

PATOGENNE SZCZEPY *ESCHERICHIA COLI* I ZAGROŻENIA Z NIMI ZWIĄZANE

Katarzyna Dąbrowska¹⁾, Marzena Matejczyk²⁾

¹⁾Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Waława Dąbrowskiego,
Zakład Mikrobiologii, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

²⁾Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska,
Zakład Chemii, Biologii i Biotechnologii, ul. Wiejska 45E, 15-351 Białystok

katarzyna.dabrowska@ibprs.pl

Streszczenie

Przedstawiona praca przeglądowa dotyczy potencjału chorobotwórczego *Escherichia coli* oraz możliwości zapobiegania zakażeniom wywołanym przez te, powszechnie spotykane w środowisku naturalnym, bakterie. Wśród licznych szczepów *E. coli* spotykamy patogeny. Mogą one powodować stany chorobowe układu pokarmowego, moczowego czy nerwowego. Wczesne wykrywanie ognisk zakażeń patogennymi szczepami *E. coli* pozwala zmniejszyć ryzyko dalszych zachorowań. Odpowiednie instytucje krajowe i międzynarodowe tworzą systemy ostrzegania przed zagrożeniami epidemiologicznymi i normy wykrywania szczepów patogennych. Ze względu na duże znaczenie epidemiologiczne *E. coli*, ciągle istnieje dążenie do wypracowania efektywniejszych i szybszych systemów wykrywania obecności tego mikroorganizmu w żywności.

Słowa kluczowe: *Escherichia coli*, patogenność, wykrywanie, żywność

PATHOGENIC STRAINS OF *ESCHERICHIA COLI* AND RELATED HAZARDS

Summary

This review focuses on discussing pathogenic potential of *Escherichia coli* and possible ways of preventing infections with these bacteria. *E. coli* is a microorganism widely present in the natural environment. Among many different *E. coli* strains also infective ones are found. Those strains can cause diseases of digestive system, urinary tract and nervous system. Early detection of pathogenic *E. coli* outbreaks leads to reduced risk of illness propagation. National and international institutions create systems of rapid warning against epidemiological hazards and standards for pathogenic *E. coli* strains detection. High epidemiological significance of

E. coli causes pursuance for new, more effective and faster methods of detection of this microorganism in food.

Key words: *Escherichia coli*, pathogenicity, detection, food

WPROWADZENIE

Escherichia coli to powszechnie występująca bakteria, którą znaleźć można między innymi w ludzkim przewodzie pokarmowym [Croxen i in. 2013]. Pod względem genetycznym charakteryzuje się tzw. plastycznością genomu, która wiąże się z występowaniem dużej ilości szczepów w obrębie gatunku [Blount 2015, Schlegel i in. 2017, Rojaz-Lopez i in. 2018]. Wśród wspomnianych znajdują się szczepy patogenne dla człowieka. Literatura wymienia osiem głównych patotypów *E. coli*. Grupy te różnią się posiadanymi czynnikami wirulencji jak również wywoływanymi schorzeniami [Gomes i in. 2016, Pasqua i in. 2017]. Łatwość przenoszenia, odporność na niekorzystne warunki środowiska oraz oporność na antybiotyki patogennych szczepów *E. coli* powoduje, że wciąż pojawiają się doniesienia o masowych zatruciach z ich udziałem [Assefa i Bihon 2018, Giuntini i in. 2018]. W celu zapobiegania rozprzestrzenianiu się zakażeń *E. coli*, na świecie powoływane są odpowiednie systemy wczesnego ostrzegania [Pappelbaum i in. 2015]. Detekcja patogenów ma miejsce między innymi w badaniach bezpieczeństwa żywności, która stanowi jedną z głównych dróg rozprzestrzeniania się chorobotwórczych *E. coli* [Półtorak i in. 2016]. Do identyfikacji potencjału chorobotwórczego wyizolowanych *E. coli* wykorzystuje się metody immunologiczne i biologii molekularnej [Shahrani i in. 2014].

Celem przedstawionego artykułu przeglądowego jest zwrócenie uwagi na zagrożenia stwarzane przez patogenne szczepy *E. coli* oraz omówienie sposobów ich wykrywania w żywności.

1. Budowa i fizjologia *Escherichia coli*

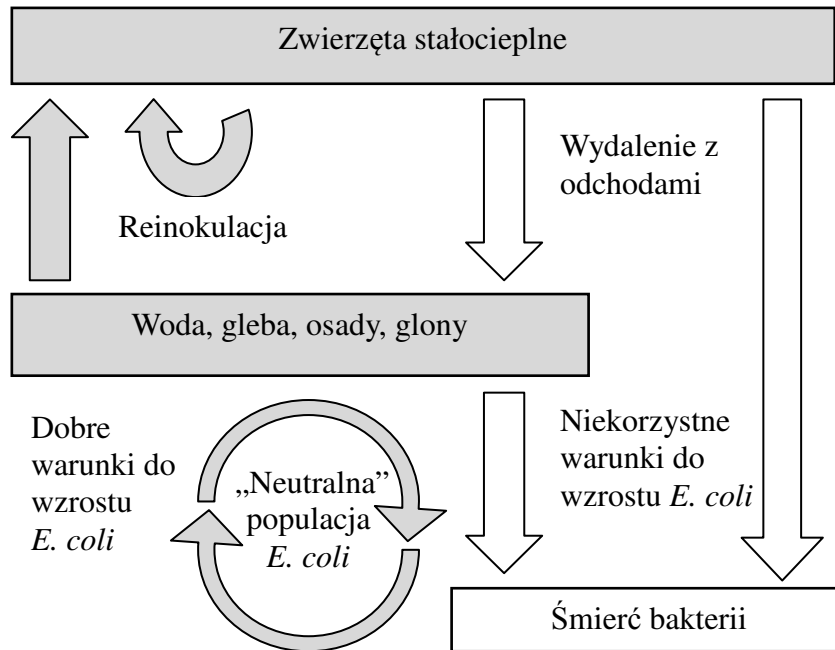
Escherichia coli odkryta została w roku 1885 [Croxen i in. 2013]. Pod względem budowy morfologicznej bakteria ta charakteryzuje się kształtem pałeczkowatym, długością 1 – 3 μm i średnicą 0,4 – 0,8 μm . Poszczególne szczepy tego gatunku mogą wykazywać ruchliwość bądź nie [Croxen i in. 2013, Pappelbaum i in. 2015]. Ze względu na obecność jednowarstwowej ściany komórkowej oraz dwuwarstwowej, zewnętrznej błony połączonej z warstwą mureiny, *E. coli* zaliczana jest do bakterii Gram-ujemnych [Baj i Markiewicz 2015]. Wykazuje fakultatywnie beztlenowy typ metabolizmu. Jest katalazo-dodatnia,

oksydazo-ujemna, zdolna do redukcji azotanów oraz przemiany tryptofanu w indol [Croxen i in. 2013, Iwase i in. 2013, Li i Young 2013, Tiso i Schechter 2015]. *E. coli* nie prowadzi hydrolizy mocznika, nie wytwarza siarkowodoru czy acetoiny. Nie wykorzystuje żelatyny jako źródła węgla. Uzyskuje energię na drodze fermentacji węglowodanów (glukozy, laktozy, arabinozy lub mannitolu). Syntetyzuje przy tym produkty kwasowe (octan, mrówczan, mleczan, bursztynian), a niekiedy również gazowe (np. dwutlenek węgla) [Croxen i in. 2013, Förster i Gescher 2014, Pappelbaum i in. 2015]. *E. coli* nie wytwarza przetrwalników. Pod względem optymalnej temperatury wzrostu (37°C) zaliczana jest do bakterii mezofilnych [Garbowska i Berthold-Pluta 2013, Croxen i in. 2013]. Jej przeżywalność w zależności od temperatury, zależy od podłoża na jakim bakteria rośnie [Li i Gänzle 2016]. *E. coli* najlepiej rozwija się w pH zbliżonym do neutralnego. Niektóre szczepy są jednak w stanie przetrwać kilka godzin w warunkach znacznego zakwaszenia (pH<3) lub wykazywać wzrost w środowisku silnie zasadowym (pH = 9) [Foster 2004, Zhang i in. 2016, AlRabiah i in. 2018]. Jak oceniają badacze, genom *E. coli* składa się, w zależności od szczepu, z ok. 4 000-5 500 genów. Pan-genom (będący zbiorem wszystkich genów spotykanych we wszystkich szczepach danego gatunku) *E. coli* obejmuje ponad 16 000 genów [Blount 2015]. Poszczególne szczepy *E. coli* mogą wykazywać znaczne różnice genotypowe (wynoszące nawet setki tysięcy par zasad) [Kaas i in. 2012]. *E. coli* charakteryzuje więc tak zwana plastyczność genomu, sprzyjająca szybkiej ewolucji nowych szczepów bakterii [Blount 2015, Rojas-Lopez i in. 2018].

E. coli pod względem filogenetycznym zaliczana jest do rodziny *Enterobacteriaceae*, rzędu *Enterobacteriales*, klasy *Gammaproteobacteria*, typu *Proteobacteria*, królestwa *Eubacteria* i domeny *Bacteria* [Scheutz i Strockbine 2005]. W obręb samego gatunku wchodzi wspomniany już, bogaty wachlarz szczepów. Clermont i in. [2013] dzielą je, ze względu na różnice genetyczne, na siedem głównych grup: A, B1, B2, C, D, E i F.

Escherichia coli jest mikroorganizmem powszechnie spotykanym w otaczającym nas świecie. Bakterie tego gatunku bytują w organizmach zwierząt stałocieplnych, gadów, ryb i roślin. Spotykane są również w glebie i wodzie [Leimbach i in. 2013, Blount 2015]. Rysunek 1 obrazuje cykl życia *E. coli* biorąc pod uwagę miejsca jej bytowania. Bakterie te, wydalone z organizmów zwierząt stałocieplnych, wtórnie zakażają dotychczasowego gospodarza (reinokulacja) bądź przedostają się do środowiska. W drugim przypadku *E. coli* mogą zakażać kolejno inne zwierzęta stałocieplne. Jeżeli napotkają korzystne do wzrostu warunki, bakterie te mogą też ulegać tzw. „neutralizacji”. Tworzą wtedy populację *E. coli*, które uległy przystosowaniu do życia poza organizmem gospodarza. Z kolei w przypadku

napotkania niekorzystnych warunków do wzrostu w środowisku i braku nowego gospodarza omawiane mikroorganizmy giną [Ishii i Sadowsky 2008].



Rysunek 1. Schemat cyklu życiowego *Escherichia coli* [Ishii i Sadowsky 2008]
Schematic life-cycle of Escherichia coli [Ishii & Sadowsky 2008]

E. coli należy do mikroorganizmów zamieszkujących ludzki przewód pokarmowy. Komensalne szczepy koegzystują z organizmem człowieka z reguły nie powodując chorób u zdrowych osobników. Mogą wytwarzać witaminy K i B12 oraz chronić układ pokarmowy gospodarza przed mikroorganizmami chorobotwórczymi. Z reguły relacja ta przynosi obu gatunkom korzyści [Gomes i in. 2016, Blount 2015]. Poza wspomnianymi wyżej niechorobotwórczymi komensalami, w obrębie gatunku *E. coli* spotyka się również ludzkie patogeny [Pappelbaum i in. 2015].

2. Zagrożenia związane z patogennością *Escherichia coli*

Patogenne szczepy *E. coli* mogą wywoływać zakażenia jelit, układu krwionośnego, moczowego czy nerwowego. Wytwarzane przez nie toksyny mogą być przyczyną biegunek, owrzodzeń czy stanów zapalnych. Do powikłań zakażeń wywoływanych chorobotwórczymi szczepami *E. coli* należą: krwotoczne zapalenie jelita grubego, zespół hemolityczno-mocznicowy czy małopłytkowa plamica zakrzepowa [Półtorak i in. 2016, Zhao i in. 2018]. W literaturze patogenne szczepy *E. coli* podzielone są na podtypy pod względem posiadanych czynników wirulencji. W tabeli 1 zebrano informacje na temat wspomnianego podziału [Croxen i in. 2013, Gomes i in. 2016, Pasqua i in. 2017].

Tabela 1. Krótka charakterystyka głównych patotypów *Escherichia coli*
Short characteristics of Escherichia coli main pathotypes

Patotyp <i>Pathotype</i>	Mechanizm patogenności <i>Pathogenicity mechanism</i>	Wywoływane schorzenie <i>Triggered disease</i>	Źródła <i>Source</i>
AIEC (ang. <i>adherent invasive E. coli</i>) – adherentne inwazyjne <i>E. coli</i>	Fimbrie typu 1 oraz LPF umożliwiają im przyleganie do komórek nabłonka jelit i makrofagów, w których się namnażają.	Uważane za jeden z czynników powodujących chorobę Leśniowskiego-Crohna, a zarazem ziarniakowe zapalenie jelit.	Clements i in. 2012, Gomes i in. 2016, Półtorak i in. 2016
EAEC (ang. <i>enteroaggregative E. coli</i>) enteroagregatywne <i>E. coli</i>	Ułatwiające adherencję fimbrie AAF oraz wytwarzane toksyny: ciepłostąła enterotoksyna 1, toksyna ShET1, SepA, Pet, Pic oraz hemolizyna E.	Wodniste, krwawe lub niekrwawe, ostre, samo ograniczające się biegunki, którym może towarzyszyć ból brzucha, wymioty lub lekka gorączka. Zarówno u dzieci jak i u dorosłych.	Clements i in. 2012, Gomes i in. 2016, Półtorak i in. 2016
EPEC (ang. <i>enteropathogenic E. coli</i>) enteropatogenne <i>E. coli</i>	Adhezja do enterocytów, powodująca uszkodzenia kosmków jelitowych (tzw. zacieranie struktury i przyleganie) zachodząca dzięki białkom Nle i intymnie.	Głównie ostre, wodniste biegunki u niemowląt i małych dzieci (poniżej 1 roku życia). Niektóre prawdopodobnie wywołują też krwawe biegunki u dorosłych.	Croxen i in. 2013, Gomes i in. 2016, Assefa i Bihon 2018
ETEC (ang. <i>enterotoxigenic E. coli</i>) – enterotoksygenne <i>E. coli</i>	Adhezyny: CF i Paa. Toksyny: enterotoksyny typu „a” lub „b” odporne na wysokie temperatury (100°C do 15 minut), enterotoksyna nieodporna na działanie ciepła (60°C do 15 minut) oraz cytolizyna A.	Wodniste, ostre biegunki zarówno u dzieci jak i u dorosłych. Objawy podobne do przebiegu cholery: skurcze mięśni brzucha, wymioty, niewielka gorączka.	Clements i in. 2012, Gomes i in. 2016, Rojas-Lopez i in. 2018, Półtorak i in. 2016, Dubreuil i in. 2016
DAEC (ang. <i>diffusely adherent E. coli</i>) – dyfuzyjno-adherentne <i>E. coli</i>	Nie wytwarzają toksyn – ich patogenne działanie opiera się na adhezji (wykorzystując fimbrialne lub afimbrialne adhezyny) do enterocytów, powodującej uszkodzenie komórek nabłonka jelit i wywołującej stan zapalny.	Ostre biegunki u dzieci poniżej 5 roku życia, ponadto mogą być odpowiedzialne za zakażenia dróg moczowych i komplikacje ciąży. Podejrzewane również o działanie prozapalne mogące prowadzić do chorób zapalnych jelit.	Croxen i in. 2013, Servin 2014, Półtorak i in. 2016
STEC (ang. <i>Shiga toxin-producing E. coli</i>) – <i>E. coli</i> produkujące toksyny	1) EHEC wytwarzają adhezyny: intyminę, Paa, ToxB, Efa-1, LPF, Saa, EibG, EhaA, OmpA i Iha. Produkują też	Odpowiedzialne za zatrucia pokarmowe i krwawe biegunki o ciężkim przebiegu. Charakterystyczne dla odpowiednich typów	Clements i in. 2012, Garbowska i Berthold-Pluta 2013,

charakterystyczne dla rodzaju <i>Shigella</i> , w tym: 1) EHEC (ang. <i>enterohemorrhagic E. coli</i>) - enterokrwotoczne 2) EIEC (ang. <i>Shigella/enteroinvasive E. coli</i>) – enteroinwazyjne	toksyny wysoce podobne do wytwarzanych przez bakterie z rodzaju <i>Shigella</i> - toksyna Shiga 1 i Shiga 2. 2) EIEC posiadają zdolność do wytworzenia odpornej na działanie wysokich temperatur, enteroagregatywnej enterotoksyny 1 lub 2.	STEC są: 1) EHEC: biegunki występujące u dzieci, czerwotka bakteryjna 2) EIEC: hemolityczna anemia, hemolityczny zespół mocznicowy, krwotoczne zapalenie okrężnicy, trombocytopenia.	Croxen i in. 2013, Półtorak i in. 2016, Schiebel i in. 2017
UPEC (ang. <i>uropathogenic E. coli</i>) – uropatogenne <i>E. coli</i>	Czynniki związane z adhezją: wici, fimbrie, zewnątrzkomórkowe pęcherzyki, adhezyny, polisacharydowe kapsułki, lipopolisacharydy czy białka zewnątrzkomórkowe. Toksyny: alfa-hemolizyna, proteaza serynowa Sat oraz CNF1.	Zakażenia układu moczowego, w tym odmiedniczkowe zapalenie nerek i zapalenie pęcherza.	Kaper i in. 2004, Pasqua i in. 2017, Terlizzi i in. 2017, Pompilio i in. 2018,
NMEC (ang. <i>neonatal meningitis E. coli</i>) – <i>E. coli</i> wywołujące noworodkowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Substancją umożliwiającą bakteriom penetrację bariery krew-mózg jest cytoplazmatyczne białko CNF1.	Noworodkowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych.	Kaper i in. 2004, Wang i Kim 2013, Pasqua i in. 2017,

Skróty: Pet (ang. *plazmid-encoded toxin*) – toksyna enterotoksyczna; Pic (ang. *protease involved in intestinal colonization*) – proteaza serynowa ułatwiająca bakteriom kolonizację nabłonka jelitowego; ShET1 (ang. *Shigella enterotoxin 1*) – enterotoksyna 1 charakterystyczna dla *Shigella flexeri*; SepA (ang. *Shigella extracellular protein A*) – zewnątrzkomórkowe białko A, cytotoksyna typu *Shigella* [Półtorak i in. 2016]; CF (ang. *Colonization factors*) – rodzaj adhezyn zwany czynnikami kolonizacji; Paa (ang. *Porcine A/E associated adhesin*) – A/E związane adhezyny wieprzowe; Iha (ang. *IrgA homolog adhesin*) – adhezyna będąca homologiem IrgA; AAF (ang. *aggregative adhesion fimbriae*) – fimbrie umożliwiające agregatywną adhezję; LPF (ang. *long polar fimbriae*) – długie zlokalizowane biegunowo fimbrie; Efa-1 (ang. *E. coli factor for adherence*) – czynnik adhezyjny *E. coli*; Saa (ang. *STEC autoagglutinating adhesin*) – autoaglutynująca adhezyna STEC; EibG (ang. *E. coli immunoglobulin-binding protein*) – białko *E. coli* wiążące immunoglobuliny; EhaA (ang. *autotransporter encoding gene A*) – autotransporter kodowany genem A; OmpA (ang. *Outer membrane protein A*) – białko A zewnętrznej błony komórkowej [Clements i in. 2012, Półtorak i in. 2016]; CNF1 (ang. *cytotoxic necrotizing factor 1*) – cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący typu 1 [Wang i Kim 2013]; Nle (ang. *non-LEE protein*) – białka kodowane genami efektorowymi nie umiejscowionymi w regionie LEE [Gomes i in. 2016]; ToxB – (ang. *ToxB protein*) – białko podobne do toksyny B *Clostridium difficile* o właściwościach adhezyny lub wzmacniającej ekspresję adhezyn [Kutkowska i in. 2015].

Na szczególną uwagę zasługuje enterokrwotoczny patotyp EHEC (ang. *enterohemorrhagic E. coli*). Obejmuje on najlepiej poznane szczepy patogenne przenoszone przez żywność. Najczęściej do poważnych powikłań prowadzą zakażenia z udziałem bakterii patotypu EHEC, posiadających serotyp O157:H7. Wprowadzone do przewodu pokarmowego już w ilości poniżej 100 komórek, mogą doprowadzić do powstania poważnych stanów chorobowych [Garbowska i Berthold-Pluta 2013, Pappelbaum i in. 2015, Usein i in. 2017]. Najczęściej zatrucia wywołane szczepami o serotypie O157:H7 mają swoje źródło w mięsie wołowym oraz nabiale. Wśród żywności, będącej źródłem zakażeń chorobotwórczymi szczepami *E. coli* w literaturze wymienione są również: kiełki, sałata, szpinak, sok jabłkowy czy woda [Pennington 2010, Półtorak i in. 2016]. Obecność w produktach spożywczych szczepów patogennych *E. coli* może wynikać z braku odpowiednich procedur eliminujących je podczas procesu produkcyjnego. Drugą przyczyną jest wtórne zanieczyszczenie żywności bakteriami podczas jej przygotowywania, bądź produkcji w niewłaściwych warunkach [Pappelbaum i in. 2015, Garbowska i Berthold-Pluta 2013]. Wśród czynników przyczyniających się do rozprzestrzeniania patogenów z gatunku *E. coli* badacze wyróżniają też: niskie standardy higieny, długie drogi transportu żywności oraz nawyki żywieniowe ludności (np. tradycyjne spożywanie surowego mięsa) [Assefa i Bihon 2018]. Kontakt ze zwierzętami-nosicielami lub ich odchodami jest również jedną z głównych dróg rozprzestrzeniania się zakażeń patogennymi *E. coli*. Do przenoszenia bakterii może też dochodzić poprzez bezpośredni kontakt z osobą zainfekowaną [Półtorak i in. 2016].

Za potencjał chorobotwórczy *E. coli* odpowiada łatwość rozprzestrzeniania się szczepów patogennych i narastająca oporność tych bakterii na antybiotyki. W przypadku krajów o dużej zachorowalności często problem stanowi również niewłaściwy dobór leczenia. Różnorodność szczepów w połączeniu z utrudnionym dostępem do badań mikrobiologicznych może prowadzić do trudności w diagnostyce [Qadri i in. 2005, Giuntini i in. 2018]. Ze względu na ciągły brak efektywnej szczepionki, antybiotyki stanowią wciąż najważniejszy czynnik w walce z chorobotwórczymi *E. coli* [Rojas-Lopez i in. 2018].

Literatura dostarcza licznych przykładów niedawnych, dużych ognisk zatruc z udziałem patotypów omawianej bakterii. Jedno z nich miało miejsce w Japonii w 1993 roku i objęło ponad 2 500 przypadków. W 2011 roku hybrydowy szczep o cechach EHEC-EAEC spowodował w Europie 3 816 zachorowań, których skutkiem była śmierć 54 osób. Do zakażeń doszło łącznie w 14 krajach europejskich, Kanadzie i USA przy czym najwięcej przypadków odnotowano w Niemczech [Itoh i in. 1997, Pappelbaum i in. 2015, Rojas-Lopez i in. 2018]. W 2013 roku we Włoszech zanotowano 20 przypadków hemolitycznego zespołu

mocznicowego u dzieci, wywołanego zakażeniami *E. coli* sklasyfikowanymi jako patotyp STEC [Germinario i in. 2016]. W Rumunii w pierwszej połowie 2016 roku doszło do powstania ogniska zapalnego zakażeń *Escherichia coli*. Objęło ono 15 dzieci, których mediana wiekowa wynosiła 1 rok. Za wywołane przypadki zakażeń odpowiadały szczepy z grupy STEC [Usein i in. 2017]. W Stanach Zjednoczonych odnotowano w 2016 roku 65 ognisk zapalnych z udziałem *E. coli* (łącznie ponad tysiąc zachorowań) (<https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>). W tym samym roku na terenie Unii Europejskiej odnotowano ponad sześć tysięcy zakażeń wywołanych szczepami *E. coli* (<https://ecdc.europa.eu/en/escherichia-coli-ecoli/surveillance/atlas>).

3. Sposoby ograniczenia zakażeń patogennymi szczepami *Escherichia coli*

Do wczesnego ostrzegania przed zagrożeniami zdrowotnymi powodowanymi przez żywność lub pasze w Europie służy system RASFF [Pappelbaum i in. 2015]. Dane na temat zagrożeń epidemiologicznych występujących w Polsce, spowodowanych występowaniem w żywności *E. coli* opracowuje Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny. Instytucją odpowiedzialną za wydawanie norm mikrobiologicznych określających metody wykrywania i oznaczeń ilościowych bakterii *E. coli* w produktach spożywczych jest Polski Komitet Normalizacyjny.

Przykładem norm wykorzystywanych do oznaczania *E. coli* w żywności są PN-ISO 16649 oraz PN-ISO 7251. Pierwsza z nich opisuje metody znormalizowane dotyczące oznaczania β -glukuronidazo-dodatnich *E. coli* w ramach urzędowej kontroli żywności, zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (WE) 2073/2005 z 15 listopada 2005 roku z późniejszymi zmianami, w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. Norma PN-ISO 7251 opisuje z kolei metodę NPL (Najbardziej Prawdopodobnej Liczby) służącą do wykrywania obecności i oznaczania liczby domniemanych *E. coli*. Do detekcji w żywności patogennych szczepów może stosowana być z kolei norma PN-EN ISO 16654:2002 opisująca horyzontalną metodę wykrywania *E. coli*, które w określonych warunkach wytwarzają indol i aglutynują specyficznie z surowicą anty O157. Woda przeznaczona do spożycia przez ludzi podlega kontroli urzędowej zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2017 roku. Badanie na obecność *E. coli* prowadzone jest według metod opisywanych w PN-EN ISO 9308.

Obecnie stosowane sposoby detekcji *E. coli* w badanym materiale można podzielić na trzy główne typy: metody oparte na obserwacji hodowli, immunodetekcję oraz metody biologii molekularnej [Zhao i in. 2018]. Gomes i in. [2016] wśród proponowanych metod

wykrywania szczepów patogennych *E. coli* wymieniają: określanie cytotoksyczności zawiesinowej kultury bakteryjnej w odniesieniu do komórek eukariotycznych, technikę multipleks PCR, zastosowanie sond DNA, testy aglutynacji, metody immunofluorescencyjne, immunoblotting, metodę ELISA, testy radioimmunologiczne i testy biochemiczne. W ramach tych ostatnich można badać np. produkcję indolu, fermentację cukrów czy wytwarzanie gazów przez komórki bakteryjne. Stosuje się również obserwację ruchliwości bakterii lub ich zdolności do dekarboksylacji lizyny, ornityny czy argininy [Gomes i in. 2016].

Tradycyjną metodą analizy właściwości chorobotwórczych wyizolowanego szczepu *E. coli* są testy immunochemiczne. Służą one do wykrywania antygenów związanych z mechanizmami patogenności bakterii (wymienionymi w tabeli 1) [Jarzab i in. 2011, Fratamico i in. 2016]. Nowoczesne podejście obejmuje z kolei wykorzystanie technik biologii molekularnej w celu identyfikacji genów oporności na antybiotyki, czynników wirulencji oraz serotypu bakterii. Jedną z takich metod jest elektroforeza DNA bakteryjnego, uprzednio poddanej łańcuchowej reakcji polimerazy z użyciem odpowiednio dobranych primerów oligonukleotydowych [Shahrani i in. 2014, Miri i in. 2017]. Według Fratamico i in. [2016] technikami, za pomocą których można jednoznacznie zaklasyfikować *E. coli* do wybranego serotypu są przede wszystkim: sekwencjonowanie całego genomu, elektroforeza pulsowa oraz metody wykorzystujące analizę porównawczą sekwencji wybranych genów.

Trudności dotyczące wykrywania w żywności patogennych *E. coli* wynikają zazwyczaj ze złożoności środowiska mikrobiologicznego, charakteryzującego produkty spożywcze. Niekiedy może również dochodzić do sytuacji, w której dany szczep nie daje się wyhodować w środowisku *in vitro*, pomimo iż wykazuje żywotność *in vivo* [Aurass i in. 2011, Pappelbaum i in. 2015]. Według Law i in. [2014] w ciągu 20 lat na świecie wzrosła liczba zachorowań wywoływanych patogenami obecnymi w żywności. Niezbędne jest więc ciągle opracowywanie nowych metod pozwalających na szybką detekcję mikroorganizmów chorobotwórczych w produktach spożywczych [Law i in. 2014].

Obecnie główną metodą redukcji liczby patogenów występujących w żywności jest obróbka termiczna. Nie zawsze jest ona wystarczająca ze względu na to, że niektóre szczepy *E. coli* wykazują dużą przeżywalność w wysokich temperaturach [Li i Gänzle 2016]. W celu ograniczenia liczby bakterii w produktach spożywczych, wykorzystywana może być również obróbka z zastosowaniem wysokich ciśnień, naświetlanie promieniami gamma czy mycie produktów spożywczych z zastosowaniem środków dezynfekujących (np. chloru i kwasu nadoctowego). Nowatorską metodą, która pozwala na usunięcie z żywności jedynie wybranych drobnoustrojów jest zastosowanie bakteriofagów [Wisniewsky i in. 2000, Hong

i in. 2018, Moye i in. 2018].

PODSUMOWANIE

Escherichia coli towarzyszy nam od urodzenia jako komensalny mikroorganizm zamieszkujący układ pokarmowy. Część szczepów *E. coli* wykazuje jednak zdolności patogenne, skutkujące wywoływaniem schorzeń, niekiedy zagrażających ludzkiemu zdrowiu i życiu. Potencjał chorobotwórczy, łatwość rozprzestrzeniania się oraz narastająca oporność na antybiotyki wspomnianych bakterii powodują, że niezbędne jest monitorowanie ich obecności w produktach spożywczych. Ciągłe na świecie dochodzi do masowych zatruc z udziałem *E. coli*, również na terenie Europy. Międzynarodowe działania doprowadziły do wypracowania systemów wczesnego ostrzegania przed zagrożeniami mikrobiologicznymi, takich jak RASFF oraz odpowiednich norm detekcji *E. coli* w żywności. Wciąż jednak niezbędne jest opracowanie nowych metod pozwalających na szybkie wykrywanie obecności patogenów w produktach spożywczych.

PIŚMIENNICTWO

1. Ajayi O., Williams L.L., Oluwoye J., Johnson J.U., Okafor F., Sanders O.G., Wilson T. (2011), Epidemiological approaches to food safety, *Food Protect. Trends*. 31: 560–568
2. AlRabiah H. (2018), pH plays a role in the mode of action of trimethoprim on *Escherichia coli*, *PLoS One.*, 13(7): e0200272
3. Assefa A., Bihon A. (2018), A systematic review and meta-analysis of prevalence of *Escherichia coli* in foods of animal origin in Ethiopia, *Heliyon.*, 4(8): e00716
4. Aurass P., Prager R., Flieger A. (2011), EHEC/EAEC O104:H4 strain linked with the 2011 German outbreak of haemolytic uremic syndrome enters into the viable but non-culturable state in response to various stresses and resuscitates upon stress relief, *Environ Microbiol.*, 13(12): 3139-48
5. Baj J., Markiewicz Z. (red.) (2015). *Biologia Molekularna Bakterii*. Wydawnictwo PWN. Warszawa. Rozdz. 2 (Markiewicz Z.): 21-22
6. Blount Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *eLife*, 4: e05826.
7. C. R. Usein, A.S., Ciontea, Militaru C.M., Condai M., Dinu S., Oprea M., Cristea D., Michelacci V., Scavia G., Zota L.C., Zaharia A., Morabito S. (2017) Molecular characterisation of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains: results of an outbreak investigation, Romania, February to August 2016, *Euro Surveill.*, 22(47): 17-00148

8. Clements A., Young J.C., Constantinou N., Frankel G. (2012), Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*, 3(2): 71-87
9. Clermont O., Christenson J.K., Denamur J.K., Gordon D.M. (2013), The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups, Environ Microbiol Rep., 5(1): 58-65
10. Cobbaut K., Houf K., Buvens G., Habib I., De Zutter L (2009), Occurrence of non-sorbitol fermenting, verocytotoxin-lacking *Escherichia coli* O157 on cattle farms. Vet. Microbiol. J., 138:174–178
11. Croxen M.A., Law R.J., Scholz R., Keeney K.M., Wlodarska M., Finlay B.B. (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews, 26/4: 822-880
12. Dubreuil J.D., Isaacson R.E., Schirrerli D.M. (2016), Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*, EcoSal Plus, 7(1): 10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016
13. Elsas J.D., Semenov A.V., Costa R., Trevors J.T. (2011), Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects, ISME J., 5(2): 173-183
14. Förster A.H., Gescher J. (2014). Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Production of Mixed-Acid Fermentation End Products. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2: 16
15. Foster J.W. (2004), *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile, Nat Rev Microbiol., 2(11): 898-907
16. Fratamico P.M., DebRoy C., Liu Y., Needleman D.S., Baranzoni G.M., Feng P. (2016), Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*, Front Microbiol., 7: 644
17. Garbowska M., Berthold-Pluta A. (2013), *Escherichia coli* w produktach mleczarskich, Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego 1/2013: 106-110
18. Germinario C., Caprioli A., Giordano M., Chironna M., Gallone M.S., Tafuri S., Minelli F., Maugliani A., Michaelacci V., Santangelo L., Mongelli O., Montagna C., Scavia G. (2016), Community-wide outbreak of haemolytic uraemic syndrome associated with Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* O26:H11 in southern Italy, summer 2013, 21(38): 30343
19. Giuntini S., Stoppato M., Sedic M., Ejemel M., Pondish J.R., Wisheart D., Schiller Z.A., Thomas, Jr. W.D., Barry E.M., Cavacini L.A., Klempner M.S., Wang Y. (2018), Identification and Characterization of Human Monoclonal Antibodies for

- Immunoprophylaxis against Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infection, *Infect Immun.*, 86(8): e00355-18
20. Gomes T.A.T., Elias W.P., Scaletsky I.C.A., Guth B.E.C., Rodrigues J.F., Piazza R.M.F., Ferreira L.C.S., Martinez M.B. (2016), Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Braz J Microbiol.*, 47(Suppl 1): 3-30
21. Hong J.K., Jang S.J., Lee Y.H., Jo Y.S., Yun J.G., Jo H., Park C.J., Kim H.J. (2018), Reduced Bacterial Wilt in Tomato Plants by Bactericidal Peroxyacetic Acid Mixture Treatment, *Plant Pathol J.*, 34(1): 78-84
22. Ishii S., Sadowsky M.J. (2008), *Escherichia coli* in the environment, *Microbes Environ.*, 23(2): 101-8
23. Itoh Y., Nagano I., Kunishima M., Ezaki T. (1997), Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness, *J Clin Microbiol.*, 35(10): 2546-2550
24. Iwase T., Tajima A., Sugimoto S., Okuda K., Hironaka I., Kamuta Y., Takada K., Mizunoe Y. (2013), A Simple Assay for Measuring Catalase Activity: A Visual Approach, *Sci Rep.*, 3: 3081
25. Jarzab A., Górska-Frączek S., Rybka J., Witkowska D. (2011), Zakażenia pałeczkami jelitowymi – diagnostyka, oporność na antybiotyki i profilaktyka, *Postępy Hig Med Dośw.*, 65: 55-72
26. Jiang Z.D., Lowe B., Verenkar M.P., Ashley D., Steffen R., Tornieporth N., von Sonnenburg F., Waiyaki P., DuPont H.L. (2002), Prevalence of enteric pathogens among international travelers with diarrhea acquired in Kenya (Mombasa), India (Goa), or Jamaica (Montego Bay). *The Journal of Infectious Diseases*, 185/4: 497-502
27. Kaas R.S., Friis C., Ussery D.W., Aarestrup F. (2012), Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes. *BMC Genomics*, 13: 577
28. Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L.T. (2004), Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 123-140
29. Koga V.L., Tomazetto G., Cyoia P.S., Neves M.S., Vidotto M.C., Nakazato G., Kobayashi R.K. (2014), Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil, *BioMed Research International.*, doi: 10.1155/2014/465054

30. Kutkowska J., Michalska-Szymaszek M., Matuszewska R., Chmiel E., Urbanik-Sypniewska T. (2015), Antygeny powierzchniowe i czynniki wirulencji *Escherichia coli* O157, Post Mikrobiol., 54, 1, 53-64.
31. Law J.W., Ab Mutalib N., Chan K., Lee L. (2014), Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations, Front Microbiol., 5: 770
32. Leimbach A., Hacker J., Dobrindt U. (2013), *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity, Curr Top Microbiol Immunol, 358:3-32
33. Li G., Young K.D. (2013), Indole production by the tryptophanase TnaA in *Escherichia coli* is determined by the amount of exogenous tryptophan, Microbiology., 159(Pt 2): 402 - 10
34. Li H., Gänzle M. (2016), Some Like It Hot: Heat Resistance of *Escherichia coli* in Food, Front Microbiol., 7: 1763
35. Miri S.T., Dashti A., Mostaan S., Kazemi F., Bouzari S. (2017), Identification of different *Escherichia coli* pathotypes in north and north-west provinces of Iran, Iran J Microbiol., 9(1): 33-37
36. Moyo Z.D., Woolston J., Sulakyelidze A. (2018), Bacteriophage Applications for Food Production and Processing, Viruses., 10(4): 205
37. Pappelbaum K., Kasprzak J., Czaczyk K. (2015), Występowanie werotoksycznych *Escherichia coli* w żywności, ze szczególnym uwzględnieniem serotypu O104:H4, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość., 5(102): 33-48
38. Pasqua M., Michaelacci V., Di Martino, M.L., Tozzoli R., Grossi M., Colonna B., Morabito S., Prosseda G. (2017), The Intriguing Evolutionary Journey of Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward Pathogenicity, Front Microbiol. 8: 2390
39. Pennington H. (2010), *Escherichia coli* O157, Lancet, 376:1428–1435
40. Półtorak K., Wiczorek K., Osek J. (2016), Patogenne *Escherichia coli* – mechanizmy chorobotwórczości, Med. Weter., 72(6): 352-357
41. Pompilio A., Crocetta V., Savini V., Petrelli D., Di Nicola M., Bucco S., Amoroso L., Bonomini M., Di Bonaventura G. (2018), Phylogenetic relationships, biofilm formation, motility, antibiotic resistance and extended virulence genotypes among *Escherichia coli* strains from women with community-onset primitive acute pyelonephritis, PLoS One., 13(5):e0196260

42. Quadri F., Svennerholm A., Faruque A.S.G., Sack R.B. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment and Prevention. *Clinical Microbiology Reviews*, 18/3: 465-4
43. Rojaz-Lopez M., Monterio R., Pizza M., Desvaux M., Rosini R. (2018), Intestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Insights for Vaccine Development, *Front Microbiol.*, 9:440
44. Scheutz F. i Strockbine N.A. (2005), rozdział: Genus I. *Escherichia*, str. 607. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition. Volume Two: The Proteobacteria. Part B: The Gammaproteobacteria.* Editors: Editor-in-chief: Garrity G.M.; Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. Springer International Publishing. New York
45. Schiebel J., Böhm A., Nitschke J., Burdukiewicz M., Weinreich J., Ali A., Roggenbuck D., Rödiger S., Schierack P. (2017), Genotypic and Phenotypic Characteristics Associated with Biofilm Formation by Human Clinical *Escherichia coli* Isolates of Different Pathotypes, *Appl Environ Microbiol.*, 83(24):e01660-17
46. Schlegel S., Genevaux P., de Gier J. (2017), Isolating *Escherichia coli* strains for recombinant protein production, *Cell Mol Life Sci.*, 74(5): 891-908
47. Servin A.L. (2014), Pathogenesis of Human Diffusely Adhering *Escherichia coli* Expressing Afa/Dr Adhesins (Afa/Dr DAEC): Current Insights and Future Challenges, *Clinical Microbiology Reviews*. 27/4: 823-869
48. Shahrani M., Dehkordi F.S., Momtaz H. (2014), Characterization of *Escherichia coli* virulence genes, pathotypes and antibiotic resistance properties in diarrheic calves in Iran, *Biol Res.*, 47(1): 28
49. Terlizzi M.E., Gribaudo G., Maffei M.E. (2017), UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies, *Front Microbiol.*, 8: 1566
50. Tiso M., Schechter A.N. (2015), Nitrate Reduction to Nitrite, Nitric Oxide and Ammonia by Gut Bacteria under Physiological Conditions, *PLoS One*, 10(3): e0119712
51. Wang M., Kim K.S. (2013), Cytotoxic Necrotizing Factor 1 Contributes to *Escherichia coli* Meningitis, *Toxins (Basel)*, 5(11): 2270-2280
52. Wisniewsky M.A., Glatz B.A., Gleason M.L., Reitmeier C.A. (2000), Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 counts on whole fresh apples by treatment with sanitizers., *J Food Prot.*, 63(6): 703-8
53. Zhang S., He D., Yang Y., Lin S., Zhang M., Dai S., Chen P.R. (2016), Comparative proteomics reveal distinct chaperone-client interactions in supporting bacterial acid resistance, *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 113(39): 10872-7

54. Zhao Y., Wang H., Jia G., Li Z. (2018), Application of Aptamer-Based Biosensor for Rapid Detection of Pathogenic *Escherichia coli*, *Sensors (Basel)*, 18(8): 2518

Cytowane normy:

- PN-ISO 16649-1:2004 Mikrobiologia żywności i pasz - Horyzontalna metoda oznaczania liczby beta-glukuronidazo-dodatnich *Escherichia coli* - Część 1: Metoda płytkowa w temperaturze 44°C z zastosowaniem membran i 5-bromo-4-chloro-3-indolilo beta-D-glukuronidu
- PN-ISO 16649-2:2004 Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby β -glukuronidazo-dodatnich *Escherichia coli* – Część 2: Metoda płytkowa w temperaturze 44°C z zastosowaniem 5-bromo-4-chloro-3-indolilo β -D-glukuronidu
- PN-EN ISO 16649-3:2015-07 Mikrobiologia łańcucha żywnościowego - Horyzontalna metoda oznaczania liczby beta-glukuronidazo-dodatnich *Escherichia coli* – Część 3: Wykrywanie i oznaczanie techniką najbardziej prawdopodobnej liczby z zastosowaniem 5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -D-glukuronidu
- PN-ISO 7251:2006 Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby przypuszczalnych *Escherichia coli*. Metoda najbardziej prawdopodobnej liczby
- PN-EN ISO 9308-1:2014-12 Jakość wody - Oznaczanie ilościowe *Escherichia coli* i bakterii grupy coli - Część 1: Metoda filtracji membranowej do badania wód o małej ilości mikroflory towarzyszącej
- PN-EN ISO 9308-2:2014-06 Jakość wody - Oznaczanie ilościowe *Escherichia coli* i bakterii grupy coli - Część 2: Metoda najbardziej prawdopodobnej liczby
- PN-EN ISO 16654:2002 Mikrobiologia żywności i pasz - Horyzontalna metoda wykrywania *Escherichia coli* O157

Adresy internetowe:

- <https://ecdc.europa.eu/en/escherichia-coli-ecoli/surveillance/atlas>, 23.11.2018
- <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>, 22.11.2018
- <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>, 26.11.2018