen, K93, in strains isolated from veterinary disease. *Acta Pathol Microbiol Scand*, Section B 80, 441-444.
100. Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebenmann RE, Oechslin R (1955). Hamolytischuramische Syndrome: Bilaterale Nierenrindennekrosen bei



akuten erworbenen hamolytischen Anamien. Schweiz Med Wochenschr 85: 905-909.

101. Glass KA, Loeffelholz JM, Ford JP, Doyle MP (1992). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented dry sausage. Appl Environ Microbiol 58:2513-2516.
102. Gransden WR, Damm MS, Anderson JD, Carter JE, Lior H (1986). Further evidence associating hemolytic uremic syndrome with infection by verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. J Infect Dis, 154: 522-524.
103. Griffin PM, Bell BP, Cieslak PR, et al (1994). Large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in the Western United States: The big picture. Elsevier Science. Recent advantages in Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections, p.7-12.
104. Griffin PM, Tauxe RV (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, -other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidem Rev 13: 60-98.
105. Griffin PM, Ostroff SM, Tauxe RV, Greene KD, Wells JG, Lewis JH, Blake PA (1988). Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections. A broad clinical spectrum. Ann Intern Med 109: 705-712.
106. Griffin PM (1998). Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in humans in the United States in *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* infections, p.15-22.
107. Griffin PM (1995). *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In Blaser M.J., Smith P.D., Ravdin J.I., Greenberg H.B., Guerrant R.I., eds. Infections of the gastrointestinal tract. New York: Raven Press, Ltd, p.739-761.



108. Gunzer F, Böhm H, Rüssmann H, et al (1992). Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uraemic syndrome. *J Clin Microbiol* 30: 1807-1810.
109. Hammermueller J, Kruth S, Prescott J, Gyles C (1995). Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. *Can J Vet Res* 59: 265-270.
110. Hancock DD, Besser TE, Kinsel ML, Tarr PI, Rice DH, Paros MG (1994). The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. *Epidem Infect* 113: 199-207.
111. Hao YY, Brackett RE (1993). Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in modified atmosphere. *J Food Prot* 56: 330-332.
112. Harsono KD, Kaspar CW, Luchansky JB (1993). Comparison and genomic sizing of *Escherichia coli* O157:H7 isolates by pulsed field gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 59: 3141-3144.
113. Hayes PS, Blom K, Feng P, et al (1995). Isolation and characterization of a β -D-glucuronidase-producing strain of *Escherichia coli* serotype O157:H7 in the United States. *J Clin Microbiol* 33: 3347-3348.
114. Heuvelink AE, Zwartkruis-Nahuis JT, van den Biggelaar FL, van Leeuwen WJ, de Boer E (1999a). Isolation and characterization of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *Int J Food Microb* 52(1-2): 67-75.
115. Heuvelink AE, Bleumink B, van den Biggelaar FL, Te Giffel MC, Beumer RR, de Boer E (1998b). Occurrence and survival of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 in raw cow's milk in The Netherlands. *J Food Prot* 61(12): 1597-1601.



116. Heuvelink AE, Zwartkruis-Nahuis JT, Beumer RR, de Boer E (1999 β). Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in meats obtained from retail outlets in The Netherlands. *J Food Prot* 62(10): 1115-1122.
117. Heuvelink AE, Van der Biggelaar FL, de Boer E, Herbes RG, Melchers WJG, Huis In T Veld JHJ, Monnens LAH (1998 α). Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from the Dutch cattle and sheep. *J Clin Microbiol.* 36: 878-882.
118. Hilborn ED, Mshar PA, Fiorentino TR, Dembek ZF, et al (2000). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and haemolytic uraemic syndrome associated with consumption of unpasteurized apple cider. *Epidemiol Infect* 124: 31-36.
119. Hildebrand JM, Maguire HC, Holliman RE, Kangesu E (1996). An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection linked to paddling pools. *CDR Wkly Vol* 6 No 2, R33-36.
120. Honish A (1986). Summary of *Escherichia coli* O157:H7 at an Edmonton extended care facility. *Alberta Soc Services Commun Health* 10: 363-368.
121. Issacson M, Canter PH, Effler P, Arntzen L, Bomans P, Heenan R (1993). Haemorrhagic colitis epidemic in Africa. *Lancet* 341: 961.
122. Jayarao BM, Henning DR (2001). Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. *J Dairy Sci* 84(10): 2157-2162.
123. Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB (1990). A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions in tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7839-7843.



124. Johnsen G, Wasteson Y, Heir E, Berget OI, Herikstad H (2001). *Escherichia coli* O157:H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in the southwest part of Norway during 1998 and 1999. *Int J Food Microb*, 65(3): 193-200.
125. Johnson RP, Durham RJ, Johnson ST, McDonald LA, Jeffrey SR, Butman BT (1995). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat by an enzyme-linked immunosorbent assay, EHEC-Tek. *Appl Environ Microbiol* 61: 386-388.
126. Johnson WM, Lior H, Bezanson GS (1983). Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *Lancet* i: 76.
127. Juneja VK, Snyder OPJr, Marmer BS (1997). Thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in beef and chicken: determination of D- and z-values. *Intern J Food Microbiol* 35: 231-237.
128. Juneja VK, Marmer BS (1999). Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7: D- and z-value determinations in turkey, lamb and pork. *Food Res Intern* 32: 23-28.
129. Kadu-Mulindw DH, Aisu T, Gleier K, Zimmermann S, Beutin L (2001). Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples from children with diarrhea and from healthy zebu cattle in Uganda. *Int J Food Microbiol*, 66(1-2): 95-101.
130. Kansouzidou A, Charitidou C, Poubrou E, Mitka S, Daniilidis VD (1998). Incidence of *Escherichia coli* O157:H7 in humans in northern Greece. FEMS '98 Supported Meeting, Athens, Greece.
131. Karch H, Heesemann J, Laufs R, O'Brien AD, Tacket CO, Levine MM (1987). A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is



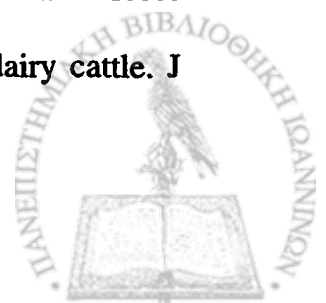
- required for the expression of a new fibrial antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infect Immun* 55: 455-461.
132. Karch H (1994). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* Infection in Europe: Diagnostics and public health perspectives. Elsevier Science. Recent advantages in Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections, p.13-16.
133. Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C (1983). Sporadic cases of haemolytic uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* i: 619-620.
134. Karmali MA, Arbus GS, Petric M, Patrick ML, Roscoe M, Shaw J, Lior H (1988). Hospital-acquired *Escherichia coli* O157:H7 associated haemolytic uraemic syndrome in a nurse. *The Lancet* I:526.
135. Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H (1985). The association between idiopathic haemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *E.coli*. *J Infect Dis* 151: 775-782.
136. Karmali MA (1989). Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 2: 15-38.
137. Keene WE, McAnulty JM, Hoesly FC, Williams P, Hedberg K, et al (1994). A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N Engl J Med* 331: 579-584.
138. Keene WE, Hedberg K, Herriott DE, Hancock DD, McKay RW, Barrett TJ, Fleming DW (1997 α). A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by commercially distributed raw milk. *J Infect Dis* 176: 815-818.



139. Keene WE, Sazie E, Kok J, Rice DH, et al (1997 β). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. JAMA 227: 1229-1231.
140. Keshimaki M, Eklund M, Personen H, Heiskanen T, Siitonen A (2001). EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates. Diagn Microbiol Infect Dis 40(4): 151-156.
141. Keusch GT, Grady GF, Mata LJ, McIver J (1972). The pathogenesis of *Shigella* diarrhea. 1. Enterotoxin production by *Shigella dysenteriae* I. J Clin Invest 51: 1212-1218.
142. Khakhria R, Duck D, Lior H (1990). Extended phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. Epidemiol Infect 105: 511-520.
143. Klie H, Timm M, Richter H, Gallien P, Perlberg KW, Steinruck H (1997). Detection and occurrence of verotoxin-forming and/or shigatoxin producing *Escherichia coli* (VTEC and/or STEC) in milk. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 110(9): 337-341.
144. Knutton S, Baldwin T, Williams PH, McNeish AS (1989). Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect Immun 57: 1290-1298.
145. Kobayashi M, Sasaki T, Saito N, et al (1999). Houseflies: not simple mechanical vectors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Am J Trop Med Hyg 61(4): 625-629.
146. Konowalchuk J, Speir JJ, Stavric S (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun 18: 775-779.



147. Krieg NR, Holt JG (1984). Genus I. *Escherichia*. In Krieg N.R., Holt J.G. eds. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams and Wilkins, p. 420-423.
148. Kudva I, Hatfield PG, Hovde CJ (1996). *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *J Clin Microbiol* 34: 431-433.
149. Lahtie E, Keskimaki M, Rantala L, et al (2001). Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in Finnish cattle. *Vet Microbiol* 79(3): 239-251.
150. Le Jeune J, Hancock DD, Besser TE (1997). *Escherichia coli* O157:H7 in cattle water troughs: a possible on-farm reservoir, abstr 2 in Abstracts of the Fifth Annual Food Safety Farm to Table Conference, Northwestern Food Safety Consortium, Moscow, Idaho.
151. Le Saux N, Spika JS, Friesen B, Johnson J, Melnychuck D, Anderson C, Dion R, Rahman M, Tostowaryk W (1993). Ground beef consumption in noncommercial settings is a risk factor for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection in Canada. *J Infect Dis* 167:500-502.
152. Leung PH, Yam WC, Hg WW, Peiris JS (2001). The prevalence and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and pigs in an abattoir in Hong Kong. *Epidem Infect* 126(2): 173-179.
153. Levine MM, Xu J, Kaper JB, Lior H, Prado V, Tall B, Nataro J, Karch H, Wachsmuth K (1987). A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* 156: 175-182.
154. Lin YL, Chou CC, Pan TM (2001). Screening procedure from cattle feces and the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in Tawian dairy cattle. *J Microbiol Immunol* 34(1): 17-24.



155. Lingwood CA (1996). Role of verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends Microbiol* 4: 147-153.
156. Lior H, Borczyk AA (1987). False positive identification of *Escherichia coli* O157. *Lancet* I: 333.
157. Lior H (1988). Incidence of hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* in Canada. *Can Med Assoc J* 139: 1073-1074.
158. Little CL, de Louvois J (1998). The microbiological examination of butchery products and butchers' premises in the United Kingdom. *J Appl Microbiol* 85(1): 177-186.
159. Little CL, de Louvois J (1999). Health risks associated with unpasteurized goats' and ewes' milk on retail sale in England and Wales. A PHLS Dairy Products Working Group Study. *Epidem Infect* 122(3): 403-408.
160. Little CL, Gillespie I, de Louvois J, Mitchell R (1999). Microbiological investigation of halal butchery products and butchers' premises. *Commun Dis Publ Health* 2(2): 114-118.
161. Little CL, Gillespie IA, Mitchell R (2001). Microbiological examination of ready-to-eat burgers samples anonymously at the point of sale in the United Kingdom. *Commun Dis Publ Health* 4(4): 293-299.
162. Lopez E, Gianantonio C, Cleary TG (1992). The hemolytic uremic syndrome in Argentina, p.89-96. In B.S. Kaplan, R.S. Trompeter, and J.L. Moake (ed) *Hemolytic Uremic Syndrome and Thrombotic Thrombocytopenic Purpura*. Marcel Dekker, Inc, New York.
163. Lopez EL, Diaz M, Grinstein S, Devoto S, Mendilaharsu F, Murray BE, Ashkenazi S, Rubeglio E, Woloj M, Vasquez M, Turco M, Pickering LK,



- Cleary TG (1989). Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. *J Infect Diseases* 160: 469-475.
164. Louie M, De Azavedo J, Clarke R, et al (1994). Sequence heterogeneity of the *eae* gene and detection of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* using serotype-specific primers. *Epidemiol Infect* 112: 449-461.
165. Louise CB, Obrig TG (1991). Shiga toxin-associated hemolytic-uremic syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin, interleukin-1 β , and tumor necrotizing factor alpha on human vascular endothelial cells in vitro. *Infect Immun* 59: 4173-4179.
166. Makino S, Kobori H, Asakura H, Watarai H, Shirahata T, Ikeda T, Takeshi K, Tsukamoto T (2000). Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from seagulls. *Epidem Infect* 125: 55-61.
167. March SB, Ratnam S (1986). Sorbitol-MacConkey Medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol* 23(5): 869-872.
168. March SB, Ratnam S (1989). Latex agglutination test for detection of *Escherichia coli* serotype O157. *J Clin Microbiol* 27: 1675-1677.
169. Marsh J, McLeod AF, Hanson MF, Emmanuel F, Frost J, Thomas A (1992). A restaurant-associated outbreak of *E.coli* O157 infection. *J Pub Health Med* 14(1): 78-83.
170. Mathewson JJ, Johnson PC, DuPont HL, Satterwhite TK, Winsor DK (1985). A newly recognized cause of travelers' diarrhea: Enteroadherent *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 151:471-475.
171. Mattar S, Vásquez E (1998). *Escherichia coli* O157:H7 infection in Colombia. *Emerg Infect Dis* 4:126-127.



172. Maule A (2000). Survival of verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in soil, water and on surfaces. Symp Ser Soc Appl Microbiol 29: 71S-78S.
173. McDonald KL, O'Leary MJ, Cohen ML, Norris P, Wells JG, et al (1988). *Escherichia coli* O157:H7, an emerging gastrointestinal pathogen. Results of a one-year, prospective, population-based study. JAMA 259: 3567-3570.
174. McDonnell RJ, Rampling A, Crook S, Cockcroft PM, Wilshaw GA, Cheasty T, Stuart J (1997). An outbreak of Vero cytotoxin *Escherichia coli* O157 infection associated with takeaway sandwiches. CDR Vol 7 Rev No 13.
175. McIntyre L, Fung J, Paccagnella A, Isaac-Renton J, Rockwell F, Emerson B, Preston T (2002). *Escherichia coli* O157 outbreak associated with the ingestion of unpasteurized goat's milk in British Columbia, 2001. Can Comm Dis Rep 28(1): 6-8.
176. McLeod DL, Gyles CL, Wilcock BP (1991). Reproduction of edema disease of swine with purified Shiga-like toxin-II variant. Vet Pathol 28: 66-71.
177. Mechie SC, Chapman PA, Siddons CA (1997). A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. Epidem Infect 118:17-25
178. Meng J, Zhao S, Doyle M, Mitchell S, Kresovich S (1997). A multiplex PCR for identifying Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Lett Appl Microbiol 24: 172-176.
179. Meng J, Doyle MP (1998). Microbiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods, p. 92-108 in Kaper J.B. and O'Brien A.D. eds, *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E.coli* strains, ASM Press, Washington D.C.



180. Meng J, Zhao S, Doyle MP, Joseph SW (1998). Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food and humans. *J Food Prot* 61(11): 1511-1514.
181. Mermin JH, Hilborn ED, Voetsch A, Swarz M, et al (1997). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating mesclun mix lettuce, abstr V74/I, p.9 in VTEC '97 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections.
182. Meyers KEC, Schulman SL, Kaplan BS (1998). Principles of the treatment of Shiga toxin-associated hemolytic-uremic syndrome: pay meticulous attention to detail and do no harm. In J.B. Kaper and A.D. O'Brien (ed) *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga Toxin-Producing E.coli Strains, p.364-373, ASM Press, Washington DC.
183. Michel P, Wilson JB, Martin SW, Clarke RC, McEwen A, Gyles CL (2000). Estimation of the under-reporting rate for the surveillance of *Escherichia coli* O157:H7 cases in Ontario, Canada. *Epidem Infect* 125(1): 35-45.
184. Milford DV, Staten I, MacGreggor J, Dawes I, Taylor CM, Hill FG (1991). Prognostic markers in diarrhoea-associated haemolytic-uraemic syndrome: initial neutrophil count, human neutrophil elastase and von Willebrand factor antigen. *Nephrol Dial Transplant* 6: 232-237.
185. Milford DV (1992). HUS in the UK, p.39-59. In B.S. Kaplan, R.S. Trompeter, and J.L. Moake (ed) *Hemolytic Uremic Syndrome and Thrombotic Thrombocytopenic Purpura*. Marcel Dekker, Inc, New York.



186. Miyao Y, Kataoka T, Nomoto T, Kai A, Itoh T, Itoh K (1997). Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* harbored in the intestine of cattle in Japan.. *Veterin Microbiol* 61: 137-143.
187. MMWR (1991). Foodborne outbreak of gastroenteritis caused by *Escherichia coli* O157:H7-North Dakota, 1990. 40(16): 1-3.
188. MMWR (1993). Preliminary report: Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers-Western United States 1993. Vol 42 No 4, 85-86.
189. MMWR (1997 α). Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating alfalfa sprouts-Michigan and Virginia, June-July 1997. 46: 741-744.
190. MMWR (1997 β). Outbreaks of *Escherichia coli* O157 infection and Cryptosporidiosis associated with drinking unpasteurized apple cider-Connecticut and New York, October 1996. 46(1): 4-8.
191. MMWR (2000). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds-Wisconsin, June 1998. 49(40): 911-913.
192. Montenegro MA, Bulte M, Trumpf T, et al (1992). Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle. *J Clin Microbiol* 28: 1417-1421.
193. Morgan GM, Newman CP, Palmer SR, Allen JB, et al (1988). First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the UK. *Epidemiol Infect* 101: 83-91.



194. Morgan D, Newman CP, Hutchinson DN, Walker AM, Rowe B, Majid F (1993). Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol Infect* 111: 181-187.
195. Morris CF, Robertson JL, Mann PC, Clark S, Divers TJ (1987). Hemolytic uremic-like syndrome in two horses. *J Am Vet Med Assoc* 191: 1453-1454.
196. Moschowitz E (1924). Hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: a hitherto undescribed disease. *Proc N Y Pathol Soc* 24: 21-24.
197. Murinda SE, Nguyen LT, Ivey SJ, Gillespie BE, Almeida RA, Draughon FA, Oliver SP (2002). Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in bulk tank milk and fecal samples from cull cows: a 12-month survey of dairy farms in east Tennessee. *J Food Prot* 65(5): 752-759.
198. Nakazawa M, Akiba M, Sameshima T (1999). Swine as a potential reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *Emerg Infect Dis* 5:833.
199. Narimatsu H, Ogata K, Fuchi Y, Hoashi K (1997). Bacteriological studies on sporadic diarrhea diseases in Oita District, 1985-1996. *Kansenshogoku Zasshi* 71(7): 644-651.
200. NCCLS (2001). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 10th informational supplement M100-S11. Wayne PA.
201. Neild GH (1994). Haemolytic-uraemic syndrome in practice. *The Lancet* 343: 398-401.



202. Novillo AA, Voyer LE, Cravioto R, Freire MC, Castano G, Wainstein R, Binztein N (1988). Haemolytic uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and verotoxin neutralizing antibodies. *Pediatr Nephrol* 2: 288-290.
203. O'Brien A, Lively TA, Chen M, Rothman SW, Formal SB (1983). *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. *Lancet* i: 702.
204. O'Brien A, Tesh V, Donohue-Rolfe A, et al (1992). Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 180: 65-94.
205. Okrend AJG, Rose BE, Lattuada CP (1990). A research note: use of 5-bromo-4-chloro-3-indoxy- β -D-glucuronide in MacConkey sorbitol agar to aid the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. *J Food Prot* 53: 941-943.
206. Olsen SJ, Miller G, Breuer T, Kennedy M, Higgins C, Walford J, McKee G, Fox K, Bibb W, Mead P (2002). A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems. *Emerg Inf Dis* 8(4): 370-375.
207. Orskov F, Orskov I, Villar JA (1987). Cattle as a reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *The Lancet* i: 276.
208. Osek J, Winiarczyk S (2001). Prevalence of eae and shiga toxin genes among *Escherichia coli* strains isolated from healthy calves. *J Vet Microb B Infect Dis Vet Public Health*, 48(1): 67-72.



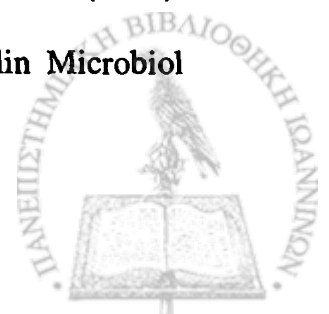
209. Ostroff SM, Kobayashi JM, Lewis LH (1989). Infections with *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State. The first year of statewide disease surveillance. JAMA 262: 355-359.
210. Ostroff SM, Griffin PM, Tauxe RV, Shipman LD, Greene KD, Wells JG, Lewis JH, Blake PA, Kobayashi JM (1990). A statewide outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in Washington State. Am J Epidemiol 132: 239-247.
211. Padhye NV, Doyle MP (1991). Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. Appl Environ Microbiol 57: 2693-2698.
212. Padhye NV, Doyle MP (1991). Production and characterization of a monoclonal antibody specific for enterohemorrhagic *Escherichia coli* of serotypes O157:H7 and O26:H11. J Clin Microbiol 29: 99-103.
213. Pai CH, Gordon R, Sims HV, Bryan LE (1984). Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7. Ann Intern Med 101: 738-742.
214. Pai CH, Ahmed N, Lior H, Johnson WM, Sims HV, Woods DE (1988). Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: a two-year prospective study. J Infect Dis, 157: 1054-1057.
215. Palumbo S, Call J, Schultz F, Williams A (1995). Minimum and maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorrhagic strains of *Escherichia coli*. J Food Prot 58: 352-356.
216. Parida S, Hollman A, Beattie T (1991). Cholelithiasis associated with hemolytic-uremic syndrome. Clin Nephrol 35:86.



217. Park CH, Vandell NM, Hixon DL (1996). Rapid immunoassay for detection of *Escherichia coli* O157 directly from stool specimens. *J Clin Microbiol* 34(4): 988-990.
218. Paunio M, Pebody R, Keshimäki M, Kokki M, Ruutu P, Oinonen S, Vuotari V, Siitonen A, Lahti E, Leinikki P (1999). Swimming-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidem Infect* 122:1-5.
219. Pavia AT, Nichols CR, Green DP, Tauxe RV, Mottice S, Greene KD, Wells JG, Siegler RL, Brewer ED, Hannon D, Blake PA (1990). Hemolytic-uremic syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in institutions for mentally retarded persons: clinical and epidemiologic observations. *J Pediatr* 116: 544-551.
220. Pebody RG, Furtado C, Rojas A, McCarthy N, Nylén G, Ruutu P, Leino T, Chalmers R, de Jong B, Donnelly M, Fisher I, Gilham C, Griffin PM, Cheasty T, Willshaw G, Navarro M, Salmon R, Leinikki P, Wall P, Bartlett C (1999). An international outbreak of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection amongst tourists; a challenge for the European infectious disease surveillance network. *Epidem Infect* 123: 217-223.
221. Perera LP, Marques RM, O'Brien AD (1988). Isolation and characterization of monoclonal antibodies to Shiga-like toxin II of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and use of monoclonal antibodies in a colony enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 26: 2127-2131.
222. Perry MB, Bundle DR, Gidney MAJ, Lior H (1988). Identification of *Escherichia coli* serotype O157 strains by using a monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 26: 2391-2394.



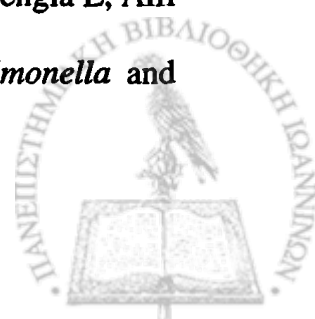
223. Pierard D, Stevens D, Morian L, Lior H, Lauwers S (1997). Isolation and virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in human stool samples. *Clin Microbiol Infect* 3(5): 531-540.
224. Pilipcinec E, Tkacikova L, Naas HT, Cabadaj R, Mikula I (1999). Isolation of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 from poultry. *Folia Microbiol* 44(4): 455-456.
225. Pruijboom-Brees IM, Morgan TW, Ackermann MR, et al (2000). Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 shiga toxins. *Proc Natl Acad Sci*. 97(19): 10325-10329.
226. Radu S, Abdul Mutalib S, Rusul G, Ahmad Z, et al (1998). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in the beef marketed in Malaysia. *Appl Environ Microbiol* 64(3): 1153-1156.
227. Radu S, Ling O, Rusul G, Abdul-Karim MI, Nishibuchi M (2001). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses. *J Microb Methods* 46(2): 131-139.
228. Raghubeer EV, Matches JR (1990). Temperature range for growth of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and selected coliforms in *E.coli* medium. *J Clin Microbiol* 28: 803-805.
229. Ratnam S, March J (1986). Sporadic occurrence of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Newfoundland. *Can Med Assoc J* 134: 43-49.
230. Ratnam S, March SB, Ahmed R, Bezanson GS, Kasatiya S (1988). Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *J Clin Microbiol* 26(10): 2006-2012.



231. Read SC, Gyles CL, Clarke RC, Lior H, McEwen S (1990). Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork and chicken in southwestern Ontario. *Epidemiol Infect* 105: 11-20.
232. Read SC, Clarke RC, Martin A, et al (1992). Polymerase chain reaction for detection of verocytotoxin *Escherichia coli* isolated from animal and food sources. *Molec Cellul Probes* 6: 153-161.
233. Remis RS, MacDonald KL, Riley LW, Puhr ND, Wells JG, Davis BR, Blake PA, Cohen ML (1984). Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7. *Ann Intern Med* 101: 624-626.
234. Renwick SA, Wilson JB, Clarke RC, Lior H, et al (1994). Evidence of direct transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection between calves and a human-Ontario. *Canada Commun Dis Rep* 20(9): 73-75.
235. Riley LW, Remis RS, Helgerson D, McGee HB, et al (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 308: 681-685.
236. Riordan DCR, Duffy G, Sheridan JJ, Whiting RC, Blair IS, McDowel DA (2000). Effects of acid adaptation, product ph, and heating on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in pepperoni. *Appl Environ Microbiol* 66: 1726-1729.
237. Roberts CL, Mshar PA, Carter ML, Hadler JL, Sosin DM, Hayes PS, Barrett TJ (1995). The role of heightened surveillance in an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol Infect* 115: 447-454.
238. Robson WL (2000). Haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr Drugs* 2(4): 243-252.



239. Rock GA, Sumak KH, Buskaer NA, et al (1991). Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 325: 393-397.
240. Rodrigue DC, Mast EE, Greene KD, Davis JP, Hutchinson MA, Wells JG, Barrett TJ, Griffin PM (1995). A university outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with roast beef and an unusually benign clinical course. *J Infect Dis* 172: 1122-1125.
241. Rowe PC, Walop W, Lior H, McKenzie AM (1991). Hemolytic anemia after childhood *Escherichia coli* O157:H7 infection: are females at increased risk? *Epidemiol Infect* 106: 523-530.
242. Ryan CA, Tauxe RV, Hosesk GW, Wells JG, Stoesz PA, McFadden HW, Smith PW, Wright GF, Blake PA (1986). *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological and pathological findings. *J Infect Diseases* 154: 631-638.
243. Salmon RL, Farrell ID, Hutchinson JG, Coleman DT, et al (1989). A christening party outbreak of hemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome associated with *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol Infect* 103: 249-254.
244. Samadpour M, Ongerth JE, Liston J, et al (1994). Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. *Appl Environ Microbiol* 60: 1038-1040.
245. Samadpour M, Yang P, Buck F, Ammerman S, Depavia G, Mazengia E, Alfi D, Barbour WM (1998). Occurrence of *E.coli* O157:H7, *Salmonella* and



other Shiga-like toxin-producing *E. coli* in retail fresh ground beef. IAMFES 85th General Meeting, Nashville, TN.

246. Sandvig K, Olsens S, Brown JE, Petersen OW, van Deurs B (1989). Endocytosis from coated pits of shiga toxin: a glycolipid-binding protein from *Shigella dysenteriae* 1. *J Cell Biol* 108: 1331-1343.
247. Sasaki T, Kobayashi M, Agui N (2000). Epidemiological potential of excretion and regurgitation by *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in the dissemination of *Escherichia coli* O157:H7 to food. *J Med Entomol* 37(6): 945-949.
248. Schmidt H, Beutin L, Karch H (1995). Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* 63: 1055-1061.
249. Schoeni JL, Doyle MP (1994). Variable colonization of chickens perorally inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and subsequent contamination of eggs. *Appl Environ Microbiol* 60: 2958-2962.
250. Schroeder CM, Zhao C, DebRoy C, Torcolini J, et al (2002). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine and food. *Appl Environ Microbiol* 68(2): 576-581.
251. Schurman RD, Harihara H, Heaney SB, Rahn K (2000). Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle slaughtered on Prince Edward Island. *J Food Prot* 63(11): 1583-1586.
252. Scotland SM, Rowe B, Smith HR, Willshaw GA, Gross RJ (1988). Verocytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* from children with haemolytic uremic syndrome and their detection by specific DNA probes. *J Med Microbiol* 25:237-243.



253. Scotland SM, Willshaw GA, Smith HR, Rowe B (1987). Properties of strains of *Escherichia coli* belonging to serogroup O157 with special reference to production of verocytotoxins VT1 and VT2. *Epidemiol Infect* 99: 613-624.
254. Silveira NT, Silva N, Contreras C, Miyagusku L, Baccin ML, Koono E, Beraquet NJ (1999). Occurrence of *E.coli* O157:H7 in hamburgers in Brazil. *J Food Prot* 62(11): 1333-1335.
255. Slutsker L, Ries AA, Greene KD, et al (1997). *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: Clinical and epidemiological features. *Ann Intern Med* 126(7): 505-513.
256. Smith HR, Rowe B, Gross RJ, Fry NK, Scotland SM (1987). Hemorrhagic colitis and Vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* in England and Wales. *The Lancet* i: 1062-1064.
257. Smith HR, Scotland SM (1993). Isolation and identification methods for *Escherichia coli* O157 and other Verocytotoxin-producing strains. *J Clin Pathol* 46: 10-17.
258. Spika JS, Parsons JE, Nordenberg D, Wells JG, Gunn RA, Blake PA (1986). Hemolytic uremic syndrome and diarrhea associated with *Escherichia coli* O157:H7 in a day care center. *J Pediatr* 109: 287-291.
259. Stavric S, Buchanan B, Gleeson TM (1993). Intestinal colonization of young chicks with *Escherichia coli* O157:H7 and other verotoxin-producing serotypes. *J Appl Bacteriol* 74: 557-563.
260. Stevenson J, Hanson S (1996). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 phage type 2 infection associated with eating precooked meats. *CDR Vol 6 Rev No* 8.



261. Sussman M (1985). Theodor Escherich (1857-1911): A biographical note. In: Sussman M.ed. *The virulence of Escherichia coli: Reviews and methods*. London: Academic Press p. 1-4.
262. Takeda T, Tanimura M, Yoshino K, Yoshino K, Yamagata K, Matsuda E, Uchida H, Ikeda N (1997). Questionnaire-based clinical aspects of VTEC infection in Japan, 1996. Abstr V219/II, p.116 in VTEC '97:3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections.
263. Talan D, Moran G, Newdow M, Ong S, et al (2001). Etiology of bloody diarrhea among patients presenting to United States emerging departments: prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and other enteropathogens. *Clin Infect Dis* 32(4): 573-580.
264. Tarr PI, Neill MA, Clausen CR, Watkins SL, Christie DL, Hickman RO (1990). *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology. *J Infect Dis* 162: 553-556.
265. Tarr PI, Tran NT, Wilson RA (1999). *Escherichia coli* O157:H7 in retail ground beef in Seattle: results of a one-year prospective study. *J Food Prot* 62(2): 133-139.
266. Tarr PI (1995). *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin Infect Dis* 20:1-8.
267. Thomas A, Chart H, Cheasty T, Smith HR, Frost JA, Rowe B (1993). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*, particularly serogroup O157, associated with human infections in the United Kingdom: 1989-1991. *Epidemiol Infect* 110: 591-600.



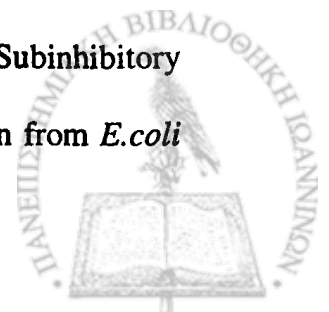
268. Thomas A, Cheasty T, Frost JA, Chart H, Smith HR, Rowe B (1996). Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*, particularly serogroup O157, associated with human infections in England and Wales: 1992-94. *Epidemiol Infect* 117: 1-10.
269. Thomas S, Smith HR, Willshaw GA, Rowe B (1991). Non-radioactively labeled polynucleotide and oligonucleotide DNA probes, for selectively detecting *Escherichia coli* strains producing verocytotoxin VT1, VT2 and VT2 variant. *Molec Cell Probes* 5: 129-135.
270. Thomson PD (1992). HUS in Johannesburg South Africa, p.79-88. In B.S. Kaplan, R.S. Trompeter, and J.L. Moake (ed) *Hemolytic Uremic Syndrome and Thrombotic Thrombocytopenic Purpura*. Marcel Dekker, Inc, New York.
271. Tilden J, Young W, McNamara A, et al (1996). A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health* 86: 1142-1145.
272. Tzipori S, Wachsmuth IK, Chapman C, Birner R, Brittingham J, Jackson C, Hogg J (1986). The pathogenesis of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *J Infect Dis* 154: 712-716.
273. Uhitil S, Jaksic S, Petrak T, Botka-Petrak K (2001). Presence of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef and ground baby beef. *J Food Prot* 64(6):862-864.
274. Van de Kar NCAJ, Monnens AH, Karmali MA (1992). TNF and IL-1 induce expression of verocytotoxin receptor globotriosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of HUS. *Blood* 80: 2755-2764.



275. Vanderlinde PB, Shay B, Murray J (1998). Microbiological quality of Australian beef carcass meat and frozen bulk packed beef. *J Food Prot* 61(4): 437-443.
276. Vernozy-Rozand C, Mazuy C, Ray-Gueniot S, et al (1998). Evaluation of the VIDAS methodology for detection of *Escherichia coli* O157 in food samples. *J Food Prot* 61(7): 917-920.
277. Vernozy-Rozard C, Mazuy C, Ray-Gueniot S, Boutrand-Loei S, Meyrand A, Richard Y (1997). Detection of *Escherichia coli* O157 in French food using an immunomagnetic separation and the VIDAS *Escherichia coli* O157. *Lett Appl Microbiol* 25(6): 442-446.
278. Vold L, Klungseth Johansen B, Kruse H, Skjerve E, Wasteson Y (1998). Occurrence of shigatoxigenic *Escherichia coli* O157 in Norwegian cattle herds. *Epidemiol Infect* 120: 21-28.
279. Vuddhakul V, Patararungrong N, Pungrasamee P, Jitsurong S, et al (2000). Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157 from retail beef and bovine feces in Thailand. *FEMS Microbiol Lett* 182(2): 343-347.
280. Waddell T, Head S, Petric M, Cohen A, Lingwood C (1988). Globotriosyl ceramide is specifically recognized by the *Escherichia coli* Verocytotoxin 2. *Biochem Biophys Res Commun* 152: 674-679.
281. Watanabe Y, Osaza K, Mermin JH, Griffin PM, Masuda K, Imashuku S, Sawada T (1999). Factory outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Japan. *Emerg Infect Dis* 5: 424-428.
282. Weagant S, Bryant JL, Bark DH (1994). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise and mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. *J Food Prot* 57: 629-631.



283. Weekly Epidemiological Record (1996). 71: 229-230.
284. Wells JG, Davis BR, Wachsmuth IK, Riley LW, et al (1983). Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. J Clin Microbiol 18: 512-520.
285. Wells JG, Shipman LD, Greene KD, et al (1991). Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like toxin-producing *E.coli* from dairy cattle. J Clin Microbiol 29: 985-989.
286. WHO Surveillance Programme (1996). Newsletter: Outbreak of EHEC infections in Bavaria. FAO/WHO Collaborating Centre 49/50: 1-2.
287. Willshaw GA, Thirlwell J, Jones AP, Parry S, Salmon RL, Hickey M (1994). Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain. Lett Appl Microbiol 19: 304-307.
288. Willshaw GA, Cheasty T, Smith HR, O'Brien SJ, Adak GK (2001). Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O157 and other VTEC from human infections in England and Wales: 1995-1998. J Med Microbiol 50(2): 135-142.
289. Willshaw GA, Smith HR, Scotland SM, Rowe B (1985). Cloning of genes determining the production of Verocytotoxin by *Escherichia coli*. J Gen Microbiol 131: 3047-3053.
290. Wilson JB, McEwen SA, Clarke RC, et al (1992). Distribution and characteristics of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle. Epidemiol Infect 108: 423-439.
291. Wolf LE, Acheson DW, Lincicome LL, Keusch GT (1997). Subinhibitory concentrations of antibiotics increase the release of Shiga toxin from *E.coli*



O157:H7 in vitro. Abstr V145/III, p. 60 in VTEC '97:3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections.

292. Wright DJ, Chapman PA, Siddons CA (1994). Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolating *Escherichia coli* O157 from food samples. *Epidem Infect* 113: 31-39.
293. Yagi H, Fujimura Y, Shimoyama T, et al (1997). effects of purified verotoxin 1 to human umbilical vascular endothelial cells and to platelets. *Thromb Haemostasis* 1997 (Suppl): 322 (Abstr).
294. Yoh M, Honda T (1997). The stimulating effect of fosfomycin, an antibiotic in common use in Japan, on the production/release of verotoxin-1 from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in vitro. *Epidemiol Infect* 119: 101-103.
295. Zadik PM, Chapman PA, Siddons CA (1993). Use of tellurite for the selection of Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J Med Microbiol* 39: 155-158.
296. Zhao T, Doyle MP, Besser RE (1993). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Appl Environ Microbiol* 59: 2526-2530.
297. Zhou Z, Huang S, Zheng M, Zheng H, Sun W, Zhang R, Wang L, Wang Li, Jingyun L (1997). Isolation of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from beef and pork in Changchun, China. VTEC '97 3rd International Symposium and Workshop on Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* Infections, Baltimore, Maryland, USA. V214/II.



298. Αμπραχίμ Α, Κανσουζίδου Α, Παπά Α, Δανηλίδης Β, Καραϊωάννογλου Πρ (1997). Αναζήτηση *Listeria spp*, *Salmonella spp*, *Campylobacter spp* και *Escherichia coli* O157:H7 στο προσωπικό και στο περιβάλλον του μαγειρίου ενός νοσοκομείου. Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας, 42(1): 141-145.
299. Κανσουζίδου Α (2001). Προσωπική επικοινωνία.
300. Κανσουζίδου-Κανακούδη Α, Λίτκε ΟΜ, Καραμπαξόγλου Δ, Δανηλίδης Β (1994). Αναζήτηση *Escherichia coli* O157:H7 σε κόπρανα ζώων και κινά. Εφαρμ Κλιν Μικροβ Εργαστ Διάγν 9(4): 264-268.
301. Χήτα Ν, Αργαλιάς Ι, Καββαδίας Σ, Παπαμιχαήλ Δ, Λεβειδιώτου-Στεφάνου Σ (2002). Μικροβιολογική διερεύνηση οξείων εντεριτίδων σε παιδιά και ενήλικες. 2^ο Πανεπιστημικό Ιατρικό Συνέδριο, Ιωάννινα, περίλ. 195, σελ. 203.

