

# DOKAZIVANJE VEROTOKSIGENE BAKTERIJE *Escherichia coli* U ŠKOLJKAŠA IZ PROIZVODNIH PODRUČJA ISTOČNE OBALE JADRANA

---

Listeš, Irena

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:352216>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)





Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Irena Listeš

**DOKAZIVANJE VEROTOKSIGENE  
BAKTERIJE *Escherichia coli*  
U ŠKOLJKAŠA IZ PROIZVODNIH  
PODRUČJA ISTOČNE OBALE JADRANA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013



University of Zagreb  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Irena Listeš

**DETECTION OF VEROTOXIN  
PRODUCING *Escherichia coli*  
IN SHELLFISH FROM PRODUCTION  
AREA OF EASTERN ADRIATIC COAST**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013



Sveučilište u Zagrebu  
VETERINARSKI FAKULTET

IRENA LISTEŠ

**DOKAZIVANJE VEROTOKSIGENE  
BAKTERIJE *Escherichia coli*  
U ŠKOLJKAŠA IZ PROIZVODNIH  
PODRUČJA ISTOČNE OBALE JADRANA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:  
Prof. dr. sc. Lidija Kozačinski

Zagreb, 2013



University of Zagreb  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Irena Listeš

**DETECTION OF VEROTOXIN  
PRODUCING *Escherichia coli*  
IN SHELLFISH FROM PRODUCTION  
AREA OF EASTERN ADRIATIC COAST**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:  
Prof. dr. sc. Lidija Kozačinski

Zagreb, 2013

Prvenstveno zahvaljujem mojoj matičnoj kući - Hrvatskom veterinarskom institutu Zagreb koji je omogućio moj cjelokupni znanstveni napredak, a naročito ravnatelju prof. dr. sc. Željku Cvetniću i predstojniku Veterinarskog Zavoda Split, dr. sc. Eddyu Listešu na strpljenju i financijskoj potpori.

Zahvaljujem osoblju laboratorija za sigurnost hrane, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Teramo, Italija, na ustupanju laboratorijskog soja VTEC O157:H7 iz vlastite zbirke, te dr. sc. Ani Kovačić i posebno dr. Merici Carev iz Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Splitsko - Dalmatinske županije, na utrošenom vremenu, tehničkoj pomoći i ustupanju izdvojene DNA verotoksigene *E. coli*, za uspostavu pozitivnih kontrola bez kojih ne bi bilo moguće verificirati razvijene metode u ovom istraživanju. Također se zahvaljujem na pomoći i dr. Višnji Kružičević u Nacionalnom referentnom centru za salmonele, Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, Zagreb.

Zahvaljujem se dragim kolegama iz Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu dr. sc. Miroslavu Beniću na velikoj pomoći pri statističkoj obradi podataka, dr. sc. Silviju Špičiću na pomoći, savjetima i sugestijama, a naročito kolegicama dr. sc. Ivani Račić i dr. sc. Sanji Duvnjak na tehničkoj pomoći i vrsno uspostavljenoj PCR metodi i nezamjenjivim rezultatima tijekom mog istraživanja.

Posebno zahvaljujem svojim tehničarima na pomoći koja nikad nije bila uskraćena, kao i svim djelatnicima Veterinarskog zavoda Split na kolegijalnosti i dobrim željama.

Zahvaljujem se dr. sc. Slavenu Joziću sa Instituta za oceanografiju i ribarstvo Split – IZOR bez čije pomoći ne bi bilo vrijednog doprinosa mom istraživanju o stvarnom dokazu preživljavanja VTEC u moru i unosa VTEC u organizam živih školjkaša u prirodnim uvjetima.

Srdačno zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Lidiji Kozačinski na savjetima i pomoći kako da od čudnovato složene (nemale) hrpe podataka dobijem poželjnu formu, a bez čije upornosti ova disertacija ne bi imala potrebnu čitkost i jasnoću.

Zahvaljujem svojim roditeljima na svim vidovima njihove pomoći, psihičke, fizičke, financijske i svake druge za koju samo roditelj zna, a naročito što su u mene ugradili upornost i vjeru da se trud isplati. Naročito zahvaljujem svojoj svekrvi na svim onim skuhanim ručkovima koji su umanjili grižnju savjesti i brigu za zdravlje moje obitelji i općenito na darovanom vremenu. Ujedno zahvaljujem i njenom mužu što joj je to dopustio.

Djeci i mužu se ispričavam za deset godina loše mame i supruge, stoga njima najveće hvala za čekanje da se i nama život desi.

## SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA	3
2.1. Taksonomija i svojstva bakterije <i>E. coli</i>	3
2.2. Patovarovi <i>E. coli</i>	4
2.3. Epidemiologija i VTEC serotipovi	8
2.4. Klinička slika i patogeneza	19
2.5. Otkrivanje verotoksigenih sojeva bakterije <i>E. coli</i> (VTEC)	30
2.5.1. Klasične metode detekcije i izolacije VTEC	31
2.5.2. Imunoenzimski test - ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	39
2.5.3. Lančana reakcija polimerazom - PCR (Polymerase Chain Reaction)	42
2.5.4. Biokemijska i serološka potvrda	47
3. OBRAZLOŽENJE TEME	49
4. MATERIJAL I METODE	50
4.1. Podrijetlo uzoraka i uzorkovanje školjkaša	50
4.2. Postupci izolacije i identifikacije <i>E. coli</i>	58
4.2.1. Metoda za brojanje i izolaciju $\beta$ -glukuronidaza pozitivne <i>E. coli</i> (ISO/TS 16649-3/2005)	58
4.2.2. Metode za izolaciju $\beta$ -glukuronidaza negativne <i>E. coli</i>	59
4.2.3. Postupak verifikacije metoda izolacije $\beta$ -glukuronidaza negativne <i>E. coli</i> sa VTEC O157:H7	65
4.3. Imunoenzimski test - ELISA	68
4.3.1. Verifikacija ELISA metode	71
4.3.2. Dokazivanje mogućnosti onečišćenja živih školjkaša sa VTEC putem prirodne filtracije morske vode	74
4.4. Lančana reakcija polimerazom - PCR i verifikacija postupka	76
4.5. Serološka identifikacija VTEC	82
4.6. Statistička obrada podataka	83
5. REZULTATI	84
5.1. Verifikacija prikladnosti metoda 1, 2 i 3 za izdvajanje $\beta$ -glukuronidaza negativne <i>E. coli</i> sa VTEC O157:H7	84
5.1.1. Izbor najprikladnije tehnike naciepljivanja obogaćene kulture na ploče agara	84
5.1.2. Provjera osjetljivosti metoda različitim razinama zagađenja s VTEC O157:H7	92

5.2. Verifikacija ELISA metode dokazom verotoksina u uzorcima homogenata školjkaša zagađenih sa VTEC O157:H7	98
5.2.1. Dokaz verotoksina u školjkaša uz dodanu kompetitivnu mikrofloru	98
5.2.2. Dokaz verotoksina u školjkaša uz prirodnu kompetitivnu mikrofloru	99
5.2.3. Provjera mogućnosti dokaza verotoksina ELISA metodom bez umnažanja	99
5.2.4. Rezultat pokusa mogućnosti izolacije VTEC i dokaza prisutnosti verotoksina ELISA metodom iz školjkaša zagađenih prirodnim putem filtracijom mora	101
5.2.5. Osjetljivost, specifičnost i podudarnost ELISA metode	107
5.3. Verifikacija PCR metode	109
5.4. Rezultati pretrage školjkaša na prisutnost verotoksigene <i>E. coli</i> u proizvodnim područjima školjkaša dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana	111
5.4.1. Odnos uzoraka školjkaša sa izoliranom <i>E. coli</i> i ukupnog broja pretraženih školjkaša	111
5.4.2. Dokaz VTEC i EPEC PCR metodom nalaza gena u kulturama <i>E. coli</i>	112
5.4.3. Genotipske i fenotipske karakteristike PCR pozitivnih kultura <i>E. coli</i>	116
5.4.4. Područja i točke uzorkovanja školjkaša s utvrđenim VTEC/EPEC	117
5.4.5. Prevalencija VTEC/EPEC u školjkašima dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana	119
5.4.6. Utjecaj vrste školjkaša na prevalenciju VTEC/EPEC i odnosi među vrstama	120
5.4.7. Utjecaj MPN <i>E. coli</i> na pojavnost VTEC/EPEC u školjkašima	122
5.4.8. Odnos vrijednosti MPN <i>E. coli</i> različitih vrsta školjkaša	123
5.4.9. Utjecaj različitih proizvodnih područja dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana na prevalenciju VTEC/EPEC i njihovi međusobni odnosi	125
5.4.10. Utjecaj MPN <i>E. coli</i> /100g na pojavnost VTEC/EPEC među proizvodnim područjima dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana	129
5.4.11. Odnos vrijednosti MPN <i>E. coli</i> različitih proizvodnih područja dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana	131
5.4.12. Prevalencija VTEC / EPEC uz MPN <i>E. coli</i> različitih vrsta školjkaša u istom proizvodnom području	133
5.4.13. Povezanost MPN vrijednosti <i>E. coli</i> sa pojavom VTEC i EPEC u školjkašima dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana	136
5.4.14. Kronološke razlike u pojavnosti VTEC i EPEC	138
6. RASPRAVA	141



7. ZAKLJUČCI	169
8. POPIS LITERATURE	172
9. PRILOZI	203
10. ŽIVOTOPIS	217

## SAŽETAK

Provedenim istraživanjem je po prvi puta u školjkašima istočne obale Jadrana dokazana prisutnost verotoksigene *E. coli* (VTEC), a ujedno i enteropatogene *E. coli* (EPEC). Cilj istraživanja je bio dokazati prisutnost i mogućnost detekcije VTEC u morskih školjkaša. VTEC O157:H7 uz 3-5% sojeva *E. coli* ne posjeduju enzim  $\beta$ -glukuronidazu ( $\beta$ -GLUC(-)) pa se ne mogu otkriti propisanom MPN metodom za *E. coli* u školjkašima. Modifikacijom klasičnih metoda za izdvajanje i brojanje  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* i metoda za izdvajanje  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7, u periodu od 2007. do 2009. godine sakupljene su kulture iz 900 uzoraka školjkaša. Istovremeno je 258 uzoraka školjkaša pretraženo ELISA metodom za detekciju Stx u fecesu, prilagođenoj školjkašima. U jednom uzorku školjkaša utvrđen je Stx, a u izolatu *E. coli* PCR postupkom je potvrđena prisutnost *stx* gena. Pokusom zagađenja školjkaša prirodnom filtracijom mora onečišćenog s VTEC O157:H7 potvrđena je mogućnost prijenosa VTEC iz mora u školjkaše uz očuvanu sposobnost stvaranja verotoksina, što je i istovremena potvrda izabranih metoda. U izolatima *E. coli*, izdvojenima iz uzoraka školjkaša tijekom redovite kontrole, PCR pretragom su iz četiri uzorka dagnji i jednog uzorka prnjavica utvrđeni različiti genotipovi, *stx1*; *stx2*, *stx1+eae*, te *stx1+eae+hlyA* - genotip visoko patogenih sojeva EHEC. Prevalencija VTEC iznosi 1% (5/521) u uzorcima s izdvojenom *E. coli*, odnosno 0,6% (5/900) u odnosu na ukupni broj pretraženih školjkaša. U 1,9% (17/900) uzoraka školjkaša utvrđena je i EPEC. Utvrđeni serotipovi VTEC su O7, O78, te O55 povezani sa slučajevima hemoragijskog uremičnog sindroma - HUS. Prevalencija VTEC u ukupnom broju pretraženih uzoraka je u prnjavicama iznosila 0,9% dok je u dagnji bila 0,6%. U kamenicama i kunjkama bakterija nije utvrđena. Opažene razlike u prevalenciji VTEC između različitih vrsta školjkaša nisu statistički značajne ( $p=0,8$ ). VTEC su pronađene u 2/12 proizvodnih područja s najvećim brojem u Malostonskom zaljevu (4/498), ali je prevalencija VTEC od 0,8% nešto manja nego u području Ušća rijeke Krke (0,9%) sa 1/110 VTEC u pretraženim školjkašima. Razlike u prevalenciji VTEC između proizvodnih područja nisu statistički značajne ( $p=0,87$  i  $p=0,9$ ). Opažene razlike MPN *E. coli*/100g bez obzira na vrstu školjkaša i proizvodno područje nisu u korelaciji s nalazom VTEC i EPEC ( $p=0,39$  i  $p=0,07$ ). VTEC je utvrđena u uzorcima i s najmanjom brojivom količinom od 20 MPN *E. coli*/100g. Sezonske varijacije pojave VTEC u školjkašima između toplijeg i hladnijeg dijela godine nisu statistički značajne ( $p=0,17$ ) za razliku od pojavnosti VTEC između različitih godina (od 0% u 2007. godini do 3,9% u 2010. godini) što je statistički značajno ( $p=0,04$ ).

**Ključne riječi:** VTEC, školjkaši, proizvodna područja, izdvajanje, ELISA, PCR

## ABSTRACT

**Introduction:** *E. coli* bacteria is a very common bacterium and normal inhabitant of the intestinal tract in humans and animals. A great majority of strains of *E. coli* are harmless, whereas strains of VTEC which produce verotoxin (Stx) cause serious diseases. Due to the different ways of spreading, it is possible to find strains of VTEC in the sea. Shellfish feed by filtering the sea water and concentrate substances in their organisms, so the aim of the research was to prove the presence and possibility of detection of VTEC during the regular monitoring of shellfish products. The prescribed MPN method of enumeration and detection of *E. Coli* in shellfish is based on the fact that the majority of strains of *E. Coli* rise at 44 °C and contain the  $\beta$ -glucuronidase enzyme;  $\beta$ -gluc(+). The strains of VTEC cover around 200 strains of *E. Coli* of which 3-5% of strains as well as the extremely pathogenic strain of *E. coli* O157:H7 do not have the  $\beta$ -glucuronidase enzyme -  $\beta$ -gluc(-) and cannot be detected using the standard prescribed method.

**Material and methods:** Combining the classical cultural methods used for isolation and enumeration of  $\beta$ -gluc(+) *E. coli* and method of allocation of  $\beta$ -gluc(-) *E. coli* O157:H7, in the period from 2007 till 2010, a culture from 900 samples of shellfish was collected for further identification of VTEC. At the same time 258 samples of shellfish (29%) were tested using ELISA method for detection of verotoxin in feces which was adapted for shellfish by enrichment. Classical methods of isolation of *E. coli* and ELISA methods were verified with three  $\beta$ -gluc(+); Stx(-) *E. coli* strains and  $\beta$ -gluc(-); Stx (+) *E. coli* O157:H7, and with the experiment of contaminating the shellfish with natural filtration of sea polluted with VTEC O157:H7. The experiment proved the spreading of VTEC from the sea to shellfish with a preserved possibility of producing verotoxin, thus confirming the successful implementation of methods. The isolates of *E. coli* obtained by the earlier methods, were tested using *multiplex* PCR test of genes on markers virulence *stx1*, *stx2*, *eae* and *hlyA*. PCR method was verified with bacteria culture VTEC O157:H7, and the extracted DNA *E. coli* O26 and O111, origin of people with symptoms of HUS. The compatibility of ELISA with PCR is 100%.

**Results:** In isolates of *E. coli*, with PCR test of genes on VTEC markers, from 4 samples of mussels and one from a warty venus, the presence of *stx* gene was confirmed. ELISA method identified verotoxin in one shellfish sample, and using PCR in the stored isolate *E. coli*, the presence of *stx* gene was also confirmed. The compatibility of ELISA with PCR is 100%. Prevalence is 1% VTEC in samples with isolated *E. coli* and prevalence of VTEC of 0,6% in the complete number of 900 tested shellfish samples. In 3,3% isolated *E. coli* EPEC was established which is a prevalence of 1,9% of the complete number of shellfish.

In mussels, genotypes were found; two *stx2*; one *stx1, eae*; and *stx1, eae, hlyA* – genotype of highly pathogenic EHEC strains. In warty venus only one *stx1* gene was found. Not one culture has both genes. Serotyping of VTEC culture established serotypes O7, O78, and O55 which is connected with cases of HUS and sporadic epidemics. Prevalence of VTEC in the complete number of tested samples is the highest in warty venus; 0.9% as compared to mussels; 0.6%. In oysters and Noah's ark shell prevalence is 0%. The noted differences in prevalence VTEC and EPEC in the complete number of tested samples of various shellfish is not statistically significant (both  $p=0.8$ ). Value of MPN *E. coli*/100g sample with VTEC varies from 16000 MPN to the lowest value of 0 MPN *E. coli* /100g shellfish. The noticed differences in the frequency of unsatisfactory market test results ( $>230$  MPN) among the various types of shellfish are statistically significant ( $p<0.001$ ). VTEC have been found in 2/12 production areas, whilst EPEC positive samples have been found in nearly half of the areas, 5/12. The greatest number of established VTEC positive samples is in the Malostonski bay (4/498), but the prevalence of 0.8% VTEC somewhat lower than 0.9% in the area of the mouth of the river Krka with the established VTEC in 1/110 of tested shellfish. Differences in prevalence VTEC and EPEC samples in the complete number of tested samples from various production areas of the Dalmatian part of the Eastern coast of the Adriatic are not statistically significant ( $p=0.87$  and  $p=0.9$ ). The highest value of 16000 MPN *E. coli*/100g shellfish with VTEC established in the samples in the area of the mouth of the river Krka. With regards to the level of MPN *E. coli* /100g shellfish, the noticed differences in the number of unsatisfactory samples ( $>230$  MPN) among the different locations are statistically significant ( $p<0.001$ ). Within the same area the differences among the values of MPN *E. coli* in the four different species of shellfish is not statistically significant as compared to the variations among the species in the whole tested area, so with regards to the level of MPN *E. coli*, there is a more significant influence of the production area rather than species. Regardless of the species of shellfish and production area, the noticed differences MPN *E. coli*/100g in shellfish are not in correlation with the findings of enteropathogenic and verotoxigenic *E. coli* ( $p=0.07$  and  $p=0.39$ ). The presence of VTEC is not conditioned by the level of MPN *E. coli* because VTEC has been established in samples with the lowest enumeration quantity 20 MPN *E. coli*/100g. Seasonal variations of evidence of VTEC in shellfish between the warmer and colder part of the year is from 1.7% to 12.5%, but overall in the research period from September 2007 till June 2010, the seasonality are not statistically significant ( $p=0.17$ ) as compared to the occurrence of VTEC during the different years (from 0% in 2007 to 3.9% in 2010) which is statistically significant ( $p=0.04$ ).

**Conclusion:** The research on the Eastern coast of the Adriatic sea, for the first time, proved presence of verotoxigenic *E. coli* – VTEC. It also proved the presence of enteropathogenic *E. coli* – EPEC.

**Keywords:** VTEC, shellfish, production areas, cultural methods, PCR, ELISA

## 1. UVOD

Bakterija *Escherichia coli* je uobičajeni stanovnik crijeva čovjeka i domaćih životinja, pa je njezina prisutnost u vodi i hrani pokazatelj fekalnog zagađenja. Sirova hrana, te ona koja sadrži nedovoljno toplinski obrađene sastojke često sadrži bakteriju *E. coli*. Neki od serovarova *E. coli* su enteropatogeni, te su uzrokom velikog broja otrovanja hranom. Simptomi oboljenja ne ovise samo o infektivnoj dozi, već prvenstveno o patogenosti soja. Naime, veliki broj sojeva *E. coli* je bezopasan, ali oni koji stvaraju verotoksine (verocitotoksin producirajuće *E. coli*; verotoksigeni sojevi *E. coli*; VTEC sojevi) uzrokuju ozbiljna oboljenja. VTEC sojevi su identificirani kao ljudski patogeni i uzročnici alimentarnih infekcija, a najčešći izdvojeni serovar je O157:H7.

Otrovanja bakterijom su povezana s konzumacijom mesa i mlijeka, ali i voća, povrća, te s pitkom i bazenskom vodom, što se dovodi u korelaciju s fekalnom kontaminacijom tla. Tome je razlog izrazito mala infektivna doza, čak jedan mikroorganizam, pa umnažanje bakterije u hrani ili vodi nije ni potrebno.

Školjkaši su kao hrana vrlo specifični, prije svega zbog biologije samog organizma, a potom načina njihovog konzumiranja. Naime, školjkaši se hrane filtriranjem okolne vode ili mora, te nakupljaju tvari iz okoline u svom organizmu. Ako je more u kojem one obitavaju zagađeno fekalijama i sadrži *E. coli*, bakteriju ćemo naći i u školjkašima. Zato je u Hrvatskoj kao i u većini zemalja, propisana obavezna pretraga školjkaša na *E. coli* kao indikatora mogućeg fekalnog zagađenja. Ovisno o fluktuacijama mora, godišnjem dobu, klimatskim prilikama, te brojnosti populacije ljudi i životinja u područjima izlova, količina *E. coli* u školjkašima varira. S obzirom na običaje konzumiranja sirovih ili tek obarenih školjkaša, simptomi otrovanja nakon konzumacije nisu neuobičajena pojava. Kako je fekalno zagađenja mora u pozitivnoj korelaciji s nalazom *E. coli*, zbog više putova širenja, moguć je nalaz VTEC sojeva i serovara O157:H7 i u školjkašima.

Propisana metoda ISO/TS 16649–3:2005 za detekciju *E. coli* u školjkašima iz 2005. godine (ISO; International Organization for Standardization) se osniva na činjenici da bakterija *E. coli* kao i ostale fekalne koliformne bakterije koristeći laktozu, u prisustvu žučnih soli, na temperaturi od 44 do 45,5°C raste i stvara kiselinu, a većina sojeva (95 do 97%) je β-glukuronidaza pozitivna, pa se β-glukuronid ugrađen u podlogu koristi kao vidljivi indikator za aktivnost β-glukuronidaze. Međutim, postoje vrlo patogeni sojevi bakterije *E. coli* koji nemaju u potpunosti ove karakteristike, prvenstveno serovar O157. On ne raste ili vrlo slabo

raste na 44°C, uglavnom je sorbitol negativan, te  $\beta$ -galaktozidaza pozitivan, a  $\beta$ -glukuronidaza negativan. Kako je broj kolonija *E. coli* O157 najčešće vrlo mali a bakterija podložna stresu, uobičajeni medij koji sadrži žučne soli može djelovati inhibitorno. Osim serovara O157 još je oko 200 verotoksigenih sojeva *E. coli*, koji ne moraju dijeliti zajednička kulturelna ni biokemijska svojstva, pa to zahtijeva različite postupke za njihovo prepoznavanje. Stoga, standardnom metodom za izolaciju *E. coli* u školjkašima nećemo otkriti sve sojeve bakterije *E. coli*, te među njima možemo propustiti i neke važne patogene sojeve.

Zbog gore navedenih razlika u izolaciji *E. coli* potrebno je primijeniti različite postupke oživljavanja i umnažanja, različite temperature, te tekuće i krute podloge, kao i više postupaka identifikacije (serotipizacija, ELISA- test za detekciju samih verotoksina ili PCR za detekciju *stx* gena - odgovornih za proizvodnju verotoksina).

## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

### 2.1. Taksonomija i svojstva bakterije *E. coli*

Bakteriju *Escherichia coli* (grč. colon – dio debelog crijeva), otkrio je Theodor Escherich 1885. godine, kao uzročnika proljeva u novorođenčadi i nazvao *Bacterium coli commune*, a njemu u čast su je Castellani i Chalmers, 1919. godine nazvali *Escherichia coli*.

Klasifikacija *E. coli* (BERGEY, 2005.):

Porodica: *ENTEROBACTERIACEAE*

Koljeno: *Escherichia*

Vrsta: *E. blatte, E. Hermannii, E. vulneris, E. coli*

*E. coli* je fekalna koliformna bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* (BERGEY, 2005.). Normalni je dio mikroflore potrebne za fiziološki rad crijeva domaćina, ljudi i toplokrvnih životinja (NEILL, 1994.). Kako se uobičajeno pronalazila u ljudskom i životinjskom fecesu, ali ne i u prirodi, 1892. godine Shardingier ju je predložio za indikatora fekalnog zagađenja.

Naziv koliformne bakterije nisu taksonomska klasifikacija već zajednički naziv za Gram negativne nesporigene, fakultativno anaerobne štapičaste bakterije koje koristeći laktozu, u prisutnosti površinski aktivnih tvari ili ekvivalentnih agensa, za 48 sati na temperaturi od 35 °C stvaraju kiselinu i plin. EIJKMAN (1903., cit. FENG i WEAGANT, 2002.) je prvi put definirao fekalne koliformne kao podskupinu koliformnih bakterija koje za razliku od ostalih rastu dobro na temperaturi od 44°C do 45,5°C, a čiji je glavni predstavnik upravo vrsta *E. coli*. Sojevi *E. coli* su u biokemijskim reakcijama indol pozitivni, metil-crveno pozitivni, Vogues–Proskauer negativni, te ne mogu koristiti citrat (MEHLMAN, 1984.). Indol pozitivni sojevi primarno potječu iz crijeva. Za razlikovanje bakterije *E. coli* od ostalih koliforma koristi se i aktivnost β-glukuronidaze - enzima kojeg posjeduje oko 96% sojeva *E. coli* (MANAFI, 1996.), uključujući i one koji ne stvaraju plin (anaerogene). Netipični soj *E. coli* koja nema u potpunosti navedene karakteristike je enterohemoragijski soj koji pripada serovaru O157 koji ne raste ili vrlo slabo raste na 44°C, uglavnom je sorbitol i β-glukuronidaza negativan, te β-galaktozidaza pozitivan (DOYLE i SCHOENI, 1987.; CHAPMAN, 1991.).



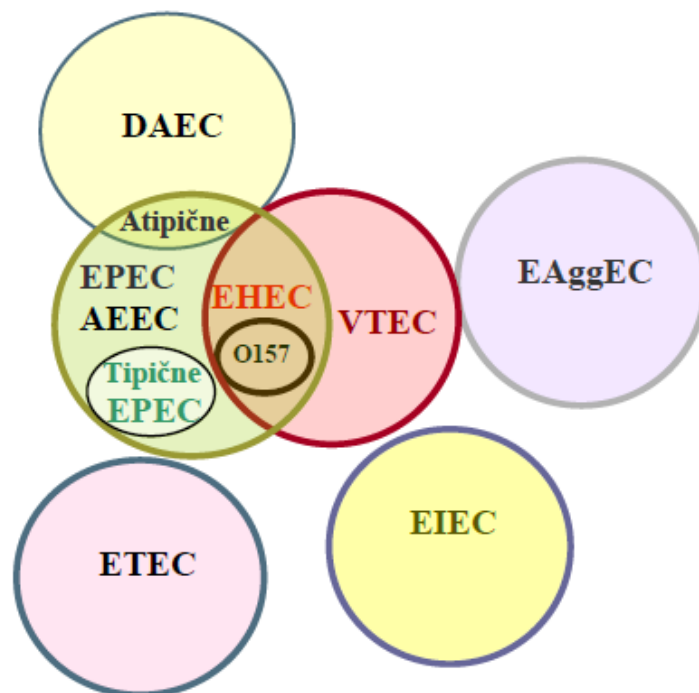
## 2.2. Patovarovi bakterije *E. coli*

Bakterija *E. coli* koja normalno obitava u crijevu je najčešće bezopasna za domaćina iako neki sojevi izazivaju oboljenje (dijareju) u ljudi. Ti se sojevi obično nazivaju dijarogeni (engl. *Diarrheagenic E. coli*) ili samo patogene *E. coli*. Patogenost i infektivnost bakterijske stanice proizlaze iz sposobnosti adherencije na stjenku crijeva, što je povezano s antigenima stanične membrane i sposobnosti proizvodnje toksina *E. coli* (NATARO i KAPER, 1998.) koji uzrokuju crijevna oboljenja. S obzirom na virulentne faktore i mehanizme uz pomoć kojih uzrokuju bolest označavaju se kao intestinalni patovarovi (KAPER i sur., 2004.). Mehanizmi djelovanja u crijevima mogu biti različiti. *E. coli* može invadirati crijevnu sluznicu s umnažanjem u epitelnim stanicama i probojem u laminu propriju, a mogu adherirati na površinu sluznica s posljedičnim smanjivanjem ili nestajanjem mikroresica i poremećajem stanične funkcije. Bakterije izlučuju enterotoksine koji narušavaju metabolizam soli i vode u stanicama bez mijenjanja morfologije stanice, te izlučuju citotoksine (verotoksine) koji izravno smanjuju stanične funkcije oštećujući crijevnu površinu i djelujući sistemski na endotel različitih organa.

Prema kliničkoj slici bolesti i promjenama koje ove bakterije uzrokuju, razlikujemo sedam različitih intestinalnih patovarova:

- enteroinvazivna *E. coli* (EIEC),
- enterotoksigena *E. coli* (ETEC),
- enteropatogena *E. coli* (EPEC),
- enterohemoragijska (EHEC) – verocitotoksigeni sojevi *E. coli* (VTEC),
- enteroagregativna *E. coli* (EaggEC-EAEC),
- difuzno adherentna *E. coli* (DAEC)
- prihvaćajuća (engl. attaching and effacing) *E. coli* (AEEC).

Ovi različiti patovarovi dijarogenih *E. coli* međusobno se preklapaju u posjedovanju virulentnih faktora (slika 1.) pa su sa oboljenjima nastalima konzumacijom hrane ili vode povezane prve četiri skupine. Klinički simptomi, mehanizam i mjesto djelovanja, te najznačajniji serotipovi, prikazani su u tablici 1 (FENG i WEAGANT, 2002.).



Slika 1. Različiti patovarovi *E. coli* prema DONNENBERGU, 2002.

Tablica 1. Klinički simptomi patogenih skupina *E. coli* (FENG i WEAGANT, 2002.)

Pokazatelj /simptom	ETEC	EPEC	EHEC	EIEC
Toksin	LT/ST	-	Shiga - Vero toksin (Stx - VT)	-
Invazivnost	-	-	-	+
Intimin	-	+	+	-
Enterohemolizin	-	-	+	-
Stolica/feces	vodena	vodena, krvava	vodena, veoma krvava	sluzava, krvava
Tjelesna temperatura	niska	+	-	+
Leukociti u fecesu	-	-	-	+
Mjesto djelovanja u crijevima	tanko crijevo	tanko crijevo	debelo crijevo	debelo, donji dio tankog crijeva
Serotipovi	različiti	O26, O111 i drugi	O157:H7, O26, O111 i drugi	različiti
I <sub>D</sub> infektivna doza	visoka	visoka	niska	visoka

Sojevi **ETEC (enterotoksigena *E. coli*)** proizvode egzotoksine (*plasmid-encoded cholera-like*). Toksini su termostabilni (ST) pri kuhanju kroz 30 minuta i termolabilni (LT), te oštećuju epitel. Imaju fimbrijske adhezine pomoću kojih se soj veže na glikoproteinske receptore enterocita epitela sluznice jejunuma i ileuma, te unutar enterocita stimuliraju adenilat ili gvanilat ciklaze što rezultira sekrecijom tekućine i vodenim proljevom (KARMALI, 1989.). Uzročnici su tzv. putničke dijareje s vodenastim proljevom sa ili bez vrućice. Infektivna doza ETEC za odrasle je procijenjena na najmanje  $10^8$  stanica, pa se analiza za ETEC obično ne izvodi, a ako je ETEC otkrivena, treba je izbrojati da se odredi potencijalna opasnosti od onečišćene hrane. Detekcija se uglavnom zasniva na proizvodnji LT i ST ili LT i ST gena (FENG i WEAGANT, 2002.).

**EIEC (enteroinvazivna *E. coli*)** uzrokuje proljeve bez krvi i dizenteriju, slično djelovanju bakterija roda *Shigella*, invazijom, umnažanjem i destrukcijom crijevnog epitela kolona. Invazivnost potječe od nekoliko proteina vanjske membrane. Glavno mjesto djelovanja je kolon gdje izazivaju mehaničko uništavanje, smrt stanica (MENG i sur., 2001.) Potrebno je najmanje  $10^6$  EIEC da uzrokuju bolest u zdravih odraslih osoba. Za razliku od tipičnih sojeva *E. coli*, EIEC su nepokretne, ne iskorištavaju lizin i ne fermentiraju laktozu, tako da su anaerogene. Otkrivaju se testovima za invazivnost ili dokazom gena za invaziju (FENG i WEAGANT, 2002.).

**EPEC (enteropatogena *E. coli*)** uzrokuje obilan vodenast proljev što je glavni uzrok infantilnog proljeva u zemljama u razvoju. Prepoznat je kao patogen čiji mehanizam djelovanja ne uključuje enterotoksine, a nakon prianjanja na sluznicu tankog crijeva uništavaju mikrovile. Uzrokuju proljev u svih vrsta životinja i čovjeka, a čovjek je glavni rezervoar bakterije (MENG i sur., 2001.). Epidemije s EPEC su povezane s potrošnjom zagađene vode za piće, kao i nekih mesnih preradevina. Infektivna doza EPEC u zdravih odraslih osoba je  $10^6$  bakterija (FENG i WEAGANT, 2002.). Patogeneza EPEC uključuje protein intimin, kodiran *eae* genom koji uzrokuje vezivanje i lezije enterocita (engl. attachment and effacing lesions – A/E) (HICKS i sur., 1998.) uz uključivanje EAF proteina (engl. EPEC adherence factor) koji omogućava lokalizirano prianjanje bakterija na crijevne stanice (TOBE i sur., 1999.). Postoji nekoliko varijanti *eae* gena i neki EPEC sojevi nose *eae* varijante identične VTEC sojevima pa će pretrage za otkrivanje ovih gena prepoznati patogene sojeve iz obje skupine. Samo nedostatak Shiga toksin (Stx) proizvodnje razlikuje EPEC sojeve od EHEC.

**EHEC-VTEC (enterohemoragična-verocitotoksigena *E. coli*)** ima osobine enteropatogenih sojeva, ali uz to još tvori verotoksine. EHEC su zapravo manja skupina verotoksigenih *E. coli* koja je tako nazvana, prvenstveno zbog hemoragičnog kolitisa (engl. hemorrhagic colitis – HC) odnosno krvavog proljeva koji uzrokuju ovi sojevi. Patogeneza je uvjetovana tvorbom toksina koji oštećuje mikrovile i endotel lokalno i sistemski, jer imaju poseban afinitet za endotelene stanice, posebice u bubregu i mozgu, pa su odgovorni za kliničku sliku hemoragičnog kolitisa i hemoragičnog uremičnog sindroma. Od kada su VTEC sojevi otkriveni kao ljudski patogeni, mnoga istraživanja su potvrdila da su upravo ovi sojevi uzrok alimentarnih infekcija, te da uvjetuju kliničku sliku bolesti od dijareje do hemoragičnog kolitisa (RILEY i sur., 1983.) koji može napredovati do potencijalno fatalnog hemolitičkog uremičkog sindroma - HUS (KARMALI i sur., 1983.) ili u trombotičku-trombocitopeničnu purpuru -TTP (NEILD, 1994.).

VTEC sojeve koji proizvode citotoksin na Vero stanicama (verocitotoksin, verotoksin) opisali su 1977. godine KONOWALCHUK i sur., a uvriježen je naziv verotoksigena *Escherichia coli* –VTEC. Također se koristi i naziv „*Shiga-like toksin producing E. coli* (SLTEC)“ tj. „*Shiga toksin producing E. coli* (STEC)“ jer je citotoksin vrlo blizak shiga toksinu kojeg proizvodi *Shigella dysenteriae* tip 1, a verocitotoksin se naziva i Shiga toksin (Stx) (O'BRIEN i sur., 1982.). Brojni serovarovi *E. coli* mogu producirati verocitotoksine, te je više od 200 serotipova VTEC izolirano iz ljudi (MENG i sur., 2001.). Sinonim za VTEC je i enterohemoragična *E. coli* (EHEC), ali su to samo one vrste koje su klinički povezane s hemoragičnim kolitisom.

Prototip EHEC je *E. coli* O157:H7 koja je širom svijeta povezana s bolestima koje uzrokuje u ljudi (LEVINE i sur., 1987., cit. KARMALI, 1989.; NATARO i KAPER, 1998.; GRIFFIN i TAUXE, 1991.; ANON., 1993.), a fenotipski se razlikuje od ostalih *E. coli* jer ne raste ili vrlo slabo raste na 44°C, te je uglavnom sorbitol i β-glukuronidaza negativna (DOYLE i SCHOENI, 1987.; CHAPMAN, 1991.). Uobičajena infektivna doza je 1 - 100 stanica (PATON i PATON, 1998.b) ali osim za serotipove *E. coli* O157:H7 i iznimno O111:H2, nema dostatno informacija.

Otkriveno je više toksina unutar Shiga toksin obitelji, pa različiti sojevi VTEC proizvode samo anti-Stx neutralizirajući toksin, Stx 1 ili pak non-neutralizirajući toksin, Stx 2, a neki oba (PATON i PATON, 1998.a). Dijagnostika VTEC sojeva se upravo temelji na tvorbi ili sposobnosti tvorbe Stx1 i Stx2. Jedan od starijih postupaka dokazivanja je ispitivanje citotoksičnog učinka na vero ili HeLa staničnim kulturama, pa ELISA (engl. Enzyme-Linked

ImmunoSorbent Assays) ili RPLA testovi (engl. Reverse Passive Latex Agglutination), te novije Gene-probes tehnika hibridizacije nukleinske kiseline i PCR (engl. Polymerase Chain Reaction) test, kojima se osim gena *stx1* i *stx2* koji kodiraju verotoksine mogu utvrditi i drugi virulentni markeri VTEC sojeva (FENG i MONDAY, 2000.). Jedan od često korištenih dodatnih markera virulencije za koji se smatra da utječe na patogenezu VTEC je intimin, tj. *eae* gen koji ga kodira, a odgovoran za prihvaćanje bakterije na epitelijalne stanice. Međutim intimin je također i virulentni faktor različitih EPEC sojeva, pa se od VTEC sojeva razlikuju upravo po odsutnosti *stx* gena.

### **2.3. Epidemiologija i VTEC serotipovi**

#### **Serotipovi**

Patovarovi *E. coli* se ne mogu razlučiti jednostavnim biokemijskim i fiziološkim testovima, pa je jedan od načina, serotipizacija. Tipovi bakterije *E. coli* se u laboratorijima razvrstavaju po strukturi O i H antigena, u više od 170 O serogrupa koje se dalje dijele po H antigenima na serotipove (ANON., 2004.a). Serotipizacija *E. coli* se temelji na O antigenima - polisaharidima stanične stijenke i H-antigenima - flagelarnim proteinima. SCHEUTZ i sur. (2004.) su utvrdili 174 O antigena (označeni brojkama od 1-181; neki antigeni su kasnije izbačeni) i 53 H antigena. Postoje i nepokretne varijante *E. coli* koji su nastali kao mutanti određenog serotipa s H antigenom ili kao potpuno zaseban serotip, a postoje i mnogi izolati koji imaju pojedinačne ili oba O i H antigena, ali koji nisu u internacionalnoj shemi, te se ne mogu serotipizirati. Više verotoksigenih serotipova *E. coli* je povezano s otrovanjima hranom, a prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (World Health Organization; WHO) najznačajniji za ljudsko zdravlje su serotipovi O157, O145, O111, O26 i O103 (ANON., 1999.d). Jedan od najčešćih trovača hranom je verotoksigeni VTEC *E. coli* O157 (ANON., 1995.a). RILEY i sur. (1983.) su dokazali da je uzročnik hemoragičnog gastroenteritisa bio do tada rijedak serotip *E. coli* O157:H7. Taj serotip je najčešće izoliran kod otrovanja hranom u Velikoj Britaniji, SAD i drugim razvijenim zemljama (NATARO i KAPER, 1998.), te je *E. coli* O157:H7 predominantni VTEC serotip povezan s HC epidemijama i teškim oboljenjima ljudi u mnogim zemljama (KARMALI i sur., 2003.). Uobičajena je podjela VTEC serotipova zbog važnosti serotipa *E. coli* O157:H7 u oboljenjima ljudi, na skupinu O157 i skupinu ostalih VTEC, koja se uobičajeno naziva non-O157 (GYLES, 2007.).

Kasnije postaje sve očiglednije da su i drugi serotipovi VTEC razlogom otrovanja ljudi hranom (PONTELLO i sur., 2003.). Tako je u istraživanjima u Španjolskoj od 1995. - 2003. godine u mljevenoj govedini utvrđeno 1% VTEC O157:H7 i non-O157 VTEC u 11% uzoraka od kojih je 68% serotipova potvrđeno i u ljudima: O5:H-, O8:H21, O22:H8, O26:H11, O26:H- O76:H7, O91:H-, O103:H2, O103:H-, O111:H-, O112:H2, O113:H21, O118:H16, O145:H-, O157:H7, O174:H21, O174:H-, ONT:H4 i ONT:H-. Šest epidemija bilo je uzrokovano sa VTEC O157:H7, jedna sa O26:H11 i jedna sa O111:H- serotipom (MORA i sur., 2007.).

Karakterizacijom 219 pozitivnih VTEC izolata iz hrane u Njemačkoj, BEUTIN i sur. (2007.) su utvrdili da samo 1,8% VTEC pripada tipičnim EHEC serotipovima: O26:[H11], O103:H2 i O157:[H7], dok 44,0% serotipova koji nose *stx* gene pripada atipičnim EHEC (O8:H19, O22:[H8], O91:H21, O113:H21, O174:H2, O174:H21, O178:H19, i O179:H8). WERBER i sur. (2008.) navode non-O157 serotipove koji su utvrđeni u fecesu pacijenata, a također su identificirani i u hrani, i to: O2, O4, O6, O15, O22, O23, O30, O38, O40, O55, O74, O84, O87, O88, O101, O102, O104, O110, O112, O119, O120, O121, O136, O148, O163, O171, O178, O179. MANNA i sur. (2010.) su izolirali *E. coli* iz 40% uzoraka sirovog mesa, mlijeka, škampa i govedeg fecesa te potvrdili PCR postupkom kao VTEC, a pripadali su sojevima O5, O8, O20, O28, O48, O60, O78, O82, O84, O101, O110, O123, O132, O156, O157, O-rough i OUT.

U Americi su između 1990. i 2007. bile prijavljene 23 epidemije uzrokovane s verotoksigenom *E. coli* non-O157 (XIA i sur., 2010.). Serotip *E. coli* O157:H7 je bio uzroko oko 73 000 slučajeva bolesti, dok su non-O157:H7 serotipovi uzrokovali oko 37 000 slučajeva godišnje. Pri tome je zabilježeno čak 90 smrtnih ishoda uzrokovanih s VTEC (MEAD i sur., 1999.). Odnos broja potvrđenih slučajeva oboljenja na 100 000 stanovnika uzrokovanih sojevima O157:H7 u odnosu na non-O157 sojeve iznosio je 1,20 1990. godine a 0,57 u 2007. godini (ANON., 2008.B). Taj je odnos u 2009. godini bio 0,99 za VTEC O157 dok je non-O157 VTEC imao isti trend kao i prethodne godine (ANON., 2010.g). Epidemije izazvane non-O157 VTEC u SAD u periodu od 1990. do 2006. godine izazvane su serotipovima O26, O45, O51, O103, O104, O111, i O121 (EBLEN, 2008.). Jedan od posljednjih slučajeva epidemije sa non-O157 VTEC je bio uzrokovan serotipom O145 (utvrđenim u rimskoj salati). U svakom slučaju, danas se smatra da je jednak broj slučajeva oboljenja ljudi uzrokovan sa non-O157 VTEC kao i sa O157, ali mnogi laboratoriji još uvijek

ne identificiraju ove serotipove (ANON., 2010.a). Primjeri u drugim zemljama također ukazuju na jasan rast broja bolesti uzrokovanih s non-O157 VTEC.

U Meksiku je od ukupno identificiranih sojeva VTEC čak 64% pripadalo serotipu non-O157, većinom serotipovima O26, O111, i O103 (LATHROP i sur., 2009.). U Australiji su obrađeni podaci od 2003. - 2007. godine pokazali da su dvije trećine slučajeva bolesti uzrokovane non-O157 VTEC serotipovima i to redom po brojnosti O111, O26, O103, OR:H-, O113, O172. Simptomi HC su bili češći kod soja O157, dok je samo jedan pacijent obolio od HUS-a za razliku od 7 pacijenata inficiranih sa non-O157 koji su razvili i HUS (McPHERSON i sur., 2009.). Također je pretragom 102 izolata VTEC O157 iz ljudi, životinja i mesa, za razliku od ostalih zemalja utvrđeno da je 78% ovih izolata nepokretno O157:NM (FEGAN i DESMARCHELIER, 2002.). U Kanadi, GILL i GILL (2010.), također navode da su VTEC različite od *E. coli* O157:H7 značajan izvor ozbiljnih bolesti ljudi s raspodjelom serotipova kao i u SAD, u 50% slučajeva (PERELLE i sur., 2004.).

Danas u Europi većina zemalja članica EU sudjeluje u istraživanju VTEC infekcija kod ljudi, te su utvrđene razlike, kako u zemljopisnoj raširenosti tako i po VTEC serotipovima. Sažeti podaci do 2005. godine ukazuju da je više od 95% infekcija u Škotskoj, Engleskoj i Velsu bilo uzrokovano s *E. coli* O157, dok je u Irskoj 86% pripisano non-O157 serotipovima. U kontinentalnoj Europi, brojčano više od pola infekcija je uzrokovano serotipovima non-O157 uz nacionalne razlike. Tako je u Belgiji, Francuskoj, Finskoj, Mađarskoj, Nizozemskoj, Švedskoj i Španjolskoj najčešće detektiran serotip O157, a ostali VTEC serotipovi su potvrđeni u slučajevima oboljenja u Danskoj, Njemačkoj, Italiji, Norveškoj i Luksemburgu, sporadično i u manjim epidemijama (ANON., 2007.a). U Norveškoj je na primjer *E. coli* O157 bila zastupljena samo u 20% VTEC izolata (VAN DUYNHOVEN, 2008.). Ukupno, broj VTEC slučajeva je od 2000. - 2005. godine porastao za 31,6% s najviše slučajeva u Švedskoj (4,09 na 100 000 stanovnika). Prema dostupnim izvještajima za 2008. godinu (ANON. 2010.e; 2010.d) broj zabilježenih VTEC slučajeva je od 2007. godine porastao za 8,7% (tablica 2) sa 0,66 slučajeva na 100 000 stanovnika, a taj trend se nastavio i u 2009. godini (ANON. 2011.a). Kao i prijašnjih godina, najveći broj bolesti uzrokovanih s VTEC bio je u populaciji djece od 0–4 godine (4,72 na 100 000), a što se tiče sezonskog utjecaja najveći broj prijavljenih bolesti je zabilježen u kasno ljeto (2010.d; ANON. 2010.e). Najveći broj potvrđenih slučajeva bio je u UK i Njemačkoj (64,6%), a najveći broj u odnosu na broj stanovnika u Irskoj (4,8) i Švedskoj (3,3). Ukupno je u EU 53% slučajeva uzrokovano VTEC serotipom O157 od toga 78% samo na UK i Irskoj. 25,9%

VTEC je neserotipizirano (tablica 2). Treba napomenuti da još uvijek metode za detekciju non-O157 VTEC nisu uključene u rutinske pretrage kao za *E. coli* O157 što u stvarnosti može mijenjati navedene brojeve.

**Tablica 2.** Deset najučestalijih serotipova VTEC potvrđenih u EU 2007./2008. godine (ANON., 2010.e)

Serogrupa	Broj slučajeva			
	Godina, n		Godina, %	
	2007	2008	2007	2008
O157	1571	1,673	54,1	53
NT*	842	819	29	25,9
O26	136	166	4,7	5,3
O103	77	88	2,7	2,8
O91	43	50	1,5	1,6
O145	31	49	1,1	1,6
O111	23	43	0,8	1,4
O128	21	28	0,7	0,9
O113	16	-	0,6	-
O146	14	25	0,5	0,8
O117	-	20	-	0,6
ostali	130	198	4,5	6,3
<b>Ukupno</b>	<b>2904</b>	<b>3159</b>		

\*netipizirani

BOLTON i sur. (2009.) pišu da su najčešće izolirane serogrupe u Europi bile O26, O103, O91, O145, O121 i O111, koje su zabilježene i u ostatku svijeta. Različiti serotipovi su povezani s oboljenjem različite jačine u ljudi, te sporadičnim slučajevima ili epidemijama, pa su KARMALI i sur. (2003.) predložili klasifikaciju VTEC u 5 seropatotipova od A to E što može biti korisno za istraživanje onih svojstava bakterija koja dovode do bolesti. Serotipovi su raspoređeni od najvirulentnijih u seropatotip A, do onih koji nisu bili povezani sa izazivanjem bolesti u ljudi u seropatotip E. Kako je seropatotip A u stvari serotip O157 (tablica 3.), pa je tako i u 26 zemalja Europe 2005. godine učestalost serotipa O157 bila visoka i iznosila 63,3% slučajaja (ANON., 2007.b).

Ipak slučajevi bolesti ljudi uzrokovani s non-O157 su od 2000. - 2005. godine porasli za 60,5%, a O157 samo za 13%, te je između pet najzastupljenijih non-O157 serotipova koji su uzrokovali bolest 80% pripadalo seropatotipu B, a 20% seropatotipu C. Nijedan serotip nije pripadao grupi D ili E (COMBES i sur., 2008.).

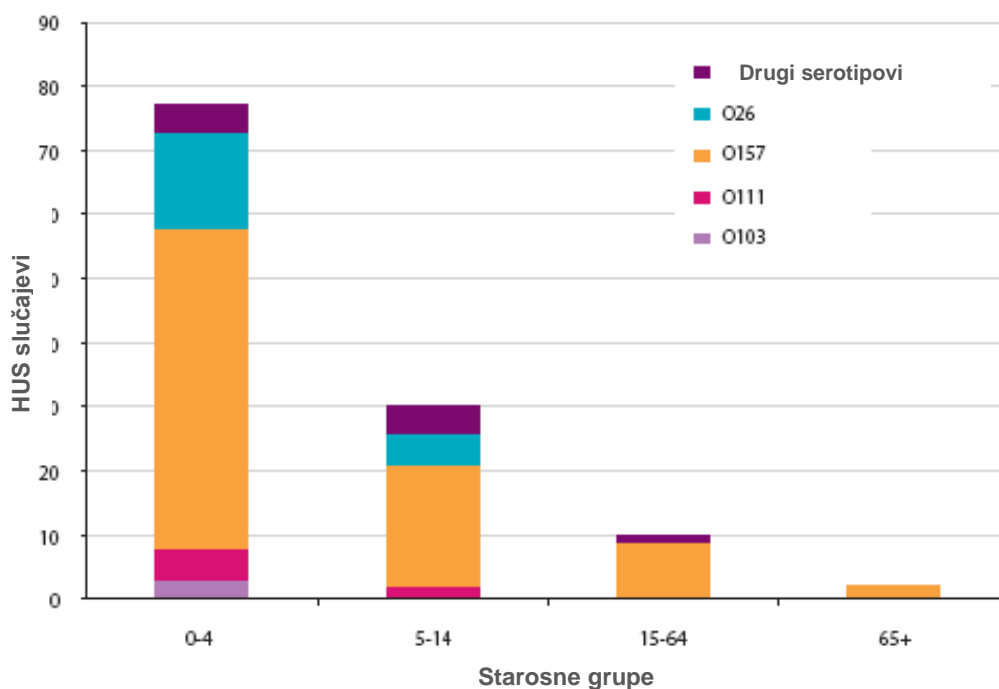


**Tablica 3.** VTEC seropatotipovi ovisno o stupnjevima jačine oboljenja i sposobnosti izazivanja epidemije (GYLES, 2007.)

Seropatotip	Serotip		Učestalost povezanosti s bolešću	Povezanost s epidemijama	HUS/HC
<b>A</b>	O157:H7, O157:NM		visoka	uobičajeno	+
<b>B</b>	O26:H11, O111:NM, O145:NM	O103:H2, O121:H19	umjerena	neuobičajeno	+
<b>C</b>	O5:NM, O104:H21, O121:NM	O91:H21, O113:H21, O165:H25 itd	niska	rijetko	+
<b>D</b>	O7:H4, O103:H25, O117:H7, O132:NM, O171:H2, O174:H8	O69:H11, O113:H4, O119:H25, O146:H21, O172:NM, itd	niska	rijetko	-
<b>E</b>	O6:H34, O39:H49, O76:H7, O88:H25, O113:NM, O143:H31, O163:NM	O8:H19, O46:H38, O84:NM, O98:H25, O136:NM, O156:NM, itd	nije dokazana	nije dokazana	-

U Sloveniji su opisani slučajevi HUS-a uzrokovanog tada rijetkim serotipom O145 s fatalnim ishodom (KRAIGHER i sur., 2005.), a TRKOV i sur. (2008.) su utvrdili VTEC gene i verotoksine u tri od 42 sakupljena izolata pri čemu je jedan serotip bio O157, a dva O26.

U Njemačkoj su MELLMANN i sur. (2008.) utvrdili da u pacijenata oboljelih od HUS-a, 67,7% uzročnika pripada serotipu O157:H7/H<sup>-</sup>, a preostalih 32,3%, se sastoji od 34 non-O157 serotipova od kojih dominiraju O26:H11/H (42,6%), O145:H28/H (18,9%), O111:H8/H (8,3%) i O103:H2/H (8,3%). Broj slučajeva HUS-a u Europi je porastao za 42% od 2007. godine, od kojih je s VTEC O157 bolest uzrokovana u 56% slučajeva i to s najvećim brojem među najmlađom populacijom (grafikon 1). Većina slučajeva je zabilježena u Francuskoj (43), Njemačkoj (41), Italiji (23) i u UK (23) i bila je uglavnom povezana s konzumacijom proizvoda od sirove govedine ili mlijeka (ANON., 2010.e).



**Grafikon 1.** Broj slučajeva HUS-a prikazan prema serogrupama uzročnika i dobi pacijenata za 2008. godinu, (ANON., 2010.e)

Nedavno, 2011. godine u Njemačkoj je izbila dotada najveća epidemija u Europi, sa najvećim brojem oboljelih, čak 3842 osobe, te 855 oboljelih od HUS-a od kojih je bilo 35 smrtnih slučajeva kao i 18 slučajeva među pacijentima sa simptomima EHEC gastroenteritisa (ANON., 2011.b). Iznenađujuće, epidemiju je uzrokovao serotip inače niske učestalosti sa izazivanjem bolesti i rijetke povezanosti sa epidemijama, *E. coli* O104:H4, ali s neobičnom kombinacijom patogenih obilježja koja je dala vrlo visok stupanj patogenosti (SCHEUTZ i sur., 2011.).

### Izvori infekcije i širenje u okolišu

Kao glavni izvor VTEC u mnogim zemljama navodi se izmet goveda, jer su preživači prirodni rezervoari pa se bakterija nalazi u crijevima kao normalni stanovnik, a utvrđena je i u ovaca i koza. Otrovanja su stoga najčešće povezana s nedovoljno toplinski obrađenim proizvodima dobivenima od ovih životinja (ANON., 1995.a).

Prema izvještajima EFSA-e (European Food Safety Authority) iz 2008. godine (ANON., 2010.e) u Europskim su zemljama VTEC izolirane u uzorcima fecesa goveda u 0 do 30% slučajeva, a sojevi *E. coli* O157 su zastupljeni do 7,2%. Pri istraživanjima prevalencije VTEC u ovaca u Austriji je utvrđeno 26,3% VTEC pozitivnih uzoraka fecesa, a u Njemačkoj

23,6% VTEC O157. HUSSEIN i BOLLINGER (2005.) sažimaju podatke iz cijeloga svijeta za posljednja tri desetljeća, te je prevalencija O157:H7 VTEC u uzorcima fecesa goveda iznosila od 0,2% to 27,8%, a za non-O157 VTEC od 2,1% do čak 70,1% kod uzoraka uzetih na klaonicama (HUSSEIN, 2007.). U Brazilu je na jednoj farmi prevalencija za bila VTEC 10%, za EPEC 2,7%, a izolirani serotipovi VTEC su O7:H10, O22:H16, O111:H<sup>-</sup>, O119:H<sup>-</sup> i O174:H21, te za EPEC, O26:H11, O123:H11 i O177:H11. Niti jedan serotip VTEC O157:H7 nije izoliran (AIDAR-UGRINOVICH i sur., 2007.) Preživači koji nose VTEC nemaju kliničke simptome, te 11,1% do 32,3% zdravih goveda u Sjevernoj Njemačkoj širi ove patogene u okolinu.

Izolirani serotipovi (O8:H19, O8:H21, O22:H8, O113:H21 i Orough:NM) nađeni su i kod ljudi sa simptomima HUS-a i TTP (MENRATH i sur, 2010.). U Švedskoj je utvrđeno do 1,9% VTEC O157 pozitivnih uzoraka uz potvrđen direktni ili indirektni prijenos ovih visokopatogenih sojeva na ljude pri posjetu govedarskim farmama (ASPAN i ERIKSSON, 2010.). BARKOCY-GALLAGHER i sur. (2003.) u podacima za tri američke države dokazuju jednostavni prijenos VTEC s goveđe kože na trupove uz prevalenciju VTEC O157:H7 u obriscima kože i trupova prije evisceracije od 60,6% i 26,7%. Prevalencija VTEC non-O157 je znatno viša, 92,0% na koži i 96,6% na trupu. Široki raspon prevalencija nije samo rezultat klime, ekologije, držanja na farmama, nego i razlike u metodama uzorkovanja i pretrage, ipak jasno je da su goveda konstantni nositelji VTEC non-O157 (GILL i GILL, 2010.).

Ostale životinjske vrste također mogu biti asimptomatski nosioci VTEC, svinje, kućni ljubimci, guske, galebovi, kao i životinje u zoološkim vrtovima (GYLES 2007.). U Njemačkoj je 2008. godine utvrđen nalaz od 0,3% VTEC pozitivnih mačaka (ANON., 2010.e).

Za razliku od ostalih životinja, od VTEC često obolijeva prasid sa simptomima edema po čemu je bolest i dobila ime, ali ovi serotipovi nisu povezani s oboljenjem u ljudi (PATON i PATON, 1998.b).

Putovi širenja VTEC su brojni, jer se iz crijeva zdravih životinja fecesom obilno i lako šire u zemlju i vodu područja gdje te životinje obitavaju, za razliku od drugih intestinalnih patogrupa *E. coli* gdje je glavni izvor feces drugih inficiranih ljudi.

Direktni putovi širenja kojima se ljudi inficiraju su izravan kontakt sa životinjama ili njihovim okolišem, najčešće vodom kontaminiranom fecesom ili pri gnojidbi usjeva (ANON., 2010.f). U Velikoj Britaniji 2004. godine VTEC infekcije u ljudi su bile najčešće u ruralnim područjima i to preko sirovog povrća ili manipulacije s mesom peradi nakon klanja (ANON.,

2004.a), a put širenja infekcije može biti povezan s vodom i vlastitim vodoopskrbnim sustavima (O'SULLIVAN i sur., 2008.). Inače, perad i svinje se ne smatraju izvorom VTEC, već se radi o slučajnom izlaganju patogenima porijeklom od preživača.

Svake godine se povećava broj neuobičajenih načina prijenosa EHEC, kao npr. kontakt sa životinjama tijekom posjeta farmama, a raspon mogućnosti prenošenja infekcije preko okoliša je širok (CAPRIOLI i sur., 2005.).

VTEC sojevi mogu preživjeti više od 9 mjeseci na površinama zagađenim fekalijama i u vodi više od 38 tjedana. Za serotip *E. coli* O157 je dokazano da može preživjeti u tlu, otpadnim vodama ali i pitkoj vodi više od šest mjeseci te do jedne godine dana u neaeriranom ovčjem gnoju. Sve to ukazuje na mogućnost širenja bakterije na velike udaljenost u okolišu, bilo svježom vodom, bilo prodiranjem otpadnih voda u tlo, pogotovo pri obilnim kišama (KUDVA i sur., 1998.; FENLON i sur., 2000.; ANON., 2004.a). GARCIA-ALJARO i sur. (2005.) su izolirali čak 144 VTEC sojeva iz gradske kanalizacije i otpadne vode animalnog porijekla.

KHANDAGHI i sur. (2010.) su dokazali prijenos *E. coli* O157:H7 nakon gnojenja u zemlju pa u povrće. Najveća epidemija sa VTEC u kojoj je oboljelo 10 000 ljudi, većinom djece, uzrokovana je kontaminiranim povrćem tj. klicama bijele rotkve (MICHINO i sur., 1999.), a dokazana su i otrovanja toplinski neobrađenim sokom proizvedenim od jabuka sakupljenih sa zemlje (BESSER i sur., 1993.).

Povrćem odnosno klicama sjemenja uzrokovana je posljednja i najveća epidemija u Europi sa više od 3800 oboljelih ljudi (ANON., 2011.b). Brojna su i otrovanja izazvana pitkom nedezinficiranom vodom, bazenskom i jezerskom vodom (SWERDLOW i sur., 1992.; GYLES, 2007.; ANON., 2010.c).

Posredni načini širenja verotoksigenih sojeva *E. coli* je ulaz u prehrambeni lanac ljudi. U njega ove bakterije ulaze na više načina, najčešće direktnom fekalnom kontaminacijom sirovog mesa pri evisceraciji ili deranju kože/runa s trupova životinja, nešto rjeđe naknadnom fekalnom kontaminacijom mesa preko opreme i okoliša klaonice, te naposljetku kontaminacijom sirovog mlijeka na farmama (ANON., 2010.f).

Istraživanja su pokazala da pri rukovanju sirovim mesom bakterija *E. coli* O157 preživljava na izloženim površinama (noževi i pregače radnika u klaonicama) najmanje 48 sati (GUN i sur., 2001.).

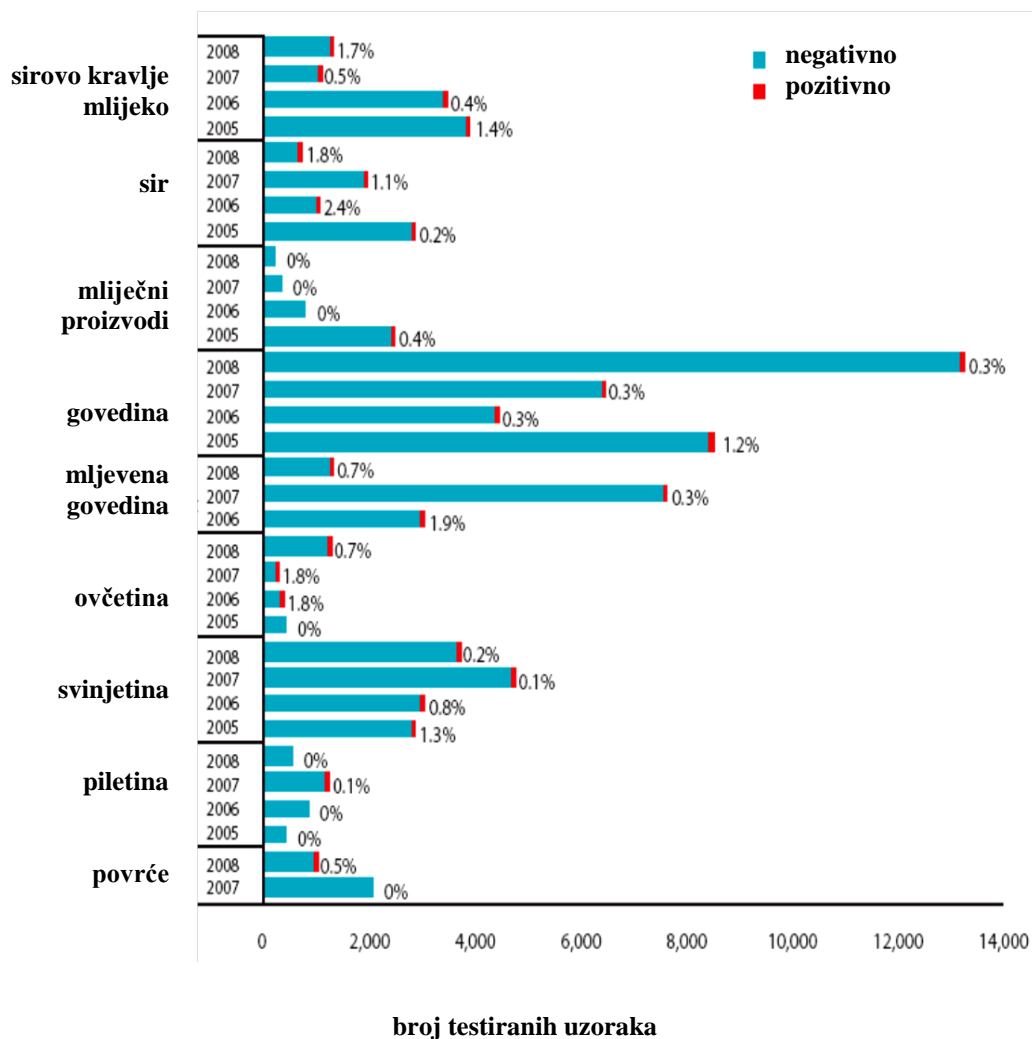
Najučestalije infekcije i epidemije verotoksigenom *E. coli* uzrokovane su onečišćenim obrocima od sirove ili nedovoljno toplinski obrađene mljevene govedine (DOYLE i SCHOENI, 1987.; GRIFFIN i TAUXE, 1991.; ANON., 1993.; BEUTIN, 1999.; BARKOCY-GALLAGHER i sur., 2003.; WILLSHAW i sur., 1994.; KUMAR i sur. 2001.; PONTELLO i sur., 2003.; SAMADPOUR i sur., 2006., SHIPMAN i sur., 2009.; HART i SMITH, 2009.) jer se patogen usitnjavanjem ravnomjerno raširi po cijeloj količini priređenog mesa ili mesnih pripravka iste proizvodne serije.

U Kanadi je pretraživanjem više vrsta mesa prevalencija non-O157 VTEC bila 36,4% i 10,6% u govedini i svinjetini, dok je izolacija VTEC O157:H7 u govedini bila 10,4% odnosno 3,8% u svinjetini. Nijedna VTEC nije izolirana iz piletine (READ, 1990.) Naprotiv LEE i sur. (2009.) utvrđuju i prevalenciju EHEC (VTEC) u piletini od 7,3% i 2% u svinjetini.

U Europi po pojedinačnim izvještajima EU zemalja iz 2008. godine do 5,8% uzoraka govedine je VTEC pozitivno, pri čemu je 1,2% potvrđeno kao VTEC O157, dok su te brojke kod ovčetine i veće (ANON., 2010.e).

Jedan od izvora infekcije može biti i divljač. U Argentini, 5% do 38,5% uzoraka fecesa divljih preživača nosi non-O157 VTEC. U Njemačkoj je utvrđeno do 14,8% izolata VTEC u divljači, a od ukupno 140 izolata VTEC 57,1% pripada serotipovima O26, O91, O103, O113, O128 i O146 povezanima sa bolestima u ljudi, što dokazuje da su jeleni, zečevi i divlje svinje prepoznati kao moguća opasnost za ljudsko zdravlje (Miko i sur., 2009.)

Osim mesa, mlijeko i mliječni proizvodi su značajan izvor infekcija ljudi (LIGHTON i sur., 2000.; ESPIE i sur., 2006.). U Europi je 2008. godine bilo zabilježeno značajno povećanje broja pozitivnih VTEC uzoraka u sirovom kravljem mlijeku u odnosu na 2007. godinu (ANON., 2010.e). PRADEL i sur. (2000.) su utvrdili u Francuskoj 10% uzoraka sira pozitivnih na *stx* gene, a REY i sur. (2006.) u Španjolskoj 10,8% uzoraka mlijeka i 5% uzoraka sira. Grupe namirnica koje su povezane s oboljenjima od VTEC u Europi, u periodu od 2005. do 2008. godine prikazane su u grafikonu 2 (ANON., 2010.e).



**Grafikon 2.** Udio hrane u ukupno pretraženim uzorcima koji su povezani s oboljenjima od VTEC od 2005. - 2008. (prema ANON., 2010.e)

Česta su trovanja i raznim drugim vrstama namirnica jer je verotoksigena *E. coli* acido-tolerantna, visoki tlak ne inhibira sintezu verocitotoksina (ANON., 1999.), a infektivna doza je veoma mala. Ona iznosi manje od 100 VTEC stanica (WILLSHAW i sur., 1994.), a ponekad samo 1-10 mikroorganizama (PATON i sur., 1996.) pa umnažanje u hrani i vodi nije potrebno. Stoga su učestalo, izvor infekcije namirnice spremne ili pripremljene za jelo („ready-to-eat“) kao što su kobasice, sir, jabučni kiseli napitak, razne vrste pripremljenog povrća kao rimska salata, umak od dinje, alfalfa klice, klice rotkvice, te hladne mesne salate (ANON., 1996.; COMO-SEBETTI i sur., 1997.; GYLES, 2007.; WEBSTER i sur., 2007.; ERICKSON i DOYLE, 2007.; FRIESEMA i sur., 2008.). Neke od namirnica, poput povrća, salata, sokova, hladnih sendviča ili čak lubenica, bile su izvor epidemija kao posljedica križne kontaminacije s onečišćenim mesom (ANON., 2010.f; KARMALI, 1989.; PAVIĆ i

CETINIĆ, 2000.). Veće epidemije zabilježene u više država SAD izazvale su sljedeće namirnice: svježi špinat, goveđi hamburgeri, paprike na smrznutoj pizzi, mljevena govedina, sirovo tijesto za kolače, mljevena i porcionirana govedina, goveđi odresci iz restorana, rimska salata i sir gauda. Svi serotipovi su pripadali *E. coli* O157:H7, osim iz rimske salate gdje je utvrđen serotip *E. coli* O145 (ANON., 2010.b).

U Europi od 2005. - 2008. godine najveći broj namirnica koje su povezane s oboljenjima uzrokovanim s VTEC u ukupno pretraženim uzorcima hrane, osim goveđeg mesa su sir i sirovo kravlje mlijeko, ovčatina, te svinjsko meso (ANON., 2010.e)

### **Školjkaši i verotoksigene *E. coli***

Bakterija *E. coli* je indikator organizam jer je pokazatelj moguće fekalne kontaminacije i prisutnosti patogenih enterobakterija, a školjkaši su često povezani s visokim rizikom od kontaminacije s fekalnim bakterijama. Kod monitoringa školjkaša i mora određuje se količina bakterije *E. coli* u svrhu smanjenja rizika od izlova školjkaša iz okoliša moguće zagađenog fekalijama (PIERSON i SMOOT, 2001.).

Prisutnost verotoksigene *E. coli* u školjkašima je uvjetovana fiziologijom školjkaša. Većina školjkaša hrani se suspendiranim fitoplanktonom preko para specijaliziranih škruga koje guraju velike količine vode cilijarnim pokretima, a pomoću specijaliziranih trepetljika unose se i zarobljene čestice hrane. Školjkaši uobičajeno nastanjuju područja zaštićenih voda gdje su visoke razine hranjivih tvari, a takvi uvjeti prevladavaju u vodama koje su često kontaminirane s ljudskim fekalijama. Kada patogeni mikroorganizmi zagađaju proizvodno područje, oni se filtriraju preko škruga i postaju vrlo koncentrirani u hepatopankreasu (probavnoj žlijezdi) školjkaša (POTASMAN i sur., 2002.).

ŠOLIĆ i sur., (1999.) su dokazali da vrijeme postizanja maksimalne koncentracije fekalnih koliforma (FC) čiji je glavni predstavnik *E. coli*, u školjkašima ovisi o količini FC u morskoj vodi, vrsti školjkaša i temperaturi. U dagnjama početna stopa koncentracije FC raste s temperaturom, ali je završna maksimalna količina veća na nižim temperaturama. U kamenicama je u istim uvjetima okoline (12 °C) koncentracija FC bila 263 puta viša nego u dagnjama, a samo 2,6 puta veća na optimalnoj temperaturi. U novijem istraživanju ŠOLIĆ i sur. (2010.) navode da je nivo koncentracije FC po satu u dagnjama na različitim temperaturama bio veći nego u kamenica, što ovisi i o promjenama saliniteta, dok je u kamenicama veći utjecaj imala promjena temperature. SIVRI i sur. (2010.) su promatrali

brzinu akumulacije FC bakterija iz mora u dagnjama i utvrdili da je uz njihovu prisutnost u roku od tri sata potpuno smanjen broj FC iz morske vode, a 90% ih je uklonjeno za 1,5 sat. Pokazalo se da u vodi onečišćenju s jednom ili više bakterijskih vrsta, dagnje već nakon jednog sata nakupljaju te bakterije u visokim koncentracijama istovremeno. Tako je najveći broj *E. coli* u školjkašima dosegao 6,6 log<sub>10</sub> CFU/g pri 14 °C i 5,4 log<sub>10</sub> CFU/g pri 21 °C nakon početne koncentracije od 3 log<sub>10</sub> CFU/mL mora. ŠOLIĆ i sur. (2010.) su utvrdili u dagnjama prosječan broj *E. coli* od 10<sup>4</sup> cfu/100g nakon sat vremena filtriranja mora s 1 x 10<sup>2</sup> i 2 x 10<sup>3</sup> CFU *E. coli* u 100 ml.

Bioakumulacija ciljanih bakterija u odnosu na koncentracije u okolnom moru izražena faktorom koncentracije može varirati od 1-100 puta većoj koncentraciji u školjkašima ovisno o utjecaju niza čimbenika (biološka aktivnost školjkaša, položaj u vodenom stupcu, sezona, temperatura, salinitet). Kod onečišćenja dagnje će pokazati brzi rast razine *E. coli* nakon čega slijedi pad, dok će u kamenicama razina sporije rasti i ostat će veća duže vrijeme nakon samog čina zagađenja. Zaključno, učinci onečišćenja će se vidjeti duže vrijeme u školjkaša nego u vodenom stupcu (LEE i MURRAY, 2010.).

Dosadašnje spoznaje o mogućnosti nalaza i prisustvu verotoksigenih *E. coli* u školjkašima, opisane su u nekolicini radova. KUMAR i sur. (2004.) su u Indiji utvrdili u dva od 48 uzoraka školjkaša s tržišta, prisutnost virulentnih faktora *stx* i *hlyA* (gen koji kodira enterohemolizin) od kojih je u izolatu iz jednog uzorka određen i serotip O76:H21.

U Francuskoj je u školjkašima dokazana prisutnost *stx* gena (19% do 27,8%) što ukazuje na kontaminaciju s VTEC sojevima (DUPRAY i sur., 1999., cit ANON., 2003.; GOURMELON i sur., 2006.) i 0,7% VTEC O157 izolata u kamenicama (GUYON i sur., 2000.). Na žalost, što se tiče sigurnosti proizvoda nema nikakve korelacije između prisutnosti VTEC i ukupnog broja *E. coli* koji se koristi kao indikator fekalnog zagađenja u školjkašima. Serotipizacijom VTEC sojeva iz školjkaša utvrđenih PCR metodom, otkriveni su i novi serotipovi kao što su O38:H26, O149:H1 i O100:H21, a koji su izolirani i kod svinja. Direktno izoliran *E. coli* O157 serotip bio je *stx* negativan. Svi pretraženi uzorci vode uzvodno od uzgajališta također su bili pozitivni na *stx* gene kao i jedan od dva uzorka mora, ali nije izoliran nijedan VTEC soj (GOURMELON i sur., 2006.). S druge strane, LEVESQUE i sur. (2010.) su testirali školjkaše u Kanadi iz područja pod velikim utjecajem ljudskih otpadnih voda, ali ni PCR metodom nisu otkrili *E. coli* O157:H7 sojeve ili VTEC.



U Jadranu su RIPABELLI i sur. (1999.) ispitivali prisutnost verotoksigenih sojeva *E. coli* kao i bakterija roda *Vibrio*, *Salmonella* i *Campylobacter* u dagnjama iz proizvodnih područja školjkaša, ali nisu izolirali ni jedan VTEC pozitivan soj.

## **2.4. Klinička slika i patogeneza**

### **Opći simptomi oboljenja**

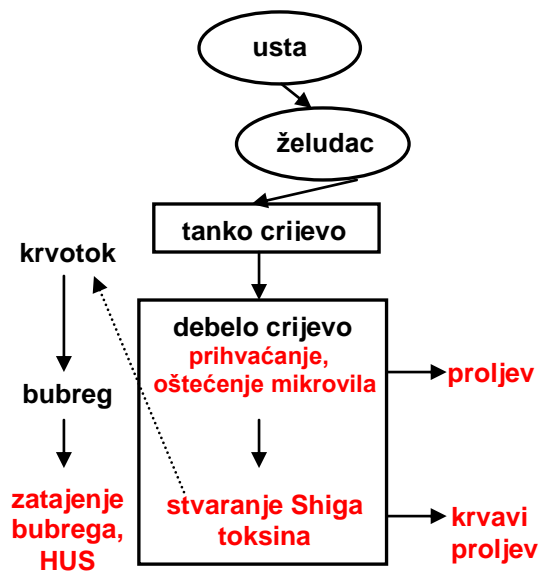
Iako je bakterija *E. coli* dio normalne flore crijeva, kada se nađe na pogrešnom mjestu, može izazvati infekciju gotovo svakog organa i tkiva. U probavni trakt bakterije ulaze kao posljedica loše higijene ili kontaminiranom hranom i vodom. Inkubacija u slučaju infekcije s verotoksigenim sojevima *E. coli* traje uglavnom duže od inkubacije kod salmoneloze (12 do 36 sati) ili kampilobakterioze (3-5 dana). Inkubacija kod infekcije VTEC O157:H7 se kreće obično oko šest dana ili duže.

Infekcija s VTEC sojem može uzrokovati asimptomatsku infekciju, simptome blagog do krvavog proljeva s abdominalnim grčevima (hemoragični kolitis - HC) do po život opasnog zatajenja bubrga (hemolitički uremički sindrom - HUS). HUS je karakterističan po simptomima akutnog bubrežnog sindroma, mikroangiopatskoj hemolitičkoj anemiji i moguće trombocitopeničnoj purpuri (TTP). S komplikacijama bolest može završiti i smrtnim ishodom. Tvz. klasični HUS je češći u djece radi nerazvijenosti imunog sistema i zbog opadanja imunosti u starijih osoba, a javlja se par dana nakon simptoma vodenastog krvavog proljeva. Simptomi TTP su karakteristični po neurološkim znacima i trombocitopeničnoj purpuri, a češća je u starosne skupine od oko trideset godina (KARMALI, 1989.).

Oralno uneseni VTEC sojevi obično u vrlo maloj dozi, moraju preživjeti u kiselom sadržaju želuca, a zatim se natječu s drugim mikroorganizmima u crijevima. Ako prežive, bakterije u lumen crijeva otpuštaju verotoksin Stx (shiga toksin), kojeg apsorbira crijevni epitel, a potom se resorbira u krv. Ovo omogućava dostavu toksina do površine ciljanih stanica različitih tkiva, te razvoj lokalnih i sistemskih simptoma.

Ukratko, bakterije prolaze kroz tanko crijevo, a virulentni geni se uključuju potaknuti signalima u debelom crijevu. VTEC se hvataju za enterocite debelog crijeva karakterističnim intimnim prijanjanjem, te uništavaju mikrovile i uzrokuju proljev. Ako je proizvedeno dovoljno Stx, lokalno oštećuju krvne žila debelog crijeva što uzrokuje krvavi proljev, a kada se dovoljna količina Stx apsorbira u krvotok, mjesta bogata toksin receptorima vaskularnog

endotela se oštećuju što dovodi do smanjenja funkcije bubrega, često oštećenja središnjeg živčanog sustava i razvoja HUS-a. Histopatološki, HUS je prepoznatljiv po raširenim sterilnim mikroangiopatskim lezijama karakterističnima za sistemsku toksemiju, koje se razvijaju u bubregu, crijevima, mozgu i pankreasu, a posljedica su skvrčavanja endotelne stanice, stvaranje fibrinoznih trombova i posljedičnim začepljenjem kapilara. Kliničko-patološki i radiološki nalaz kod HC-a je isti onom kod HUS-a što navodi da su oba posljedica istih poremećaja vaskularnog sistema (PATON i PATON, 1998.b; GYLES, 2007.)



**Slika 2.** Prikaz razvoja bolesti i mjesta djelovanja VTEC u organizmu (prema GYLES, 2007.)

### **Kolonizacija i adherencija verotoksigenih sojeva *E. coli* na enterocite crijeva**

Važno svojstvo za virulenciju VTEC je sposobnost vezanja na stanice crijevnog epitela i kolonizacija crijeva. VTEC je acido-rezistentna bakterija što je uvjetovano faktorom kodiranim *rpoS* genom, čija ekspresija omogućuje otpornost bakterije na pH < 2,5 više od dva sata. Smatra se da je otpornost na kiselinu bakterije *E. coli* O157 i drugih serotipova EHEC možda povezana s oboljevanjem ljudi nakon infekcije s veoma malim brojem patogena (PATON i PATON, 1998.b). Infekcijska doza može biti samo 0,4 CFU/g (PATON i sur.,1996.) ili 0,3 CFU/g (TUTTLE i sur., 1999.).

Kolonizaciji *E. coli* u crijevima prethodi prijanjanje na epitelne stanice što je heterogeno obilježje među VTEC sojevima i unutar sojeva. Postoji više tipova prijanjanja, difuzna,

lokalna, na mjestima bazolatelarnih spojeva stanica, te priljubljanje s "brisanjem" enterocita (engl. attaching/effacing - A/E) što je i najčešći tip prijanjanja kod VTEC sojeva (PATON i PATON, 1998.b).

A/E lezija enterocita odvija se u tri faze. Prvo je početno priljubljanje na površinu i uz mikrovile stanice domaćina, što je okidač za ekspresiju gena lociranih na kromosomskom „otoku patogenosti”, nazvanom i lokus za brisanje enterocita (engl. locus enterocyte effacement - LEE). Drugi korak je slanje signala u eukariotsku stanicu, a preko fosforilacije proteina stanice domaćina dolazi do polimerizacije aktina što izaziva strukturne promjene i akumulaciju citoskeletnih komponenti (KAPER i sur., 1998.) i formiranja stupova (pedestala) ojačanja u citoplazmi. Ove tvorbe se vide elektronskim mikroskopom i jedno su od glavnih obilježja A/E patogenosti *E. coli* (SCHMIDT, 2010.) s posljedičnim gubitkom mikrovila. Konačno, treći je korak tijesno sljubljanje bakterija na površinu sada ogoljene stanice. Inicijalno, ovaj tip adherencije opisan je i kod enteropatogenih sojeva, ali se prihvaćanje EPEC događa u stanicama tankog crijeva, a VTEC prvenstveno u debelom crijevu.

Geni koji kodiraju adherenciju smješteni su na LEE umetnutom u kromosom *E. coli* (DONNENBERG i sur., 1997.) a sadrži više od 50 gena. Sekrecijski sistem tip III (T3SS) koji je potreban za sekreciju LEE kodiranih proteina kodiraju geni *esc* i *sep*, a sekrecijske proteine tip III za iniciranje signala u stvaranju citoskeleta, kodiraju *esp* geni. U sredini su *eae* geni koji kodiraju intimin – bakterijski adhezin i *tir* geni koji kodiraju njegov translokacijski receptor. LEE omogućava bakterijama da učinkovito koloniziraju crijeva domaćina vezujući intimin i translocirani intimin receptor (Tir), što rezultira priljubljanjem LEE-pozitivnih bakterija na stanice kolona i krajnjim uništavanjem enterocita crijeva (BEUTIN i sur., 2007.). Tir je bjelančevina koju T3SS ubrizgava poput harpuna u membranu citoplazme, ostavljajući N- i C-završetke u citoplazmi. Sekrecijski sustav počinje u bakterijskoj citoplazmi, prolazi kroz unutarnje i vanjske membrane i prolazi kroz membranu stanice domaćina. Ovaj mehanizam podsjeća na "molekularnu injekciju", koja efektorne proteine ubrizgava kroz T3SS iglu direktno u citoplazmu ciljane stanice, koji pokreće stanice citoskeleta i signalni mehanizam (GYLES, 2007.; SCHMIDT, 2010.).

Intimin je 94-kDa protein vanjske membrane sastavljen od 939 aminokiselina (engl. Outer Membrane Protein, OMP) koji uvjetuje tijesno priljubljanje za enterocite (DONNENBERG i sur., 1997.; KAPER, 1998.). I intimin i Tir su kodirani *eaeA* genom (uvriježen naziv je *eae*) uklopljenim u LEE. Preko *eae* - negativnih mutanta *E. coli* O157:H7 dokazano je da je VTEC intimin (kao i EPEC intimin) esencijalan za reorganizaciju

citoskeleta (PATON i PATON, 1998.a). Brojni radovi opisuju jaku vezu između *eae* gena i sposobnosti izazivanja bolesti (PATON i PATON, 1998.b; BEUTIN i sur., 2004.; BLANCO i sur., 2004.). Sam intimin pokazuje određenu heterogenost između EPEC i VTEC u C završetku kao i unutar VTEC sojeva. Također, postoji i razlika u sekvencama *eae* gena što uvjetuje različit tropizam za određena tkiva. Kod oboljenja prasadi ovaj gen je neophodan za kolonizaciju slijepog crijeva i kolona, nastanak A/E lezija na enterocitima, te je medijator za razvoj kolitisa što se vidi histopatološki (PATON i PATON, 1998.b).

Prisutnost *eae* gena je snažno povezana s nekim serotipovima VTEC (O157:H7, O157:non-motile (NM), O26:H11, O111:NM, O103:H2, O121:H19, i O145:NM) a koji uzrokuju bolesti kao HC i HUS (ANON., 2007.a). Ovi izolati su češće izolirani iz oboljelih ljudi nego iz (zdravih) životinja, pa nema sumnje da *eae* gen sudjeluje u sposobnosti VTEC da izazove HC i HUS. Istraživanja u Francuskoj su pokazala da je samo 20% VTEC izoliranih iz okoliša bilo *eae* pozitivno, ali su uključivali sojeve O26, O101, O113, O121 i O157 (VERNOZY-ROZAND i sur., 2004.). Također *eae* pozitivni izolati iz životinja, pripadaju virulentnim serotipovima O157, O26, O111 utvrđenim i u ljudi (PATON i PATON, 1998.b).

Ipak određeni broj VTEC ne sadržava *eae* gene, dokazujući da intimin nije uvijek ključan za virulentnost u ljudi. *Eae* negativni sojevi ne mijenjaju citoskelet, niti izazivaju A/E lezije *in vitro*, ali su sposobni uništiti mikrovile enterocita na crijevu kunića *in vivo*, pa je sigurno da postoje dodatni virulentni faktori koji kompenziraju nedostatak *eae* gena (DYTOC i sur., 1994.). Isto tako prisutnost *eae* gena ne znači da će VTEC i proizvesti funkcionalni intimin i uzrokovati A/E lezije (PATON i PATON, 1998.b) što potvrđuju istraživanja PATON i sur. (1999.), te su serotipovi VTEC O104:H21 i O113:H21 koji nisu imali *eae* gen uzrokovali tri epidemije (ANON., 1995.b). MORA i sur. (2007.) su u Španjolskoj utvrdili ovaj gen u 26% izolata *E. coli* iz govedine, i to u svima O157:H7 VTEC, a samo 19% među non-O157 VTEC, za razliku od studije BLANCO i sur. (2004) koji su dokazali da je 56% kliničkih izolata iz ljudi imalo ovaj gen. BONNET i sur. (1998.) su karakterizirali serotipove O6:H4, O91:H10, O91:H21, O rough:H16, OX3:H- i O netipizirajući:H iz pacijenata oboljelih od HUS-a, a svi su bili *eae* negativni. U studiji u Njemačkoj od ispitivanih 677 VTEC izolata iz bolesnika *eae* gen je bio prisutan u 62,6%, najčešće u djece, dok su *eae* negativne VTEC infekcije dominantne u odraslih osoba (BEUTIN i sur., 2004.). BIELASZEWSKA i sur. (2009.) također su utvrdili da je VTEC O91 najčešća serogrupa izolirana iz odraslih pacijenata, a i najčešći *eae* - negativni VTEC serotip.

Dokazano je da je način prihvaćanja između VTEC i stanica epitela različit kod *eae* pozitivnih i *eae* negativnih VTEC. A/E lezije nisu esencijalne za razvoj krvavog proljeva ili HUS-a u ljudi, ali je većina sojeva povezanih s ovim sindromom *eae* pozitivna (GYLES, 2007.). S druge strane, VTEC sojevi kojima nedostaje A/E gen također uzrokuju oboljenje u ljudi (NEILL, 1994.), pa su BÜRK i sur. (2002.) predložili da se ovi geni ne smatraju apsolutno potrebnima za patogenost, te da svaki VTEC soj treba smatrati potencijalnim EHEC sojem. Prisutnost ili odsutnost *eae* gena u bakteriji *E. coli* ne određuje sposobnost izolata da uzrokuju bolest u ljudi (GILL i GILL, 2010.). Također, postoje serotipovi VTEC koji uopće nemaju LEE otkop patogenosti, kao što su O91:H21, O113:H21 i O128, a koji su također povezani s bolestima, potvrđujući da i drugi faktori pojačavaju virulenciju VTEC (ANON., 2007.a)

### **Djelovanje verotoksina**

Verotoksin (Shiga toksin - Stx) se smatra jednim od najjačih toksina za eukariotske stanice. Citotoksični učinak verotoksina je ireverzibilan, a receptori se nalaze na epitelu kolona, stanicama bubrega i endotelu kapilara. Izlučeni toksin oštećuje mikrovile, endotel lokalno i sistemski, posebice u bubregu i mozgu. Istraživanjem citotoksina iz izoliranih sojeva *E. coli* koji su bili izolirani iz pacijenata s dijarejom utvrđeno je da se radi o toksinima koji imaju sličnu strukturu i biološku aktivnost kao Shiga toksin kojeg proizvodi bakterija *Shigella dysenteriae* tip 1, a može biti neutraliziran s anti Stx (O'BRIEN i LAVECK, 1983.).

Neki VTEC sojevi proizvode samo anti Stx neutralizirajući toksin - Stx1, dok drugi proizvode samo non-neutralizirajući toksin - Stx2, a neki oba (STROCKBINE i sur., 1986.). Postoji više varijanti Stx toksina (GYLES, 2007.):

- Stx1c porijekla su od ovaca, povezani su s *eae*-negativnim VTEC i izazivaju umjerenu bolest ili ne izazivaju oboljenje u ljudi,
- Stx2c povezani su s proljevima i HUS-om u ljudi, a uobičajeni su među ovčjim VTEC,
- Stx2d povezani su s *eae*-negativnim STEC i umjerenim oboljenjem u ljudi,
- Stx2d<sub>act</sub> čija je citotoksičnost na Vero stanicama uvećana 10-1000 puta s elastazom u mukozi crijeva, sojevi s ovim toksinom su visoko virulentni,
- Stx2e varijante su odgovorne za edem prasadi, rijetko izolirane u ljudi, a izazivaju blagu bolest ili nema znakova bolesti u ljudi
- Stx2f varijante često su izolirane u izmetu golubova, rijetko u ljudi

Kasnije su opisane Stx2g varijante iz sojeva porijeklom iz goveda i uzoraka životinjskih otpadnih voda (ANON., 2008.a), a po novijoj nomenklaturi SCHEUTZ i sur., (2009.) potvrđuju Stx2 varijante iz *E. coli*, Stx2a do Stx2g, te Stx1 varijante Stx1a, Stx2c i Stx1d.

Stx toksini su složeni toksini. To su holotoksini sastavljeni od jedne A podjedinice (prema engl. active) koja svojim C - završetkom ulazi u prsten od pet monomera polimerske B jedinice (prema engl. binding) čija je funkcija vezanje toksina na specifične glikolipidne receptore na membrani ciljane stanice domaćina. U varijantama Stx, Stx1 i Stx2 broj aminokiselina u podjedinici A je različit, dok je u B podjedinici broj isti u sva tri toksina. Podjedinice A u Stx i Stx1 su virtualno jednake, jer se razlikuju u samo jednoj amino kiselini, međutim Stx2 ima samo 56% podudarnosti s drugim Stx toksinima u jednoj i drugoj jedinici. Značajan stupanj homolognosti amino kiselina u podjedinici A Stx utvrđen je s biljnim toksinom ricinom, koji ima isti način djelovanja.

Razlike u homolognosti podjedinica toksina utječu na patogenezu. Oba toksina Stx1 i Stx2 imaju jednaku strukturu podjedinica, s time da je podjedinica A u Stx 2 nešto veća. Vežu se na isti receptor i inhibiraju sintezu bjelančevina istim mehanizmom, ali pokazuju razlike u afinitetu za različite kulture tkiva (PATON i PATON, 1998.b; LAW, 2000.; MAINIL i DAUBE, 2005.). Površinski receptor na membrani ciljane stanice domaćina za Stx toksine je glikolipid globotriaosylceramid - Gb3, osim varijante Stx2e za koju je to globotetraosylceramid - Gb4.

Većina autora se slaže da su kod ljudi gastrointestinalni simptomi posljedica sistemskog djelovanja toksina jer tamo nisu dokazani površinski receptori Gb3. Jačina dijareje od srednje do krvave ovisi o jačini toksemije (TASHIRO i sur., 1994., cit. PATON i PATON, 1998.b), pa infekcija enterocita s VTEC ostaje lokalizirana bez septikemije, a Shiga toksin je kritični virulentni faktor za bolesti uzrokovane s VTEC (GYLES, 2007.). VTEC ne mogu u znatnoj mjeri invadirati ni crijevne epitelne stanice, pa je razvoj sistemske bolesti posljedica izгона Stx-a iz koloniziranih bakterija u lumenu crijeva u slojeve tkiva ispod i cirkulaciju. Stx prolazi kroz transcelularne putove preko intestinalnog epitela bez vidljivih oštećenja stanice (ACHESON i sur., 1996.). Kada prođe epitelijalnu barijeru i posljedično uđe u cirkulaciju, Stx cilja tkivo s prikladnim glikolipidnim receptorom. Specifičnost ove interakcije i raširenost ovih receptora na različitim vrstama stanica i tkiva ima glavni utjecaj na patogenezu bolesti (LINGWOOD i sur., 1996.; cit. PATON i PATON, 1998.b). Visoka razina Gb3 je utvrđena u ljudskim bubrezima posebno u korteksu gdje je i osnovno mjesto razvoja lezija u pacijenata oboljelih od HUS-a (BOYD i LINGWOOD, 1989., cit. PATON i PATON, 1998.b). Za

razliku od ljudi, VTEC u zečeva izaziva promjene u cekumu, kolonu i živčanom sustavu, ali ne i u bubrezima jer se Stx1 tamo ne veže radi odsustva Gb3 (RICHARDSON i sur., 1992.). Važnost specifičnosti Stx receptora na patogenezu je demonstrirana i mutacijom gena B podjedinice Stx2e toksina promjenom aminokiselina kao u Stx2 toksinu. Zamjena aminokiselina mijenja specifičnost mutiranog toksina za Gb4 u Gb3 što rezultira promjenom citotoksičnosti za različite vrste stanica.

Nije važan samo ukupan sadržaj Gb3 u nekoj stanici, već sastav i raspodjela lipida koji utječu na konformaciju oligosaharidne komponente koja se veže sa toksinom. To rezultira različitom specifičnom aktivnosti Stx toksina za dani tip stanica, kao što *in vivo* razlike specifičnih tkiva uvjetuju različitu patologiju i različitu letalnu dozu (LINGWOOD i sur., 1996. cit. PATON i PATON, 1998.b). Ima sugestija da interakcija Stx-a sa glikolipidnim receptorom na površini eritrocita utječe na patofiziologiju HUS-a, jer su ljudski P antigeni krvnih grupa glikolipidi i uključuju Gb3 i Gb4. Jedna od manifestacija HUS-a je mikroangiopatska anemija karakteristična po fragmentaciji eritrocita, a smatra se da se eritrociti oštećuju i mehanički o fibrin nakupljen u kapilarama (PATON i PATON, 1998.b).

Nakon vezivanja B podjedinice na ciljani glikolipid stanične membrane domaćina, ulazi A podjedinica koja zaustavlja funkcioniranje stanice zbog utjecaja specifičnih substaničnih mehanizama. Molekula toksina ulazi receptorom upravljanim endocitozom na unutarnju površinu odakle budu translocirane u citosol (SANDVIG i sur., 1994.; SANDVIG i DEURS, 1996.). Za vrijeme ovog procesa A podjedinica se veže proteazom iz membrane stvarajući katalitički aktivne terminalne fragmente A1 i A2, vezane sulfidnom vezom. Veza se postepeno reducira i oslobađa aktivnu A1 komponentu koja je RNA glikozidaza aktivna i kida specifičnu glikozidnu vezu i uklanja specifičnu adenin bazu ribosomske podjedinice napadnute stanice, kao i biljni toksin ricin. (SANDVIG i DEURS, 1996.; SAXENA i sur., 1989., cit. PATON i PATON, 1998.b). Pošto je adenin baza na petlji rRNA, što je faktor za produljenje o kojem ovisi vezanje aminoacil tRNA na ribosomsku podjedinicu, njen nedostatak inhibira produljenje peptidnog lanca u sintezi proteina i obavezno dovodi do propadanja i smrti stanice (FRASER i sur., 2004.).

Propadanje endotelih stanica (EC) dovodi do skvrčavanja i odvajanja endotela glomerula, nakupljanja fibrina i pločastih naslaga u bubrežnom mikrokrovožilnom sustavu (RICHARDSON i sur., 1988., cit. PATON i PATON, 1998.b). Dolazi do začepljenja kapilara i redukcije opskrbe krvi u bubrezima s posljedičnom bubrežnom insuficijencijom, što uzrokuje i fizički oštećenje eritrocita. Sistemski se javljaju i trombotička oštećenja, posebno u

kapilarama utrobe, mozga i pankreasa (PATON i PATON, 1998.b). Patofiziološki nalaz se osim oštećenja endotelne stanice očituje u smanjenju broja trombocita, njihovoj povećanoj plazma agregacijskoj aktivnosti te pojavi abnormalnog faktora VIII plazme u akutnoj fazi koji vodi ka agregaciji trombocita i trombocitopeniji – purpura.

Izgleda da su za razvoj maksimalnih oštećenja EC za vrijeme VTEC infekcije potrebni Stx toksini i domaćinski i/ili bakterijski medijatori upale za poticanje ekspresije receptora. Dokazano je da je proizvodnja interleukina i TNF $\alpha$  glomerularnih i proksimalnih tubula endotelne stanice inducirana verotoksinom (KOHAN i sur., 1997., cit. PATON i PATON, 1998.b), a potencijalni izvor proupalnih citokina IL- $\beta$  IL-6, IL-8 i TNF $\alpha$  su monociti i makrofagi. Ova lokalna proizvodnja u ovakvim stanicama kao i u drugim stanicama bubrega, osigurava maksimalnu indukciju ekspresije Gb3 povećavajući primljivost i osjetljivost za Stx. Isto tako je dokazano da se Stx1 veže na glomerularne mezangijalne stanice i inhibira mitogenezu, pa je moguće da je akutno zatajenje bubrega posljedica direktnog utjecaja Stx na ove stanice (ROBINSON i sur., 1995., cit. PATON i PATON, 1998.b).

Povećana razina IL-8 je snažan selektivni aktivator i kemoatraktant polimorfne leukocite. Citokinom potaknut polimorfonuklearni leukocit uzrokuje upalno oštećenje endotela. Enzim elastaza oslobođena iz adherentnih polimorfonuklearnih leukocita katalizira razgradnju elastičnih veza, te uništava ekstracelularni matriks i uzrokuje odljepljivanje EC od bazalne membrane i histopatološku sliku HUS-a. Stx potiče proizvodnju IL-8 i u epitelnim stanicama kolona. Upala koja se razvija vjerojatno oštećuje crijevne epitelne barijere i olakšava prolaz Stx iz lumena žile u submukozna područje (HURLEY i sur., 2001.).

Epidemiološke studije pokazuju utjecaj tipa verotoksina na razvoj bolesti, pa su VTEC sojevi koji proizvode Stx2, češće povezani s težim simptomima oboljenja ljudi, od onih koji proizvode Stx1 ili čak oba tipa toksina (KLEANTHOUS i sur., 1990.).

Moguće objašnjenje je da je *in vivo* transkripcija gena Stx2 veća nego Stx1, jer je *in vitro* dokazano da transkripcija Stx2 ovisnih toksina nije ovisna o povećanju koncentracije iona željeza kao Stx1 (WEINSTEIN i sur., 1988.). Također, na aktivnost Stx2 promotora ne utječe ni osmotski tlak, pH, kisik, aciditet i dostupnost ugljika za razliku od Stx1, a samo neznatno utječe porast temperature (MUHLDOERFER i sur., 1996.). Isto tako je dokazano da su stanice EC bubrežnih kapilara 1000 puta osjetljivije na Stx2, nego na Stx1 (LOUISE i OBRIG, 1995.). Studije su dokazale da postoji razlika u broju mjesta za vezanje Stx2 i Stx1 na površini EC bubrega. Naime pretpostavlja se da zbog heterogenosti lipida unutar Gb3 ovi receptori preferiraju vezivanje Stx2 što dovodi do njegova izuzetnog povećanja



citotoksičnosti (PATON i PATON, 1998.b). Također je potvrđeno da se smrtna nekroza tubula korteksa bubrega pri oralnoj infekciji miševa sa O157:H7 sojem koji proizvodi jedne i druge toksine, može spriječiti imunizacijom monoklonalnim anti-Stx2, ali ne i sa anti-Stx1 (WADOLKOWSKI i sur., 1990.)

Procjena patogeneze prema tipu Stx toksina, komplicira se činjenicom da postoje prirodne varijacije u sekvencama aminokiselina iz različitih serotipova, pogotovo unutar Stx2 tipa (SCHMITT i sur., 1991.; LINDGREN i sur., 1993.; PATON i PATON, 1998.b). LINDGREN i sur. (1993.) su među različitim VTEC utvrdili dva visoko virulentna Stx2 izolata, serotip O91:H21 čija je LD<sub>50</sub> <10 CFU za razliku od LD<sub>50</sub> >10<sup>10</sup> drugih Stx2 izolata. Posumnjali su da je od aktivacije stanicama mukoze crijeva za povećanje virulentnosti izglednije da ovi VTEC Stx2 izolati nose dodatne Stx2 ovisne toksine. Smatra se da proizvodnja toksina koji se mogu aktivirati podiže virulenciju ili kompenzira nedostatak drugih virulentnih faktora kao na primjer *eae* gena u gore navedenim O91:H21 izolatima (MELTON-CELSA i sur., 1996.).

U VTEC izolatima dokazane su brojne varijante Stx1 i Stx2 što ukazuje na raznolikost Stx obitelji, pa postoje brojni primjeri razlika unutar istog serotipa VTEC.

BAKER i sur. (1997.; cit. PATON i PATON, 1998.b) su u izolatima *E. coli* O157:H7 koji su svi posjedovali iste gene *stx1*, *stx2* i *eae*, potvrdili razlike u virulenciji. U studiji u Finskoj je ispitano 173 VTEC izolata pacijenata od kojih je 111 pripadalo serotipu O157 također najčešće s istom kombinacijom gena, *stx2* i *stx2c*. Nasuprot tome od 62 izolata non-O157 serotipa, jedan je imao *stx2* i *stx2c* gene, dok je samo *stx1* utvrđen u 27 i samo *stx2* u 15 non-O157 izolata. Nekoliko non-O157 VTEC je izolirano iz slučajeva HUS-a (O145: H28/H i O101:H s *stx2*, te O174:H2, O Rough:H4 O Rough:H49 s *stx2c*). Zaključeno je da su rizični faktori za razvoj HUS-a dob (1 do 5 godina), infekcija sa sojevima sa Stx2, Stx2c, te prisutnost *eae* i *hlyA* gena u oba serotipa, O157 i non-O157 (EKLUND i sur., 2002.)

U Danskoj u istraživanju kroz više od šest godina, utvrđeni su faktori rizika za razvoj krvavog proljeva (HC) i HUS-a. Za HC to su VTEC s *eae* i *stx2* genom, O serogrupe O157 i O103 i povećanje starosti, dok su za razvoj HUS-a ključni *eae* i *stx2*, ali kod dobnih skupina djece mlađe od 7 godina uz krvavi proljev (ETHELBERG i sur., 2004.).

HEDICAN i sur. (2009.) su u istraživanju od 2000. do 2006. godine utvrdili da su pacijenti inficirani s bilo kojim VTEC serotipom (O157 i non-O157), ali sa Stx2, češće razvijali krvavi proljev (71% nasuprot 53%), bili hospitalizirani (27% naprama 8%) i razvili HUS (7% prema 0%), za razliku od pacijenata koji su bili inficirani serotipovima sa Stx1.

Međutim ako se izdvoje samo non-O157 VTEC nije bilo značajne razlike u ozbiljnosti bolesti između slučajeva u kojima su izolirani Stx2 ili samo Stx1 tipovi.

Na kraju, veza između Stx2 proizvodnje i sposobnosti VTEC soja da izazove HUS nije apsolutna, jer su i VTEC sojevi koji proizvode samo Stx1, sposobni izazvati bolest (PATON i PATON, 1998.b).

Patogeni sojevi VTEC ne proizvode samo Shiga toksine nego mogu proizvesti i druge virulentne čimbenike koji mogu povećati težinu bolesti a proizvod su više gena smještenih na virulentnom plazmidu i kromosomu (PATON i PATON, 1998.b.).

GYLES (2007.) je sažeo dotadašnje spoznaje o ovim faktorima i podijelio ih po grupama na fimbrijske adhezine, nefimbrijske adhezine, proteaze H7 flagelin i LPS, te toksine.

Enterohemolizin (EHEC-hlyA) kodiran plazmidom je član porodice RTX toksina i uz prije opisan intimin jedan od najčešće dokazivanih čimbenika virulencije VTEC. Sam hemolizin je citotoksičan za endotelne stanice te povećava produkciju superoksida na bubrežnim tubularnim stanicama. Intravenozna aplikacija izaziva granulocitopeniju i trombocitopeniju (PATON i PATON, 1998.b). Osim što lizira eritrocite i oslobađa hemoglobin kao potencijalni izvor željeza za bakterije, oštećuje membrane različitih tipova stanica i potiče proizvodnju proupalnih citokina (TANEIKE i sur., 2002.).

BEUTIN i sur. (1989.) su utvrdili da 87% VTEC sojeva proizvodi hemolizin koji se razlikuje od uobičajenog fenotipa alfa hemolize (*a*-HlyA) na standardnim krvnim pločama. Razlika u građi *a*-HlyA i EHEC-HlyA određuje staničnu specifičnost pa EHEC-HlyA sudjeluje u modulaciji upalnih procesa u vezi s EC oštećenjima ili djeluje u sinergizmu sa Stx ili LPSom (BAUER i WELCH, 1996.).

Među izolatima *E. coli* O157:H7 serotipa visok je postotak EHEC hlyA. Tako je u istraživanju SCHMIDTA i sur. (1995.) svih 22 izolata *E. coli* O157:H7 bilo pozitivno na EHEC-hlyA, te 12/25 drugih VTEC sojeva, dok non-VTEC dijarogeni sojevi nisu imali EHEC-hlyA. Nasuprot tome istraživanja EHEC-hlyA serotipa O111:H- pokazala su 99,4% homolognosti s onima iz O157:H7 (PATON i sur., 1996.)

Unutar VTEC sojeva izoliranih u 16 od 18 pacijenata sa simptomima HUS-a dokazana je njegova prisutnost i utvrđen je enterohemolitički fenotip, dok je samo u 4 od 18 izolata pacijenata sa dijarejom imalo ovaj fenotip i genotip. Rekonvalescenti su također imali u serumu antitijela na EHEC-HlyA Ovo sve navodi na povezanost enterohemolizina i sposobnosti soja da izazove bolest (PATON i PATON, 1998.b).

BONNET i sur. (1998.) su iz bakterijskih izolata pacijenata sa HUS-om utvrdili enterohemolizin (Ehly) kodirajući gen u samo dva izolata, te zaključili da sinteza enterohemolizina može pridonijeti razvoju HUS-a, ali nije apsolutni preduvjet.

Što se tiče povezanosti Ehly i *eae* gena, on je nađen u oba tipa *eae*-pozitivnih i *eae*-negativnih VTEC. Među sojevima iz ljudi u Finskoj, 92% *eae*-pozitivnih VTEC bile su pozitivne i na enterohemolizin u usporedbi s 35% *eae*-negativnih sojeva (EKLUND i sur., 2001.).

Zaključak je da osnova za razmatranje ovih VTEC produkata kao dodatnih faktora virulencije uključuju homolognost s poznatim faktorima virulencije, fenotip u skladu s ulogom u patogenezi i regulaciju poznatim regulatorima virulentnih gena. Odsutnost dobrog životinjskog modela koji oponaša bolesti u ljudi i vjerojatnost da mnogi dodatni faktori virulencije samo malo doprinose virulentnosti otežava završno otkrivanje jesu li oni faktori virulencije (GYLES, 2007.)

## **2.5. Otkrivanje verotoksigenih sojeva bakterije *E. coli* (VTEC)**

Moguća detekcija VTEC sojeva u hrani i vodi uvjetovana je različitostima među brojnim serotipovima bakterije *E. coli*. Osim *E. coli* O157 po biokemijskom fenotipu non-O157 VTEC sojevi se međusobno ne razlikuju, što čini izolaciju ovih sojeva bakterija kompliciranom jer zahtijeva tehnike koje se u rutini u laboratoriju ne primjenjuju, pa je većina non-O157 VTEC još uvijek uglavnom nepoznata (MENG i sur., 2001.).

Izdvajanje različitih VTEC sojeva u namirnicama je ograničeno veoma malom infektivnom dozom. TUTTLE i sur. (1999.) su u hrani koja je bila povezana s epidemijom, metodom najvjerojatnijeg broja - MPN (engl. Most Probable Number) utvrdili od 15 do samo 0,3 mikroorganizma po gramu hrane (infekciju izaziva manje od 100 unesenih stanica). Stoga otkrivanje bakterija zahtijeva izrazito osjetljive tehnike jer malobrojne stanice u neselektivnim hranilištima lako preraste druga mikroflora. S druge strane sojevi VTEC su osjetljivi na komponente selektivnih bujona (FENG i sur., 2001.).

Slično drugim patogenima VTEC nisu jednakomjerno raspoređene po hrani, te se u njoj nalaze u malom broju zajedno s velikim brojem inhibitornih organizama, uključujući nepatogene sojeve bakterije *E. coli*. Te stanice su često osjetljivije na žučne soli, antibiotike ili druge inhibitorne tvari korištene u mnogim hranjivim medijima, pa je za oporavak oštećenih stanica potrebno predobogaćenje u neselektivnim medijima kojeg će slijediti

tehnike specifične izolacije i potvrdni testovi (BAYLIS i sur., 2008.). Zbog teškoća u izdvajanju bakterija iz različite hrane, pa tako i iz školjkaša, pokušavaju se primijeniti različite tehnike otkrivanja (GOURMELON i sur., 2006.).

Do sada uspostavljene metode za detekciju VTEC O157 baziraju se na serotipizaciji ili fagotipizaciji što nije najbolji pristup u identifikaciji VTEC različitih od O157 serotipa. Još uvijek se unapređuju imunološke metode, a razvijaju se metode molekularne identifikacije uključujući i sekvencioniranje (ANON., 1999.b). Konvencionalne metode kao što je uzgoj na hranjivim podlogama uz biokemijsku i serološku identifikaciju zahtijevaju intenzivni rad i vrijeme, a do dobivanja rezultata treba nekoliko dana. Enzimatske i neenzimatske metode se razvijaju, a postoje i komercijalno dostupni kitovi. Imunološke metode se opisuju kao osjetljive ali je potrebno nekoliko koraka za postizanje boljih rezultata, te dodatnih jedan do dva dana. Lančana reakcija polimerazom (PCR) omogućava brže umnažanje vrlo malog broja organizama te je primjenjiv standardni i PCR u realnom vremenu (Real-Time PCR) za pretragu jednog ili više gena istovremeno (simpleks i multipleks). PCR proces ipak može biti inhibiran sastavom hrane i velikom količinom neciljane DNA. U tim složenim okruženjima eventualne inhibitorne tvari dovode do neuspješne reakcije i lažno negativnih rezultata, ekstrakcija DNA također traje određeno vrijeme, a ponekad je ipak potreban postupak obogaćivanja i/ili imunomagnetske separacije (IMS).

Iako se nove metode i dalje stalno razvijaju, uspoređuju se sa „zlatnim standardom“ tj. konvencionalnim kulturnim metodama koje teže utvrđivanju prisutnosti ili odsutnosti same bakterije (DEISINGH I THOMPSON, 2004.). U svakom slučaju treba naglasiti da za dijagnostiku VTEC nedostaje jednostavna metoda koja se može primijeniti na širem području (ANON., 2004.a) a prvi korak je u upoznavanju non-O157 VTEC i rješavanje poteškoća u njihovoj detekciji i karakterizaciji (ANON., 2004.b).

### **2.5.1. Klasične metode detekcije i izdvajanja verotoksigenih sojeva *E. coli* (VTEC)**

Ne postoji jedinstvena propisana metoda za otkrivanje i izdvajanje verotoksigenih sojeva *E. coli*. Postupci za izdvajanje sojeva VTEC razvijeni su prvenstveno za *E. coli* O157:H7, te nisu prilagođeni različitim vrstama uzoraka kao što je feces, hrana ili klinički uzorci (ANON., 2004.b). Uglavnom se koriste klasične kulturne metode za non-O157 VTEC što obuhvaća opće postupke za obogaćivanje, izolaciju i presumptivnu identifikaciju svih ili većine sojeva *E. coli*, ili kulturne metode za *E. coli* O157 kao glavnog predstavnika

VTEC (EHEC) skupine (FENG i WEAGANT, 2002.). Verotoksigena *E. coli* O157:H7 je po biokemijskim osobinama netipični *E. coli* serotip što se koristi pri izdvajanju i razlikovanju od ostalih non-O157 VTEC (STROCKBINE i sur., 1998.). Kombinacijom ovih metoda teoretski se mogu izolirati sojevi *E. coli* različitih biokemijskih karakteristika u nekom uzorku hrane, pa tako i u školjkašima, a koje se daljnjim postupcima trebaju potvrditi kao VTEC.

### **Oporavak i umnažanje VTEC**

Budući da je *E. coli* O157 obično prisutna u broju <10 CFU/g, metoda detekcije i selektivno obogaćivanje u bujonu najmanje 25 g hrane je obavezno. Metode koje su razvijene za serotip O157:H7 baziraju se na upotrebi selektivnih podloga bilo krutih ili tekućih, u koje su dodani antibiotici za inhibiciju prateće mikroflore, radi izdvajanja malog broja VTEC sojeva iz miješane bakterijske populacije. U protokolima s preporučenom puferiranom peptonskom vodom (Buffered peptone water - BPW) s dodatkom vankomicina, cefiksima i cefsulodina pozadinska mikroflora je najmanja, ali je postotak oživljavanja bakterija *E. coli* O157 oštećenih zbog temperaturnih promjena, isušivanja, promjena osmotskog tlaka ili pH, jednak nuli (EDEL i KAMPELMACHER, 1973.; OKREND i ROSE, 1989.).

Za serotip *E. coli* O157:H7 najbolji uvjeti su u mTSB ili mEC, sa novobiocinom (mTSB-N ili mEC-N) i inkubacija od najmanje 18 sati i 42 °C (DOYLE i SCHOENI, 1987.; SZABO i sur., 1990.; HARA-KUDO i sur., 1999.). Pogodnost određenih bujona najvjerojatnije je različita zbog različitih fizioloških stanja organizama u testu, pa je za oštećene *E. coli* O157 bolja inkubacija na 42 °C u BPW s najmanjim antimikrobnim dodacima (OGDEN i sur., 2001.; DRYSDALE i sur., 2004.). HEPBURN i sur. (2002.) preferiraju BPW i TSB sa vankomicinom i novobiocinom za oživljavanje *E. coli* O157 iz tla, a navode žučne soli kao mogući problem koji bi mogao inhibirati oporavak bakterije.

Za rast non-O157 VTEC neki mediji mogu biti pogodni, kao modificirani tripton soja bujon (mTSB) i BPW, dok drugi mogu inhibirati ili zaustaviti rast ovih sojeva i treba ih izbjegavati (BAYLIS i sur., 2003.; i 2004. cit. BAYLIS i sur., 2008.). CATARAME i sur. (2003.) su uspoređivali različite varijante tripton soja bujona (TSB) za izolaciju serotipova *E. coli* O26 i O111. Studija je pokazala da je stopa rasta *E. coli* O26 bila slična u TSB, mTSB (TSB sa dodatkom pufera i žučnih soli od 1,5%) i modificiranom *E. coli* (mEC) bujonu (TSB sa smanjenom količinom žučnih soli na 1,12%) što je u skladu s prethodnim studijama

HARA-KUDO i sur., 2000.). Rast *E. coli* O111 soja je na 41,5 °C u TSB bio veći nego u mTSB.

U uzorcima fecesa s velikom količinom inhibitorne mikroflore gdje su za izolaciju korištene velike količine antibiotika, telurit, novobiocin, vankomicin i cefiksin (2,5; 20; 40 i 50 mg/l) svi naciyepljeni VTEC izolati su i izolirani što dokazuje da i ovi mediji podržavaju rast i obogaćivanje širokog raspona VTEC (HUSSEIN i sur., 2008.).

VIMONT i sur. (2006.b) zaključuju da ne postoji jasan i učinkovit protokol obogaćivanja VTEC. Ovi autori navode da se TSB koristio u velikom postotku istraživanja (39,3%), jer se ove komponente inače koriste za obogaćivanje patogena hrane prema raznim metodama. U svakom slučaju mTSB, s različitom kombinacijom antibiotika ovisno o propisanim standardnim protokolima pojedinih agencija kao što su Food and Drug Administration (FDA), Nordic committee on food analysis (NMKL), International organization for standardization (ISO), Health protection agency (HPA) je u širokoj upotrebi (ANON., 1998.; 1999.c.; 2001.; 2008.a).

U 60% eksperimenata novobiocin je bio najčešće korišten antibiotik i generalno gledajući VTEC su otporne na njega. Upotreba ovog amino kumarinskog antibiotika u bujonu za obogaćivanje pri otkrivanju VTEC iz hrane se objašnjava njegovom toksičnošću prema većini gram-pozitivnih bakterija i slaboj aktivnosti prema većini gram-negativnih bakterija (PAO i sur., 2005.). Iako je 20 mg l<sup>-1</sup> preporučena koncentracija novobiocina, neke studije pokazuju da je za 9% non-O157 VTEC sojeva kritična vrijednost već od 16 mg l<sup>-1</sup>, a 31% tih sojeva 20 mg l<sup>-1</sup> inhibira dok je za *E. coli* O157:H7 kritična vrijednost tek od 32 mg l<sup>-1</sup>. Uglavnom sojevi *E. coli* O157:H7 su značajno otporniji na novobiocin nego non-O157:H7 VTEC sojevi (VIMONT i sur., 2006.a). MORA i sur. (2007.) za izolaciju O157:H7 iz inhibitorne flore mljevenog mesa koriste dodatak antibiotika, a za non-O157 VTEC bujon bez dodataka.

Što se tiče utjecaja temperature, standardne metode za umnažanje *E. coli* uključuju rast na 44 °C, a to smanjuje rast *E. coli* O157:H7 (ANON., 2004.a). DOYLE i SCHOENI (1984.) su u svojim istraživanjima utvrdili da temperatura od 44 °C može potpuno inhibirati rast ovog serotipa. Optimalna temperatura rasta *E. coli* O157 je 41,5 – 42 °C (BOLTON i sur., 1995.; HARA-KUDO i sur., 1999.; SCOTTER i sur., 2000.; OGDEN i sur., 2001.; CATARAME i sur., 2003.). Metodom direktnog brojanja kolonija na pločama inkubiranim na 42 °C iz uzoraka mljevene govedine, sira i feferona pokazala je razliku u broju ukupne mikroflore od 1 log manje nego na 37 °C (DRYSDALE i sur., 2004.).

Vrijeme inkubacije u standardnoj proceduri za izolaciju *E. coli* O157 (ISO 16654:2001) uz upotrebu mTSB s dodatkom novobiocina, za postizanje bržeg preliminarnog rezultata propisano je na samo šest sati na 41,5 °C. Ipak VIMONT i sur. (2007.) su utvrdili da pri uobičajenoj koncentraciji novobiocin ima utjecaj na rast i *E. coli* O157 i non-O157, te usporava rast za 5,9 log<sub>10</sub> u 12 sati, pa šest sati umnažanja kod male kontaminacije ne mora biti dostatno. HARA-KUDO i sur. (1999.) su i prije uspješno primijenili protokol identičan ISO 16654:2001 standardu, ali s inkubacijom najmanje 18 sati. BOLTON (1999.) smatra da za različite vrste hrane treba koristiti različito vrijeme inkubacije (za sirovo meso šest sati, a mlijeko, sir i pitku vodu od 20 do 24 sata).

Za izolaciju serotipa O157:H7 iz hrane, OGDEN i sur. (2001.) su preporučili dodatak imunomagnetskih kuglica na koje su naliježljena antitijela za *E. coli* O157:H7. Međutim, izolacija ovom metodom komercijalno je usmjerena samo na izolaciju VTEC *E. coli* O157:H7 (ISO 16654:2001) ili u novije vrijeme na točno određene serotipove O26, O111, O103, O145. Uz to je ova metoda skupa za rutinsko testiranje većeg broja uzoraka (BAYLIS i sur., 2008.).

### **Izdvajanje i identifikacija presumptivnih VTEC**

Danas je za izdvajanje VTEC O157 serotipa iz velikog broja kompetitivne mikroflore u primjeni više različitih krutih selektivnih podloga. Prvi razvijeni agar je Sorbitol-MacConkey-Agar (SMAC) koji se osniva na nesposobnosti fermentiranja sorbitola (MARCH i RATNAM, 1986.). Njegova početna niska selektivnost je poboljšana (CT-SMAC), dodatkom cefiksima koji je inhibitor bakterija roda *Proteus* i telurita koji inhibira bakterijske vrste *Providencia* i *Aeromonas* (CHAPMAN i sur. 1991.; ZADIK i sur. 1993.). Većina standardiziranih protokola za hranu (ANON., 1998.; 1999.c.; 2001.; 2008.a), ali i za dijagnostičke uzorke fecesa propisuje SMAC / CT-SMAC agar za izolaciju O157:H7 kao jedan od agara izbora (ANON., 2010.g).

Ipak, ispitivanjem 46 poznatih referentnih sojeva *E. coli* na SMAC agaru, dobiveni su lažno negativni rezultati (5,9%), a ispitivanje uzoraka hrane pokazalo je značajan postotak (57,3%) lažno pozitivnih nalaza *E. coli* O157 (MANAFI i KREMSMAIER, 2001.). Pošto 6% izolata *E. coli* non-O157:H7 ne fermentira sorbitol, kao i bakterije *Morganella* i *Hafnia*, izgledat će identično O157:H7 kolonijama (EWING, 1986.). MÜLLER i EHLERS (2005.) su potvrdili nemogućnost da se i na CT-SMAC agaru sa sigurnošću izdvoji serotip *E. coli* O157:H7, te su sorbitol-negativne kolonije dobivene nakon selektivnog obogaćivanje i

imunomagnetske separacije (IMS) na CT-SMAC agaru identificirali kao pripadnike roda *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* spp. i *Vibrio*. Slična iskustva su imali i GOURMELON i sur. (2006.) kada su iz uzoraka školjkaša nakon obogaćenja i IMS, bakterije roda *Aeromonas* spp. i *Shewanella putrefaciens* izgledale jednako kao *E. coli* O157:H7.

Postoje također i sorbitol-pozitivni serotipovi *E. coli* O157 (FRATAMICO i sur., 1993.), te ih SMAC neće detektirati. Takvi sojevi su potvrđeni u epidemiji i sporadičnim slučajevima HUS-a u Njemačkoj i Češkoj (GUNZER i sur., 1992.; BIELASZEWSKA i sur., 1996.), nadalje ovi serotipovi su osjetljivi i na telurit što umanjuje značaj i CT-SMAC u izolaciji *E. coli* O157 (PATON i PATON, 1998.b). GYLES je (2007.) primijetio da su uobičajeni sorbitol-negativni sojevi VTEC O157:H7 rašireni širom svijeta, dok su VTEC O157:H- (nepokretni sojevi) obično sorbitol-pozitivni i identificirani u određenim dijelovima Europe. MELLMANN i sur. (2008.) su među EHEC izolatima bolesnika sa simptomima HUS-a utvrdili 67,7% izolata koji su pripadali serotipu O157: H7/H- od kojih je 30% pokazivalo fermentaciju sorbitola.

Atipični sojevi *E. coli* O157:H7 koji fermentiraju sorbitol ne mogu se identificirati na standardnim medijima za otkrivanje na osnovi sorbitola (BAYLIS i sur., 2008.).

Iako je CT-SMAC agar u širokoj uporabi za izolaciju svih VTEC, ZADIK i sur. su još 1993. upozorili da kombinacija ova dva dodatka inhibira rast 67% *E. coli*. Postupak na ovom agaru je ipak zbog dominacije sojeva O157:H7 i O157:H<sup>-</sup> u etiologiji bolesti u SAD i Europi najduže i najčešće korišten postupak za izdvajanje VTEC. Međutim, osim *E. coli* O157 bolesti su povezane s mnogim drugim VTEC serogrupama, a najviše ih je sorbitol pozitivno iako postoje i sorbitol negativne (PATON i PATON, 1998.b).

Zaključno, zbog varijacija unutar serotipa i navedenih svojstava agara preporučuje se korištenje drugih medija, kao što su noviji kromogeni mediji (BEUTIN, 1999.; DE BOER i HEUVELINK, 2000.).

Kao poboljšanje, SMAC agaru je dodan 5-brom-4-klor-3-indol- $\beta$ -D-glukuronid (BCIG) supstrat za detekciju  $\beta$ -D-glukuronidaze (GUD) (OKREND i sur., 1990.), te su se ubrzano razvili kromogeni i fluorogeni agari za detekciju O157:H7 (RESTAINO, 1996.; 1999.; BETTELHEIM, 1998.). Ovaj način detekcije se osniva na enzimatskoj aktivnosti GUD koju proizvodi preko 95% *E. coli* uključujući i anaerogene sojeve, dok je EHEC serotip O157:H7 GUD negativan (DOYLE i SCHOENI, 1987.). Uklapanjem BCIG u selektivni medij i djelovanjem ili odsustvom GUD dobivamo kolorimetrijsku reakciju na osnovi koje razlikujemo kolonije. Proizvodnja ovog enzima kod drugih bakterija iz porodice



*Enterobacteriaceae* je rijetka izuzev pojedinih sojeva rodova *Shigella* (44-58%) i *Salmonella* (20-29%) (MANAFI, 1996.). Također postoje i GUD pozitivne varijante *E. coli* O157:H7 (GUNZER i sur., 1992.; HAYES i sur., 1995.; MANNA i sur., 2010.) kao rijetki izuzeci koji ne umanjuju značaj ovih podloga.

Ako se kombiniraju  $\beta$ -glukuronid i  $\beta$ -galaktozid, kao i sorbitol za fermentaciju, različita kombinacija obilježja bakterija će se prepoznati različitom bojom kolonija što omogućava brzu presumptivnu identifikaciju različitih sojeva *E. coli* na istoj ploči (FENG, 2001.; BAYLIS i sur., 2008.). MARTIN i sur. (1999.) su upravo na gore navedenoj osnovi predstavili novi kromogeni selektivni medij O157:H7 ID agar (starijeg naziva O157 H7 ID-F ili novije chromID O157:H7, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) za izolaciju i otkrivanje bakterije *E. coli* O157: H7. Na ovom mediju glukuronidaza negativni ( $\beta$ -GLUC(-)) sojevi *E. coli* O157:H7 koji ne razlažu  $\beta$ -glukuronid, a koriste  $\beta$ -galaktozid - galaktozidaza pozitivni ( $\beta$ -GAL(+)) sojevi, pojavljuju se kao kolonije prepoznatljive i drugačije boje od ostalih i  $\beta$ -GLUC i  $\beta$ -GAL pozitivnih sojeva *E. coli*. Fertilitet je ekvivalentna SMAC, s time da je nakon 20 sati većina *E. coli* O157:H7 kolonija veća i uočljivija. Detekcija *E. coli* O157:H7 u obilju mikroflore je lakša pri maksimalnoj inhibiciji ostalih Gram (-) bakterija, pa selektivnost raste od 30% do 55% uz CT dodatak. Osjetljivost kod inkubacije 20 do 48 sati je 100%. Specifičnost iznosi bez CT dodatka 95% dok je sa CT dodatkom 98%, jer su sojevi *E. vulneris* koji su davali lažno pozitivne reakcije inhibirani.

BETTELHEIM (2005.) je također procjenjivao upotrebu O157 H7 ID-F za otkrivanje EHEC O157:H7/H- klonova (najčešće izolirani serotipovi kod infekcija ljudi koji imaju jedinstvena zajednička fenotipska obilježja kao nemogućnost fermentiranja sorbitola). Ovo je medij koji će otkriti da li VTEC pripadaju *E. coli* O157:H7/H- serotipu, dok *E. coli* koje nisu članovi O157 EHEC klona, bez obzira da li su VTEC ili ne, ne daju na podlozi tipične kolonije. JORDAN i MAHER (2006.) su tijekom zrenja sira pratili broj *E. coli* O157:H7 na CT-SMAC i CT-O157:H7 ID agaru koristeći tehniku prelijevanja agara. *E. coli* O157:H7 kolonije su se lako mogle razlikovati od non-O157:H7 kolonija na CT-O157:H7 ID medij, ali ne i na CT-SMAC agaru. Također se na O157:H7 ID mediju uočava veći broj *E. coli* O157: H7, tako da i samo 1 CFU/g sira može biti otkriveno. O157:H7 ID agar je jednostavan za očitavanje i interpretaciju. Modro-zelene (smaragdne) kolonije VTEC O157:H7 su vrlo prepoznatljive i u miješanoj i u čistoj kulturi, te je ovaj agar vrlo dobro prilagođen mikrobiološkoj kontroli hrane i kliničkoj detekciji *E. coli* O157:H7 (MARTIN i sur., 1999.;

BETTELHEIM, 2005.; JORDAN i MAHER, 2006.). Proizvođač (BioMerieux) navodi upotrebu O157:H7 ID agara nakon faze obogaćenja i za standardnu metodu ISO 16654:2001.

Izdvajanje i identifikacija *E. coli* iz školjkaša se temelji na oživljavanju svih *E. coli* iz slanog morskog okoliša u neselektivnom mineralno-modificiranom-glutamatnom bujonu (MMGB), nakon čega slijedi subkultivacija na selektivni agar (DONOVAN i sur., 1998.). Drugi postupci za detekciju *E. coli* iz školjkaša kao metoda prelijevanja agarom u petrijevim zdjelicama, odbačena je radi šokiranja bakterijskih stanica i posljedičnog smanjivanja njihovog broja. Direktno nasađivanje na kruti medij za brojanje *E. coli* nije dovoljno osjetljiv postupak, te je MPN najbolji izbor (WEST i COLEMAN, 1986.). Ipak, OGDEN i sur. (1991.) smatraju da su obje metode jednako pogodne za brojanje *E. coli* u školjkašima, ako se koriste kromogene i fluorogene supstance za mjerenje enzimske aktivnosti sojeva *E. coli* u podlozi.

Metoda najvjerojatnijeg broja (MPN) kao metoda za detekciju *E. coli* zasniva se na fermentaciji laktoze u bujonu, a 5 epruveta u nizu se koristi za ispitivanje vode, školjkaša i vode ili mora za polaganje školjkaša. MPN je statistička metoda koja se sastoji od višekratnih testova: faza sumnje, potvrdne i završne faze. U fazi sumnje se serijska razrjeđenja uzorka inokuliraju u bujon, a za rezultat se broje epruvete sa fermentacijom laktoze. Iz njih se izvodi potvrdna faza subkultivacije pozitivnih epruveta na selektivni agar i na kraju je završna faza očitavanja rezultata iz statističkih tablica standardnog ISO 7218:2007 postupka (ANON., 2007.c) za procjenu najvjerojatnijeg broja prisutnih organizama. DONOVAN i sur. (1998.) su verificirali novu metodu istraživanjem faze oporavka *E. coli* u mineralnom modificiranom glutamatnom bujonu uz detekciju laktoze za 24 sata, kao i postupak subkultivacije na žučni tripton glukuronid agar (Lab M tryptone bile glucuronide agar / BCIG agar / TBX agar).

TBX (engl. Tryptone Bile X-Gluc) je kromogeni medij za identifikaciju *E. coli* u hrani uključujući i školjkaše koji se temelji se na prisutnosti  $\beta$ -D-glukuronida koji je ugrađen u kruto hranilište i iz kojeg se nakon hidrolize s  $\beta$ -glukuronidazom oslobađaju dobro vidljive komponente (RIPPEY i sur., 1987.; FRAMPTON i sur., 1993.). Tako je stvorena brža i jednostavnija MPN metoda od prijašnje koju je međunarodna organizacija ISO prihvatila za ispitivanje i brojanje *E. coli* u školjkašima. ISO/TS-16649-3: Metoda za brojanje  $\beta$ -glukuronidaza pozitivnih *Escherichia coli* - tehnika najvjerojatnijeg broja-MPN, koristeći 5-brom-4-klor-3-indol- $\beta$ -D-glukuronid, je od 01.01.2006. prema Direktivama EU 852/2004 i EC 853/2004 obavezna kod pretrage živih školjkaša (ANON., 2007.d; 2007.e). Aktivnost  $\beta$ -glukuronidaze je prijavljena u 95-97% sojeva *E. coli* (FENG i HARTMAN, 1982.;

HARTMAN, 1989.) pa će stoga kromogeni mediji za izolaciju  $\beta$ -glukuronidaze pozitivne *E. coli* kao što je TBX agar biti pogodni za većinu VTEC (BAYLIS i sur., 2008.).

Do sada ima samo par radova koji se bave dokazom i/ili izolacijom VTEC sojeva u školjkašima. RAMPERSAD i sur., (1999.) su opisali postupak prema kojemu su u uzorcima sirovih kamenica i njihovim proizvodima, uzimali sterilne obriske i naciepljivali ih na eozin metilen plavi agar (engl. Eosin Methylen Blue Agar - EMBA). Nakon inkubacije na 37 °C preko noći izrasle tipične kolonije *E. coli* zelenkasto metalnog sjaja naciepljivane su na krvni agar (KA) i SMAC agar za otkrivanje karakteristika rasta (mukoidne, hemolitičke i one kolonije koje ne fermentiraju sorbitol). Svi sorbitol negativni izolati *E. coli* (12%) su ispitivani aglutinacijom na predmetnici uporabom *E. coli* O157 antiseruma za otkrivanje O157 pozitivnih sojeva. Ukupno je 2% izolata potvrđeno kao soj O157, dok prisutnost verotoksina nije ispitivana. U istraživanju MACRAE i sur. (2005.) promatran je utjecaj bujona na soj *E. coli* O157 i primjena izolacije imunomagnetskom separacijom (IMS). Predložen je postupak oporavka *E. coli* O157 iz morskog medija u puferiranoj peptonskoj vodi (PPV) s vankomicinom na 42°C za monitoring program školjkaša kao i za završno testiranje krajnjeg proizvoda. Do danas nije propisan ni monitoring ni identifikacija ovih sojeva *E. coli* u školjkama.

KUMAR i sur. (2001.) su po 25 g uzorka hrane (i školjkaša) obogaćivali u 225 mL modificiranog E.C. bujona (engl. Escherichia Coli broth) sa 20 mg/l novobiocina, a nakon 6 sati inkubacije kultura je metodom iscrpljivanja naciepljena na SMAC agar. Sorbitol fermentirajuće i nefermentirajuće kolonije su biokemijski identificirane. Potvrđene bakterije *E. coli* su nadalje pretraživane PCR postupkom na prisutnost *stx*, *hlyA* i *rfbO157* gena. GOURMELON i sur. (2006.) su dokazivali prisutnost *stx* gena u uzorcima školjkaša PCR postupkom iz puferirane peptonske vode inkubirane 20 - 24 sata na 37 °C, te su PCR pozitivne uzorke kasnije pretraživali na prisutnost VTEC. Primjenom istog bujona inkubiranog 6 sati, paralelno su testirali prisutnost *E. coli* O157 na CT-SMAC i O157:H7 ID agaru. Utvrdili su *E. coli* O157 u samo jednom uzorku, ali nije bio VTEC.

Otkrivanje specifičnih non-O157 *E. coli* na različitim selektivnim agarima još uvijek može biti problematično i znanstvenici u laboratoriju moraju odlučiti između konvencionalnih agara za dokaz *E. coli* (i pretraživati sve sumnjive kolonije npr. testovima aglutinacije) ili pokušati iskoristiti neki od alternativnih (op.a. kromogenih) agara (DRYSDALE i sur., 2004.) opisanih gore.

Nedostatak svih ovih klasičnih metoda izdvajanja je nemogućnost razlikovanja verotoksigenih sojeva *E. coli*. Non-O157 VTEC sojevi dobro rastu na podlogama uobičajenim za izolaciju *E. coli* te se od ostalih *E. coli* (isključujući serotip O157) mogu razlučiti samo po sposobnosti proizvodnje toksina - verotoksina (ANON., 2004.b) Sve sumnjive VTEC kolonije izolirane s krutih podloga trebaju biti potvrđene na virulenciju dokazom verocitotoksina (dalje u tekstu verotoksina) na Vero stanicama ili alternativno ELISA postupkom ili dokazom gena koji kodiraju verotoksine u lančanoj reakciji polimerazom.

### **2.5.2. Imunoenzimski test - ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)**

Postoji više seroloških testova razvijenih za identifikaciju proizvodnje verotoksina, a imunoenzimski test, ELISA, je najčešći test koji se koristi u brznoj detekciji patogena. Verotoksin ELISA (Stx-ELISA / VT-ELISA) test ima sposobnost detekcije svih VTEC sojeva (ANON., 2004.b). ELISA je jednostavna metoda za direktnu detekciju verotoksina *E. coli* O157 ili non-O157 *E. coli* sojeva. Alternativa je kompliciranim i dugotrajnim klasičnim tehnikama izolacije i identifikacije. Postupak se uglavnom koristi za brzu dijagnostiku prisutnosti verotoksina direktno u hrani ili fecesu (RANDALL, 1997.).

Najčešće se koristi "sendvič" tip ELISA, a reakcija se temelji na vezanju specifičnih antitijela za verotoksine uz supstrat koji čini ovu reakciju vidljivom (FENG, 2001). Dodatkom supernatanta u test i inkubacijom na sobnoj temperaturi za određeno vrijeme omogućeno je vezanje bilo kojeg Stx na antitijela vezana za pliticu. Nakon ispiranja dodaje se drugi set antitijela konjugiranih sa enzimima peroksidazom ili alkalnom fosfatazom. Sada je Stx u sendviču između dva seta antitijela, a nakon kratke inkubacije i ispiranja se dodaje enzimski supstrat i kromogen koji daju plavu ili žutu boju. Nakon zaustavljanja reakcije, intenzitet boje proporcionalan je količini prisutnog Stx u izvornom uzorku koji se očitava spektrofotometrom. Uz test se paralelno koriste pozitivne i negativne kontrole, čak i uz pretragu samo jednog uzorka. Iako se ELISA testom identificira prisutnost Stx u supernatantu, a ne prisutnost same verotoksigene *E. coli*, za brzi test hrane ili ljudskog izmeta ovi sustavi su vrlo vrijedni (BETTELHEIM i BEUTIN, 2003.). Osjetljivost testa je ponekad ograničena (ANON., 2004.a), pa se za povećanje osjetljivosti i specifičnosti test izvodi na kulturi iz inkubiranog bujona. Bez obzira na dodatni utrošak vremena (18 do 24 sata) ove imunološke metode predstavljaju veliki napredak. ELISA omogućava istovremeno otkrivanje VTEC O157 i VTEC non-O157 za razliku od tradicionalnih metoda, a uz to su i najekonomičnije u odnosu

na druge metode koje su van dosega većine rutinskih laboratorija (MACKENZIE i sur., 1998.)

ELISA testovi su prvo razvijeni za detekciju Stx u kliničkim uzorcima fecesa (LAW i sur., 1994.) ali se većina može uspješno koristiti za hranu koristeći prikladno obogaćenje i proceduru za ekstrakciju toksina (BAYLIS i sur., 2003., cit. BAYLIS i sur., 2008.). ELISA se također vrlo uspješno koristi za detekciju već izoliranih bakterijskih kolonija koje možda stvaraju verotoksine (BUECHER i sur., 2003.), ali kako je VTEC često prisutna u malom broju, potrebno je pretražiti veliki broj kolonija sa ploče. Nadalje, uzgoj u bujonu, priprema supernatanta, a zatim testiranje može zahtijevati puno vremena, kao i utrošak mnogo testova (jažica) dok se VTEC ne izolira (BETTELHEIM i BEUTIN, 2003.). Za povećanje osjetljivosti otkrivanja verotoksina ELISA testom može biti potrebno povećati njihovu proizvodnju rastom VTEC obogaćenjem u bujonima s dodatkom određenih antibiotika ili bez obogaćenja tretiranjem uzoraka s polimiksinom za poboljšanje otpuštanja toksina u supernatant prije izvođenja testa (BAYLIS, 2004.).

Više autora je u različitim uzorcima istraživalo primjenu ELISA testova. Tako su MACKENZIE i sur. (1998.) uspoređivali imunoenzimske testove za detekciju *E. coli* O157 na osnovi lipopolisaharida (Premier *E. coli* O157 EIA) i ELISA test (Premier EHEC) za detekciju prisutnosti Stx1 i Stx2 toksina. Nakon inkubacije fecesa utvrdili su specifičnost 98% i veću osjetljivost verotoksin ELISA (91%) za razliku drugog testa (86%).

BEUTIN i sur. (2007.) su testirali imunoenzimski test za detekciju Stx (Ridascreen-EIA) sa VTEC referentnim i testnim sojevima. Bakterijski izolati su uzgajani u tripton soja bujonu sa mitomicinom C u vremenu od 20-22 sata, a supernatant kulture je dobiven centrifugiranjem bakterija (8000g/2 min). Test je ocijenjen kao pogodan za rutinske pretrage bakterijskih izolata i nešto manje primjenjiv za ispitivanje uzoraka gdje se očekuju male količine Stx u mješovitim kulturama. Test je pokazao relativnu osjetljivosti od 95,7% i specifičnost od 98,7%.

CAPPS i sur. (2004.) su izvijestili o međulaboratorijskom istraživanju prema AOAC proceduri (engl. Association of Analytical Communities) o detekciji verotoksina u hrani koje proizvode VTEC bakterije. Alikvoti (25 g ili 25 mL) četiri vrste uzoraka (sirova mljevena govedina, nepasterizirano mlijeko, nepasterizirani jabučni sok i salama) nacijepljeni su pojedinačno s malom količinom 6 sojeva *E. coli* i s različitom Stx proizvodnjom (< 9 - 375 CFU/25 g). Specifičnost Stx ELISA u usporedbi sa Stx PCR testom je visoka (98% : 99%), a osjetljivost postupka je 89% : 72%. Osjetljivost PCR testa je bila ukupno niska zbog

inhibicije PCR-a ili smanjene ekstrakcije u uzorku jabučnog soka, dok je u drugim uzorcima hrane bila prosječno 85%. Ova studija potvrđuje Stx ELISA test kao metodu izbora za brzu presumptivnu pretragu uzoraka hrane na VTEC.

ATALLA (2000.) je validirao ELISA test za detekciju VTEC bakterije u goveđem mesu. Nakon primjene obogaćivanja u TSB u uzorcima je tražen Stx ELISA testom i testom na Vero stanicama (engl. VeroCells Assay - VCA). Sveukupno, 33,3% uzorka je bilo pozitivno u VCA, a 34,2% u ELISA testu, što je gotovo potpuna podudarnost rezultata. Osjetljivost ELISA s obzirom na VCA je 100%, a specifičnost 98,75%. BETTELHEIM i BEUTIN (2003.) su saželi podatke iz više studija o visokoj specifičnosti ELISA testa. Što se tiče osjetljivosti zaključili su da je ELISA nešto manje osjetljiva od testa na verostanicama i PCR postupka, dok su BOHAYCHUK i sur. (2005.) dokazali uspješnost detekcije Shiga toksina s oba postupka na umjetno kontaminiranim uzorcima mesa peradi od čak 100%, uz limit detekcije od 1 do 6 CFU *E. coli* O157:H7/g.

ARBAULT i sur. (2000.) uspoređuju ELISA test (Transia plate *E. coli* O157) u uzorcima namirnica s *E. coli* O157 u odnosu na IMS. Najbolji protokol obogaćenja za povećanje osjetljivosti je uključivao inkubaciju u mTSB ili mEC s novobiocinom, u vremenu od 16 do 20 sati, na temperaturi od 41,5 °C. Ovo omogućava i kasniju izolaciju kolonija iz pozitivnih uzoraka ELISA testom u kojima je dokazana prisutnost verotoksina. Granica detekcije umjetno kontaminiranog uzorka je bila od 1 do 3 CFU/25g hrane za obje metode (ELISA i IMS). Autor zaključuje da je ELISA dobra alternativa za metodu IMS koja je specifična samo za *E. coli* O157 te i komplicirana radi imunokaptivacije. ELISA testom je pregled uzoraka hrane olakšan jer se izbjegava nacjepljivanje i očitavanje ploča svih uzoraka.

Produkciju shiga toksina i uspješnost detekcije ELISA metodom u osam različitih bujona istraživali su ROCHA i sur. (2007.) koji su zaključili da bakterija u nepovoljnim uvjetima sa žučnim solima i/ili uz prisutnost antibiotika, rezultira povećanom ekspresijom i sintezom čimbenika virulencije. Statistički nije bilo značajne razlike u učinku novobiocina ili ciprofloksacina na proizvodnju Stx, ali je potrebna koncentracija novobiocina bila veća. Kod izolata uzgajanih u prisustvu antibiotika, Stx je otkriven i u supernatantu i u polimiksinom - tretiranim peletama (sediment bakterija), ali su u supernatantu zabilježene manje varijabilnosti i viša razine proizvodnje. Isti autori su pokazali da je proizvodnja Stx nezavisna od bakterijskog rasta jer su razine Stx u različitim supernatantima bile su slične, za razliku bakterijskog rasta koji je bio sasvim drugačiji. Vrhunac Stx proizvodnje je bio u ranoj fazi bakterijskog umnažanja što je korisno u dijagnostičke svrhe.

Istraživanjem najpogodnijih protokola za brzo otkrivanje verotoksina u hrani, od svih protokola za obogaćivanje u više laboratorija, tripton soja bujon s 20mg/l novobiocina (mTSB + N) inkubiran na 41.5°C kroz 20–22 sata izabran je u cjelini kao najbolji medij i za rast i za proizvodnju verotoksina iz različitih VTEC. Usporedba niza komercijalno dostupnih Stx imunotestova za otkrivanje Stx koristeći mTSB + N bilo u filtratima obogaćenih kultura *E. coli* preko noći, bilo u homogenatima uzoraka hrane, dali su slične rezultate (ANON., 2005.a).

Vrlo je malo istraživanja o primjeni Stx-ELISA testa na školjkašima i inače proizvodima ribarstva. U jednom rijetkom istraživanju iz sojeva *E. coli* izoliranih iz morskih plodova, govedine i kliničkih uzoraka uključenih u istu studiju, ELISA testom utvrđeno je 11 sojeva koji proizvode jedan ili oba toksina Stx1 i Stx2. Među njima su dva izolata iz školjkaša, dva iz ribe, šest iz govedine i jedna iz kliničkog slučaja krvavog proljeva. Svi Stx pozitivni sojevi bili su citotoksični na Vero stanicama, nijedan soj nije bio negativan sa ELISA testom i pozitivan na test Vero stanicama i obrnuto. Korelacija je 100% između ova dva testa. U slučaju hrane iz mora i kliničkih izolata, rezultati ELISA testom bili su u korelaciji sa PCR testom na Vero stanicama, ali ne i u uzorcima govedine (KUMAR, 2004.).

### **2.5.3. Lančana reakcija polimerazom - PCR (Polymerase Chain Reaction)**

MENG i sur. (2001.) su utvrdili da se povećanje sposobnosti identifikacije VTEC sojeva zasniva na metodama kao što su testiranje Stx ili njihovih *stx* gena i drugih faktora virulencije karakterističnih za VTEC. Valja napomenuti da iako se neki VTEC sojevi mogu prepoznati po fenotipskim osobinama ili specifičnim markerima virulencije osim verotoksina, proizvodnja verotoksina je jedino svojstvo koje je zajedničko za sve vrste VTEC. Metoda koja je pogodna za identifikaciju i izolaciju svih VTEC sojeva treba se temeljiti na detekciji verotoksina ili njihovih gena (BAYLIS i sur., 2008.). Stoga čak i izolati koji su potvrđeni kao *E. coli* O157:H7/H- trebaju biti retestirani kako bi provjerili svoj toksigeni potencijal. Alternativni pristup dokaza virulencije VTEC prema „zlatnom” standardu VCA (test na Vero stanicama) je osim gore opisane ELISA metode, upotreba molekularnih metoda. Najčešća metoda je lančana reakcija polimerazom - PCR (engl. Polymerase Chain Reaction) usmjerena na dokaz *stx* gena, VT-PCR / Stx-PCR (PATON i PATON, 1998.b; BETTELHEIM i BEUTIN, 2003.). CHAPMAN i sur. (2001.) su usporedbom tri metode detekcije verotoksina, dokazali da je PCR najosjetljiviji na njihovu prisutnost.

Standardne PCR metode su najvjerojatnije najpogodnije za detekciju verotoksina u hrani (ANON., 2004.a). Lančanom reakcijom polimerazom (PCR) fragmenti ciljane DNA se umnažaju uz pomoć DNA polimeraze koja produžava početnice dodavanjem nukleotida na određena mjesta komplementarnog lanca ispitivane DNA koja služi kao kalup. U više ciklusa iz jedne se kopije dobije mnogostruko više ciljane DNA koju onda možemo izdvojiti elektroforezom u gelu i očitati rezultate (DELIC, 1997.). Teoretski PCR može iz jedne kopije, ciljane DNA umnožiti milijun puta u 2 sata isključujući potrebu za obogaćenjem kulture (FENG, 2002.). Direktna detekcija verotoksina ELISA testom je manje specifična i osjetljiva od PCR-a.

Različiti PCR postupci su opisani za detekciju *stx1*, *stx2* i *stx2* varijanti gena, te drugih markera virulencije karakterističnih za VTEC (intimin, enterohemolizin; fimbrije, serin-proteaze itd.). Simpleks PCR je postupak koji se koristi za identifikaciju jednog gena, a multipleks PCR postupak koji simultano amplificira nekoliko VTEC virulentnih gena (POLLARD i sur., 1990.; PATON i PATON, 1998.b; PIERARD i sur., 1998.; FENG i MONDAY, 2000.; FENG i WEAGANT, 2009.). Najčešće su u upotrebi tzv. toksin tip PCR metode. Ipak one detektiraju sposobnost proizvodnje toksina, a ne samu ekspresiju gena ili trenutačnu prisutnost toksina. Stoga bi se detekcija proizvodnje Stx i/ili *stx* gena u kliničkim i drugim uzorcima bez pokušaja naknadne izolacije VTEC soja trebala smatrati kao vjerojatan rezultat (BAYLIS i sur., 2008.).

PCR se može koristiti za čiste (TRKOV i sur., 2008.) miješane i/ili obogaćene kulture (KUMAR i sur., 2001.) ili direktno za ekstrakte iz hrane i fecesa (ANON., 2004.b). Specifičnost direktnog Stx-PCR postupka je čak 99%, a osjetljivost u uzorcima hrane je prosječno 85% (CAPPS i sur., 2004.). Dva su problema povezana s ovom tehnikom. Prvi je ko-ekstrakcija spojeva koji mogu inhibirati PCR reakciju, a drugi moguća amplifikacija DNA iz mrtvih stanica (BAYLIS i sur., 2008.). Također, bez prethodnog obogaćenja u bujonima i umnožavanja živih stanica, uobičajeni limit detekcije je u postupku PCR  $10^3 - 10^4$  CFU/g (BAYLIS i sur., 2008.), za razliku od utvrđenog limita detekcije u istraživanju CUI i sur. (2003.) od 1 CFU/g (uzorak govedine) uz obogaćivanje 6 sati na 37 °C.

Iako se molekularne metode koriste za brzu pretragu hrane *stx* genskih sekvenci, glavni praktični problem ostaje izdvajanje sumnjivih VTEC iz hrane zbog visoke razine konkurentnih mikroorganizama i ostalih sojeva *E. coli*. Iako se za otkrivanje potencijalne prisutnosti VTEC koristeći PCR otišlo daleko naprijed, potvrda pozitivnih uzoraka (s PCR utvrđenim *stx* genima), kulturelno i izdvajanje VTEC u uzorcima hrane ostaje teško. Nije



neuobičajeno da postotak *stx* pozitivnih rezultata u PCR postupku bude visok, a postotak potvrđenih rezultata znatno niži (BAYLIS i sur., 2008.).

Brojni su primjeri napornih nastojanja izolacije VTEC iz PCR pozitivnih uzoraka.

VAN DUYNHOVEN i sur. (2008.) opisuju testiranje pohranjenih pozitivnih RT PCR (engl. Real Time PCR) uzoraka fecesa poslanih iz rutinskih laboratorija na izolaciju VTEC. Izolirane *E. coli* kolonije su testirane PCR postupkom na *stx1*, *stx2*, *eae* i *hlyA* gene. Iz svakog uzorka je testirano do 50 kolonija u namjeri da se izoliraju *stx* pozitivne. Ako su *stx* pozitivne kolonije pronađene, serotipiziranje je provedeno na dvije slučajno izabrane kolonije. Ukupno od 1,7% uzoraka fecesa sa *stx* genima utvrđenih PCR pretragom, uspješno je izolirano samo 38% VTEC sojeva. Slični problemi su prijavljeni od različitih autora kod potpuno različitih vrsta uzoraka.

KHAN i sur. (2002.) su u 50% VTEC pozitivnih uzoraka mesa s utvrđenim *stx1* ili *stx2* genima multipleks PCR postupkom, izolirali samo četiri VTEC iz pedeset pet uzoraka zbog čega su morali pretražiti oko 500 kolonija u pokušaju izolacije. Kod uzoraka obrisaka s trupova uspješnost izolacije VTEC varira od 37 – 84%, a od 136 PCR pozitivna uzorka mliječnih proizvoda dobiveno je samo 13% izolata (BARKOCY-GALLAGHER i sur., 2003.; VERNZOZY-ROZAND i sur., 2005.).

DHANASHREE i MALLYA (2008.) opisuju razliku u osjetljivosti tri različita načina uporabe PCR testa za otkrivanje VTEC virulentnih gena, direktno u uzorcima mesa, u modificiranom TSB bujonu i biokemijski potvrđenim izolatima. Obogaćena mTSB kultura metodom iscrpljivanja je nacijepljena na SMAC i CT-SMAC agar, a sorbitol pozitivne i negativne kolonije su odabirane za identifikaciju biokemijskim testom. Sve kolonije potvrđene kao *E. coli* pohranjivane su u 20% glicerolu za karakterizaciju. Pretražena su 103 uzorka. Od direktno testiranih uzoraka, 65 je pozitivno na *eae* gene i jedan na ostale VTEC gene (*stx1*, *stx2*, *rfb O157*, *eae* i *hlyA*). Od obogaćenja 90 uzoraka je bilo pozitivno na *eae* i jedan na ostale VTEC gene, dok je kulturnom metodom izdvajanja *E. coli* izolirana u 80 uzoraka mesa od kojih je samo 40 bilo PCR pozitivno na *eae* i jedan na ostale VTEC gene. Razlog teške izolacije VTEC iz PCR pozitivnih uzoraka može biti nestabilnost *stx* gena u uzorcima ili izoliranim kulturama. BIELASZEWSKA i sur. (2007.) su već prilikom prve subkultivacije u laboratoriju od 190 EHEC izolata O26 serotipa otkrili gubitak *stx* gena u 10% do 14% kultura, što su ranije zamijetili i drugi autori u non-O157 serotipovima (KARCH i sur., 1992.) i izolatima *E. coli* O157:H7 (FENG i sur., 2001.). Ipak, izrazita se osjetljivost PCR postupka pri detekciji hrane koja je inače reducirana radi prisutnosti raznih inhibitora,

postiže kod pretrage poraslih kultura, (FENG, 2001). Izbor kolonija na temelju morfotipa je nepouzdan i daje samo 30% pozitivnih rezultata. Ispitivanje PCR testom više odabranih (pikiranih) kolonija, pokazala se pouzdana metoda za potvrdu VTEC pozitivnih kolonija.

Ovaj pristup je odabran kao završni protokol za detekciju VTEC u različitim prehrambenim proizvodima (ANON., 2005.a). MORA i sur. (2007.) opisuju postupak detekcije VTEC kulture izolirane iz mljevene govedine. Za izolaciju non-O157 VTEC uzorci su homogenizirani u BPW bez antibiotika. Kultura je naciepljivana na SMAC, CT-SMAC i MAC agar, a za PCR je uzimana puna eza porasta bakterija iz područja prvih linija naciepljivanja. Kultura s ploča je suspendirana u 0,5 mL sterilne destilirane vode i kuhana 5 min za oslobađanje DNK. Iz svake PCR pozitivne kulture po 10 *E. coli* kolonija sa ploča je ponovo analizirano u PCR postupku kako bi se dobili VTEC izolati za daljnju karakterizaciju. Ako nije bilo ni jedne pozitivne kolonije pronađene među prvih 10 kolonija, testirano je barem još 40. Ako još uvijek niti jedna od ispitivanih (koliformnih) kolonija nije bila pozitivna u PCR reakciji, uzorak je prijavljen kao PCR pozitivan bez VTEC izolacije.

SLANEC i sur. (2009.) opisuju postupak detekcije VTEC na osnovi poraslih kolonija na pločama u uzorcima mesa i mlijeka koji su nasađivani na mTSBN, a nakon inkubacije naciepljeni na SMAC i enterohemolizin (EH) agar. Bakterijski rast je pretražen PCR postupkom na *stx* gene, a u slučaju PCR pozitivnih uzoraka u cilju otkrivanja *stx* pozitivnih izolata na prisutnost *stx* gena je analizirano do 300 pojedinačnih kolonija s ploča. U tu svrhu stvarane su skupine (engl. pool) od po pet kolonija koje su bile podvrgnute testu, a paralelno s tim sve odabrane kolonije su pohranjivane na agar. PCR pozitivne skupine korištene su za identifikaciju *stx* pozitivnih sojeva analizirajući po jednu koloniju s istim postupkom. VTEC pozitivni sojevi su pohranjivani u 50% glicerina bujon na -70 °C, za daljnju karakterizaciju.

HEDICAN i sur. (2009.) opisuju sličan postupak za identifikaciju velikog broja uzoraka iz drugih laboratorija tijekom dužeg perioda (uzorak su porasle kolonije na SMAC agaru). Po primitku SMAC ploča DNK se priprema brisanjem poraslih kolonija sa ploče koristeći 1 μL jednokratnu ezu uključujući kolonije različite morfologije uz izbjegavanje prve zone inokulacije za pripremu šest podjedinica uzorka (engl. sweeps). Pojedinačne podjedinice sa svake primarne ploče su pripremane u 200 μL u molekularno-čiste vode za izdvajanje bakterijske DNA. Rezultat izolacije pojedinačnih VTEC kolonija je bio visok, 75% prethodno utvrđenih (1%) pozitivnih PCR ploča. Kao i u prethodnim studijama ako nije bilo pojedinačnih kolonija koje sadrže *stx* gene, uzorak je svejedno bio klasificiran kao PCR

pozitivan nepoznatog VTEC serotipa, a u slučaju *E. coli* O157 negativne serogrupe, non-O157 VTEC.

Što se tiče primjene molekularnih metoda za otkrivanje VTEC u školjkašima postoji mali broj objavljenih radova.

Pretragom uzoraka na tržištu SAMADPOUR i sur. (1994.) su u SAD primijenili tehniku DNA-hibridizacije (engl. Colony DNA hybridization) na različitim uzorcima prethodno obogaćene hrane, te su dva (5%) od 44 uzorka školjkaša bila pozitivna sa SLT II probama (segment DNA za dokaz *stx2* gena) ali bez kasnije izolacije pozitivnih kolonija. KUMAR i sur. (2001.; 2004.) su u tri od ukupno 48 izolata *E. coli* iz uzoraka školjkaša utvrdili prisutnost gena različitih virulentnih faktora. Sva tri izolata su imala *hlyA* gene, a samo dva i *stx* gene. Nijedan izolat nije posjedovao gen *rfbO157* za kodiranje *E. coli* O157. Pohranjeni izolati su nadalje karakterizirani imunoenzimskim testom (bead-ELISA) i vero-citotoksigenim testom uz PCR i hibridizaciju za otkrivanje *stx1* i *stx2* gena. U jednom izolatu sa *stx* genima utvrđen je *stx2* gen, a u drugom oba.

Pretragom živih školjkaša DUPRAY i sur. (1999., cit ANON., 2003.) ukazuju da se VTEC sojevi potencijalno mogu naći u 19% školjkaša nizvodno od poljoprivrednih površina u području proizvodnje školjkaša klasificiranih kao B razred (školjkaši predviđeni za pročišćavanje prije marketinga). U bujonu iz kulture školjkaša u sedam od ukupno 36 uzoraka utvrđeni su *stx* geni. Iz pozitivnih uzoraka nije bilo pokušaja izolacije VTEC sojeva.

GUYON i sur. (2000.) su tražili samo VTEC O157 u školjkašima te su u jednom uzorku kamenica (n=150) izolirali jedan soj *E. coli* O157. Uzorak je sadržavao 276 CFU fekalnih koliformnih bakterija na 100 g tkiva, bez drugih serotipova *E. coli*. Kasnijim testiranjem na patogene gene, *eae*, *hlyA*, *stx* i njihove podvarijante, utvrđena je prisutnost *stx1* i *stx2c* gena.

GOURMELON i sur. (2006.) su dokazali prisutnost *stx* gena u 40 uzoraka školjkaša (n=144) PCR metodom (iz homogenata hepatopankreasa ili mesa školjkaša inkubiranom u BPW). Iz tih *stx* pozitivnih obogaćenja izolirano je pet VTEC kultura (12,5%). Paralelno su utvrdili serotip *E. coli* O157 u samo jednom uzorku sa *eae* i *ehxA* (op. a. *hlyA*) genima, ali bez *stx* gena. Svi pretraženi uzorci vode i mora (15) bili su pozitivni na *stx* gene, ali nijedan soj nije izoliran u ovim uzorcima.

U radovima više autora relativno je mala stopa oživljavanja VTEC sojeva iz PCR pozitivnih obogaćenja školjkaša i inače mala ili nikakva učestalost izolacije *E. coli* O157 serotipova (GUYON i sur. 2000.; KUMAR i sur. 2001., 2004.; GOURMELON i sur., 2006.). GOURMELON i sur. (2006.) također navode moguće razloge poteškoća u izolaciji

verotoksigena *E. coli* iz školjkaša, u malom broju bakterija VTEC u obalnom moru, veliku količinu pozadinske mikroflore, te prisutnost živih ali nekulturable VTEC zbog stresa utjecajem mora (ROZEN i BELKIN, 2001.). Na kraju, *stx* geni prisutni u uzorcima školjkaša mogu potjecati iz VTEC, ali i iz Stx - bakteriofaga ili fagne DNA u uzorku (MUNIESA i JOFRE (1998.). Ovi autori su ocjenjivali učestalost Shiga toksin bakteriofaga (engl. Shiga toksin-converting phages) u otpadnim vodama gdje je broj bakteriofaga zaraznih za *E. coli* O157:H7 i prijenos *stx2* gena bio u rasponu od 1-10/mL otpadne vode. Rezultati novijih istraživanja pokazuju da su Stx fagi inače široko rašireni u okolišu, pa određeni broj Stx bakteriofaga nije povezan direktno sa većim ulazima fekalnog onečišćenja (IMAMOVIĆ i sur., 2010.)

#### 2.5.4. Biokemijska i serološka potvrda

VTEC sojevi pokazuju zajedničke biokemijske karakteristike *E. coli*, osim VTEC O157 sojeva koji uglavnom ne fermentiraju sorbitol, ne stvaraju  $\beta$ -glukuronidazu, a fermentiraju rafinozu i dulcitol (DOYLE i SCHOENI, 1987.; CHAPMAN, 1991.).

Izdvojene kolonije porasle na TBX agaru pri 44°C koje pokazuju aktivnost  $\beta$ -glukuronidaze po metodi ISO/TS 16649-3/2005 smatraju se potvrđenim bakterijama *E. coli*. Ostale izdvojene kolonije karakteristika rasta tipičnih za *E. coli* O157 i/ili *E. coli* non-O157:H7 serotipove mogu se potvrditi dokazom karakterističnih biokemijskih reakcija. To je tzv. IMViC test u kojem sojevi *E. coli* pokazuju indol i metil-crveno pozitivnu reakciju, a Vogues–Proskauer i citrat negativnu. Ovakve tipične biokemijske reakcije označavaju biotip 1 bakterije *E. coli*, za razliku od indol negativnog biotipa 2 bakterija *E. coli* koje se ne smatraju patogene (MEHLMAN, 1984.).

Za biokemijsku identifikaciju bakterije *E. coli* koriste se i komercijalni testovi s većim brojem istovremenih testova kao na primjer API–E 20, Biomerieux, Francuska, gdje su reagensi za biokemijski niz složeni u minijaturnim posudicama, koji se koristi po uputi proizvođača.

Metode za serotipiziranje VTEC se kreću u rasponu od onih koje se mogu primijeniti u svim laboratorijima, do onih koje se primjenjuju u referentnim ili drugim specijaliziranim laboratorijima. VTEC sojevi izolirani iz ljudi pripadaju u najmanje 472 različitih O:H serotipova, dok je 435 VTEC serotipova izolirano samo iz goveda. Shema za serotipiziranje (SCHEUTZ i sur., 2004.) ima somatske - O antigene od O1 do O181, a posljednji otkriveni sojevi koji su svrstani u šest novih skupina O176 - O181, svi su proizvodili verotoksine i

izolirani su iz uzoraka ljudi, goveda, svinja i mesa. Serotipiziranje flagela - H antigena se izvodi samo u nekim laboratorijima i trenutna shema pokriva antigene 1 do 56, a tri od njih (H13, 22 i 50) su povučeni. Zbog svog kliničkog značaja, najčešće se primjenjuju antiserumi za određivanje H7 antigena za sojeve koji pripadaju serograpi *E. coli* O157. Prisutni kiseli polisaharidi kapsule (engl. Acidic Capsular Polysaccharide) su K antigeni i također se mogu koristiti za tipiziranje *E. coli*, iako se ova metoda rijetko primjenjuje na VTEC sojevima.

Veliki broj VTEC serotipova uključuje upotrebu grupnih O-antiseruma za rutinsku brzu i presumptivnu identifikaciju. Dostupni su i komercijalni "lateks kitovi" za najučestalije serogrupe, O157, O26, O91, O103, O111, O128, O145 i flagelarne antigene H7.

Kolonije koje ne fermentiraju sorbitol uglavnom se u rutini odmah aglutiniraju na prisutnost O157 somatskih antigena i/ili H7 flagelarnih antigena (ANON., 2004.b).

Samo određivanje pripadnosti istoj O serograpi ne može se uzeti kao indikator genetskih veza unutar *E. coli* (BAYLIS i sur., 2008.) pa isti serotip ne otkriva i zajedničko porijeklo.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Bakterija *E. coli* je stanovnik crijeva čovjeka i domaćih životinja, pa je njezina prisutnost u vodi i hrani pokazatelj fekalnog zagađenja. Neke od tih bakterija stvaraju verotoksine (verotoksigena *E. coli*; VTEC) i uzrokuju oboljenja ponekad i sa smrtnim ishodom. Školjkaši se hrane filtriranjem mora, te koncentriraju tvari iz okoline u organizmu. Zbog brojnih putova širenja VTEC iz zagađenog tla moguć je nalaz VTEC sojeva u moru i školjkašima. Kao hrana školjkaši su specifični te zbog načina njihovog konzumiranja moguća su otrovanja sa VTEC. Cilj ovoga rada je stoga istražiti po prvi put u Hrvatskoj prisutnost verotoksigene *E. coli* u školjkašima Istočne obale Jadrana.

U Hrvatskoj je kao i drugim zemljama EU u svrhu monitoringa proizvodnih područja školjkaša propisana obavezna pretraga na *E. coli* kao indikatora mogućeg zagađenja standardnom metodom ISO/TS 16649–3:2005. Kako VTEC obuhvaćaju oko 200 sojeva koji ne moraju imati jedinstvena kulturelna ni biokemijska svojstva, propisanom metodom za izolaciju *E. coli* u školjkašima nećemo detektirati izrazito patogen soj *E. coli* O157:H7. Zato je potrebno primjeniti više mikrobioloških metoda za izdvajanje različitih VTEC, uz imunološke ili molekularne metode za detekciju verotoksina ili njihovih gena. Stoga je u radu cilj bio i istražiti mogućnosti detekcije i izolacije VTEC kombinacijom propisane metode za brojanje  $\beta$ -glukuronidaza *E. coli* u školjkama i metode za izolaciju *E. coli* O157 u drugoj hrani, upotrebom imunoenzimske metode (ELISA) za otkrivanje verotoksina u fecesu, prilagođenoj uzorcima školjkaša. Izolati *E. coli* dobiveni gore spomenutim metodama sakupljani tijekom skoro tri godine, radi otkrivanja VTEC pretraživani su lančanom reakcijom polimeraze (PCR) za detekciju verotoksigenih gena. Potvrdom primjenjivosti metoda u radu na otkrivanje VTEC u školjkašima cilj je bio potvrditi mogućnost njihove primjene u rutinskim pretragama školjkaša za potrebe monitoringa proizvodnih područja školjkaša Hrvatske.

Količina *E. coli* u školjkašima varira ovisno o više čimbenika kao što su fluktuacije mora, godišnja doba, vremenske prilike, brojnost populacije ljudi i životinja u proizvodnom području, te fiziologija samih školjkaša, pa je cilj bio utvrditi povezanost razlika vrijednosti MPN *E. coli* u 100 grama školjkaša na pojavnost VTEC. Nadalje, u skladu s gore nabrojanim čimbenicima, krajnji cilj je bio provjeriti hipotezu o raširenosti VTEC u morskih školjkaša ovisno o utjecaju razlika između vrsta školjkaša i proizvodnih područja Istočne obale Jadrana te tako dati doprinos procjeni zdravstvene ispravnosti školjkaša u Hrvatskoj.

## 4. MATERIJAL I METODE

Korišteni postupci izdvajanja *E. coli* iz uzoraka školjkaša i ELISA postupak za dokaz verotoksina obogaćenjem školjkaša, razvijeni su u Laboratoriju za mikrobiologiju hrane i hrane za životinje Veterinarskog zavoda Split - VZS, Hrvatski veterinarski institut Zagreb – HVI. Pretraga pohranjenih izolata na prisutnost *stx* gena, PCR postupkom za identifikaciju VTEC obavljena je u Laboratoriju za bakterijske zoonoze i molekulske dijagnostiku bakterijskih bolesti, HVI. Serotipizacija VTEC obavljena je u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko - dalmatinske županije, te u Nacionalnom referentnom centru za salmonele i druge gram-negativne enteropatogene Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, Zagreb. Pokus dokazivanja mogućnosti unosa VTEC u organizam živih školjkaša u prirodnim uvjetima, filtriranjem mora zagađenog s *E. coli* O157:H7 obavljen je na Institutu za oceanografiju i ribarstvo Split – IZOR.

### 4.1. Podrijetlo uzoraka i uzorkovanje školjkaša

Naše istraživanje obavili smo na uzorcima morskih školjkaša uzorkovanih iz proizvodnih područja školjkaša dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana. Pravilnik o higijeni hrane životinjskog podrijetla (NN 99/2007, NN 45/11) definira proizvodno područje kao područje mora, ušća ili lagune na kojemu se nalaze prirodna staništa školjkaša ili područja za uzgoj školjkaša, a iz kojega se školjkaši sakupljaju ili izlovljavaju. Sveukupno smo pretražili 900 školjkaša sa zastupljenim svim vrstama školjkaša u Planu praćenja kvalitete mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša (NN 49/07, NN 91/08, NN 31/09, NN 37/10). Pretražena su 642 uzorka dagnji, 118 uzoraka prnjavica, 80 uzoraka kamenica, te 60 uzoraka kunjki.

#### Klasifikacija i nomenklatura školjkaša, Linnaeus, 1758

Carstvo	Animalia
Koljeno	Mollusca
Razred:	<i>Bivalvia</i> sinonimi; <i>Conchifera</i> , <i>Lamellibranciata</i> , <i>Pelecypoda</i>

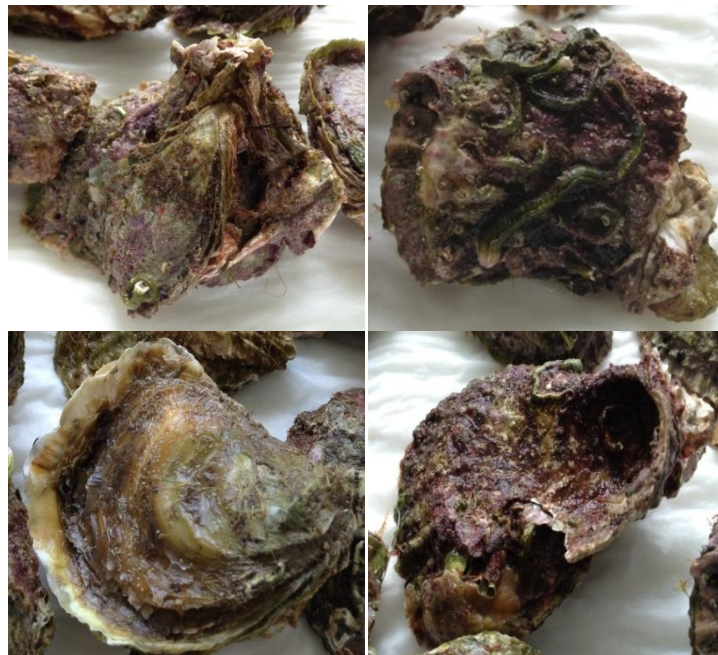
Školjkaši su žive životinje koje pripadaju koljenu mekušaca, razredu dvoljuskara. Četiri vrste školjkaša (taksonomski podaci provjereni u World Register of Marine Species - WoRMS, APPELTANS i sur., 2011.) koji se uzgajaju ili izlovljavaju u ovim područjima su:

- **dagnje**, lat. *Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819.; engl. mediterranean mussel; hrvatski sinonimi, dagna, daganja, daglja, datul, pedoć, pidoć, pizdica, mušula, mušulja, ušenak itd.



**Slika 3. Dagnje (foto: I. Listeš)**

- **kamenice** lat. *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758.; engl. common oyster; hrvatski sinonimi oštriga, ostriga, ostrega, oštrga, loštrga, loštriga, štroliga itd.



**Slika 4. Kamenice (foto: I. Listeš)**



- **prnjavice** lat. *Venus verrucosa*, Linnaeus, 1758.; engl. warty venu hrvatski sinonimi brbavica, kučica, dondola, grop, rovanica, ladinka itd.



**Slika 5. Prnjavice (foto: I. Listeš)**

- **kunjke** lat. *Arca noae*, Linnaeus, 1758.; engl. Noah's Ark shell; hrvatski sinonimi mušula, mušul, mošun, kunka, papak, unjka, pizdica, školjak, školjka



**Slika 6. Kunjke (foto: I. Listeš)**

Kunjke su izuzete iz pretrage na prisutnost VTEC zbog preliminarno utvrđene izrazito niske pojavnosti bakterije *E. coli* što je i jedan od razloga njihova isključenja iz plana monitoringa 2010. godine (NN 37/10), međutim uključene su u statističku obradu praćenja pojavnosti bakterije *E. coli* kao indikatora zagađenja s obzirom na vrste školjkaša.

## Uzorkovanje školjkaša

Školjkaši (n=900) pretraživani na prisutnost VTEC, uzorkovani su slučajnim odabirom u periodu od 9. mjeseca 2007. godine do 6. mjeseca 2010. godine, u svim godišnjim dobima, i iz razreda A i B, te iznimno C svih proizvodnih područja dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana.

Prema Pravilniku o službenim kontrolama hrane životinjskog podrijetla (NN 99/2007) Prilog II, Poglavlje II, točka A. Razvrstavanje proizvodnih područja i područja za ponovno polaganje, Ministarstvo poljoprivrede (MP) razvrstava proizvodna područja u kojima dopušta sakupljanje/izlovljavanje živih školjkaša u jedan od tri razreda ovisno o razini fekalnog onečišćenja odnosno razini zagađenja s bakterijom *E. coli*:

- razred A - područja u kojima živi školjkaši sadrže < 230 MPN *E. coli* na 100 g mesa i međuljušturine tekućine te se smiju sakupljati/izlovljavati izravno za prehranu ljudi,
- razred B - ona područja u kojima živi školjkaši ne smiju sadržavati više od 4600 MPN *E. coli* na 100 g mesa i međuljušturine tekućine, te se smiju sakupljati/izlovljavati za prehranu ljudi tek nakon ponovnog polaganja u području za prirodno pročišćavanje živih školjkaša ili obrade u centru za pročišćavanje,
- razred C - ona područja u kojima živi školjkaši ne smiju sadržavati više od 46000 MPN *E. coli* na 100 g mesa i međuljušturine tekućine, te se smiju sakupljati/izlovljavati za tržište tek nakon što su bili tijekom duljeg razdoblja ponovno položeni u području za prirodno pročišćavanje živih školjkaša.

Pri uzorkovanju školjkaša za provjeru mikrobiološke kvalitete poštivala su se sljedeća pravila iz Plana praćenja kvalitete mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša, NN 49/07 (dalje u tekstu Plan monitoringa).

- školjkaši koji se uzimaju za pretrage moraju biti komercijalne veličine,
- školjkaši uzgajani na vertikalnim linijama (pergolarima) i košarama, dagnje i kamenice, uzorkuju se s vrha, sredine i dna te se miješaju kako bi se dobio jedan reprezentativan uzorak od 2 kg. Na pojedinim točkama gdje se očekuje ili je dokazan različit utjecaj stupca morske vode, odnosno morskih struja na razinu fekalnog zagađenja, uzorkuje se s tri razine (vrh, sredina i dno) što čini 3 uzorka na istoj točki,
- uzorkovanje školjkaša koji žive na morskom dnu obavlja se specifičnim ribolovnim alatima povlačenjem po dnu, tako da kontrolna točka bude u sredini površine obuhvaćene povlačenjem. Ako se školjkaši izlovljavaju ronjenjem, moraju se sakupiti po morskom dnu u

radijusu najdalje 50 m od kontrolne točke određene koordinatama. Uzorak se kod oba načina sastoji od 2 kg školjkaša,

- ako nije odabrana indikatorska vrsta – ona vrsta školjkaša koja dokazano ima najveće MPN/100g vrijednosti na toj točki, uzimaju se uzorci od svake vrste u količini od 2 kg,

- nakon uzorkovanja školjkaši se pakiraju mrežice, i/ili u plastične vrećice tako da se spriječi vanjska kontaminacija. Potom se slažu u rashladnu kutiju sa rešetkama i slično, radi izbjegavanja međusobne kontaminacije eventualnim ispuštanjem međuljušturine tekućine (kamenice se upravo stoga pakiraju sa konkavnom stranom okrenutom gore),

- uzorkovani školjkaši se iz pojedinih proizvodnih područja u roku od 24 sata dopremaju u rashladnim sanducima u laboratorij na temperaturama nižim od temperature uzorkovanja, a u slučaju transporta dužeg od 4 sata, na temperaturama manjim od 8 °C,

Sve bakteriološke pretrage dostavljenih uzoraka obavljene su u Veterinarskom zavodu Split, Laboratorij za mikrobiologiju hrane i hrane za životinje.

Broj pretraženih uzoraka (n=900) je činio 70% uzoraka od ukupno pretraženih školjkaša Dalmacije po redovitim planovima monitoringa u istom periodu. Ostali rezultati pretraga kontinuirano uzorkovanih školjkaša Dalmacije prezentirani su i zasebno statistički obrađeni u svrhu praćenja *E. coli* kao indikatora zagađenja.

### **Točke uzorkovanja i proizvodna područja školjkaša dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana**

Točke na kojima se uzorkuju školjkaši određuju se tijekom sanitarnog nadzora kao mjesta s najvećim rizikom od fekalnog zagađenja ljudskog ili životinjskog podrijetla, unutar proizvodnog područja. Reizdanjima planova monitoringa došlo je do promjena naziva točaka i proizvodnih područja tijekom perioda našeg istraživanja, pa se za iste geografske koordinate ovdje navode nazivi iz Plana monitoringa za 2010. godinu, (NN 37/10). Točke iz proizvodnih područja koja su postojala na početku istraživanja, ali su isključena iz monitoringa dvije i više godina nisu dalje uzimane u statističku obradu u ovom radu, za razliku od točaka na kojima je promijenjena vrsta školjkaša, a nalaze se u proizvodnom području i/ili zoni koja je i dalje pod stalnim monitoringom. Proizvodna područja dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana u kojima se uzgajaju i izlovljavaju živi školjkaši podijeljena su na manje podjedinice - zone s pripadajućim točkama uzorkovanja, prikazana su u tablici 4.

**Tablica 4. Proizvodna područja školjkaša obuhvaćena istraživanjem .....**

Proizvodno područje	Zona	Točka uzorkovanja	Vrsta školjkaša
Uvala Dinjiška - Pag	*Uvala Dinjiška - Pag	Dinjiška M1	dagnje
Uvala Stara Poveljana - Pag	*Uvala Stara Poveljana - Pag	Stara Poveljana M1	dagnje
Modrič - Seline	*Modrič - Seline	Modrič - Seline M1	dagnje
***Pašmanski kanal	*Pašmanski kanal	Pašmanski kanal M1/M2	kunjke/prnjavice
Novigradsko more	*Novigradsko more	Novigradsko more M1	dagnje
Pirovački zaljev	*Pirovački zaljev	Pirovac M1	dagnje
Ušće rijeke Krke	Šibenik I	Šibenik I M1	dagnje
	Šibenik II	Šibenik II M2	dagnje
	Šibenik III	Šibenik III M3	dagnje
	Šibenik IV	Šibenik IV M4	dagnje
	Zaton	Zaton M5	dagnje
	Strmica	Strmica M6	dagnje
Kanal Sv. Ante u Šibeniku	*Kanal Sv. Ante u Šibeniku	Sv. Ante stara M1	dagnje
Marinski zaljev	*Marinski zaljev	Stipan Jaz M1	dagnje
Kaštelanski zaljev	Bene	Bene M1	**kunjke/prnjavice
	Slatine	Slatine M2	**kunjke/prnjavice
	Trogirski kanal	Trogirski kanal M3	**kunjke/prnjavice
	Mlinice	Mlinice M4	**kunjke/prnjavice
	Nehaj	Nehaj M5	**kunjke/prnjavice
	Kaštel Lukšić	Kaštel Lukšić M6	**kunjke/prnjavice
	Kaštel Gomilica	Kaštel Gomilica M7	**kunjke/prnjavice
Malostonski zaljev	Kuta	Kuta M1	dagnje
		Kuta M2	dagnje/ kamenice
	Mali Ston	Mali Ston M3	dagnje/ kamenice
		Mali Ston M4	dagnje
	Hodilje	Hodilje M5	dagnje
		Hodilje M6	dagnje
	Banje	Banje M7	dagnje
	Soca	Soca M8	dagnje
		Soca M9	dagnje
	Bistrina	Bistrina M10	dagnje/ kamenice
		Bistrina M11	dagnje
	Bjejevica	Bjejevica M12	dagnje
	Usko – Kanal	Usko – Kanal M13	dagnje
	Brijesta I	Brijesta I M14	dagnje/ **kamenice
	Brijesta II	Brijesta II M15	dagnje/ kamenice
	Kabli	Kabli M16	dagnje
	Blaževo	Blaževo M17	dagnje
	Sutvid	Sutvid M18	dagnje
	Sutvid	Sutvid M19	dagnje/ kamenice
*Malostonski zaljev	Maloston. zaljevM1	**kunjke/prnjavice	
Uvala Sobra - Mljet	*Uvala Sobra - Mljet	Sobra M1	dagnje

\*proizv. područje = zona; \*\*vrste školjkaša koje se više se ne uzorkuju po planu monitoringa iz 2010.; \*\*\*uzorkovano samo 2007.

U tablici 4 prikazana proizvodna područja poredana su po zemljopisnom položaju od sjeverozapada prema jugoistoku. Prema Planu monitoringa za 2010. godinu primijenjenom od 1.7.2010. godine u nekim područjima/zonama (oznaka\*\*) ukinuto je uzorkovanje određene vrste školjkaša, jer su za to područje izabrane one indikatorske vrste školjkaša koje su imale konstantno veće vrijednosti MPN *E. coli*/100g u preliminarnom razdoblju. Proizvodna područja dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana obuhvaćena istraživanjem odakle su uzorci (svih dvanaest) označena su na karti Hrvatske u Prilogu 1.

### **Opća načela postupka pretrage školjkaša**

U pretrazi školjkaša na nalaz bakterije VTEC korišteni su sljedeći postupci:

#### **a) Postupak izolacije i identifikacije bakterije *E. coli* sa "klasičnim" kulturnim postupcima**

**a.1) Metoda za brojanje i izolaciju  $\beta$ -glukuronidaza pozitivne *E. coli* pri 44 °C; standardna MPN metoda, ISO/TS 16649-3/2005** - Horizontalna metoda za brojenje glukuronidaza pozitivne *E. coli* - Dio 3: Postupak najvjerojatnijeg broja upotrebom 5-brom-4-klor-3-indol  $\beta$ -D- glukuronida (ANON., 2005.b)

#### **a.2) Metode za izolaciju $\beta$ -glukuronidaza negativne, presumptivne *E. coli* O157**

**Metoda 1.** modifikacija MPN metode za izolaciju  $\beta$ -glukuronidaza negativne *E. coli* na TBX agaru pri 41,5 °C

**Metoda 2.** kombinacija MPN metode i metode za izolaciju  $\beta$ -glukuronidaza negativne *E. coli* sa dodatnim obogaćenjem u mTSBN i izdvajanjem na kromogenom O157:H7 ID agaru

**Metoda 3.** metoda za izolaciju  $\beta$ -glukuronidaza negativne *E. coli* obogaćenjem u mTSBN i izdvajanjem na kromogenom O157:H7 ID agaru (i CT-SMAC agaru)

Korišteni postupci u bakteriološkoj pretrazi razvijeni su u Laboratoriju za mikrobiologiju hrane i hrane za životinje, Veterinarskog zavoda Split (S-2 VZS) kao rezultat dugogodišnjeg rada. Tri različite modificirane metode izolacije presumptivne *E. coli* O157 razvijane su u ovisnosti o dostupnosti hranjivih podloga u laboratoriju, te njihove prikladnosti za istovremenu upotrebu za utvrđivanje prisutnosti verotoksina ELISA metodom. Za potvrdu uspjeha izolacije VTEC i izbor najprimjerenijih hranjivih podloga i tehnike izdvajanja unutar same metode, ovi modificirani postupci verificirani su višekratno zagađenjem homogenata školjkaša i živih dagnji putem mora sa VTEC O157:H7.

### **b) Imunoenzimski test (ELISA) za utvrđivanje prisutnosti verotoksina**

Postupak je prilagođeni izvorni postupak za uzorke fecesa na uzorke hrane u postupku obogaćivanja. Ovaj postupak je također razvijen u laboratoriju S-2 VZS, te je verificiran umjetnim zagađenjem homogeniziranih uzoraka školjkaša i onečišćenjem živih dagnji sa VTEC O157:H7.

**c) Postupak lančane reakcije polimerazom (PCR) za utvrđivanje prisutnosti gena za verotoksine i dodatne virulentne faktore** u porastu glukuronidaza pozitivnih kultura *E. coli* na agaru i čistih sojeva bakterije *E. coli* izoliranih postupkom za izolaciju glukuronidaza negativne *E. coli* / presumptivne *E. coli* O157.

PCR pretraga obavljena je tijekom ovog istraživanja u laboratoriju za Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu, a postupak je verificiran sa VTEC O157:H7 i pohranjenom DNA sa traženim genima virulentnosti.

### **Priprema laboratorijskog i testnog uzorka**

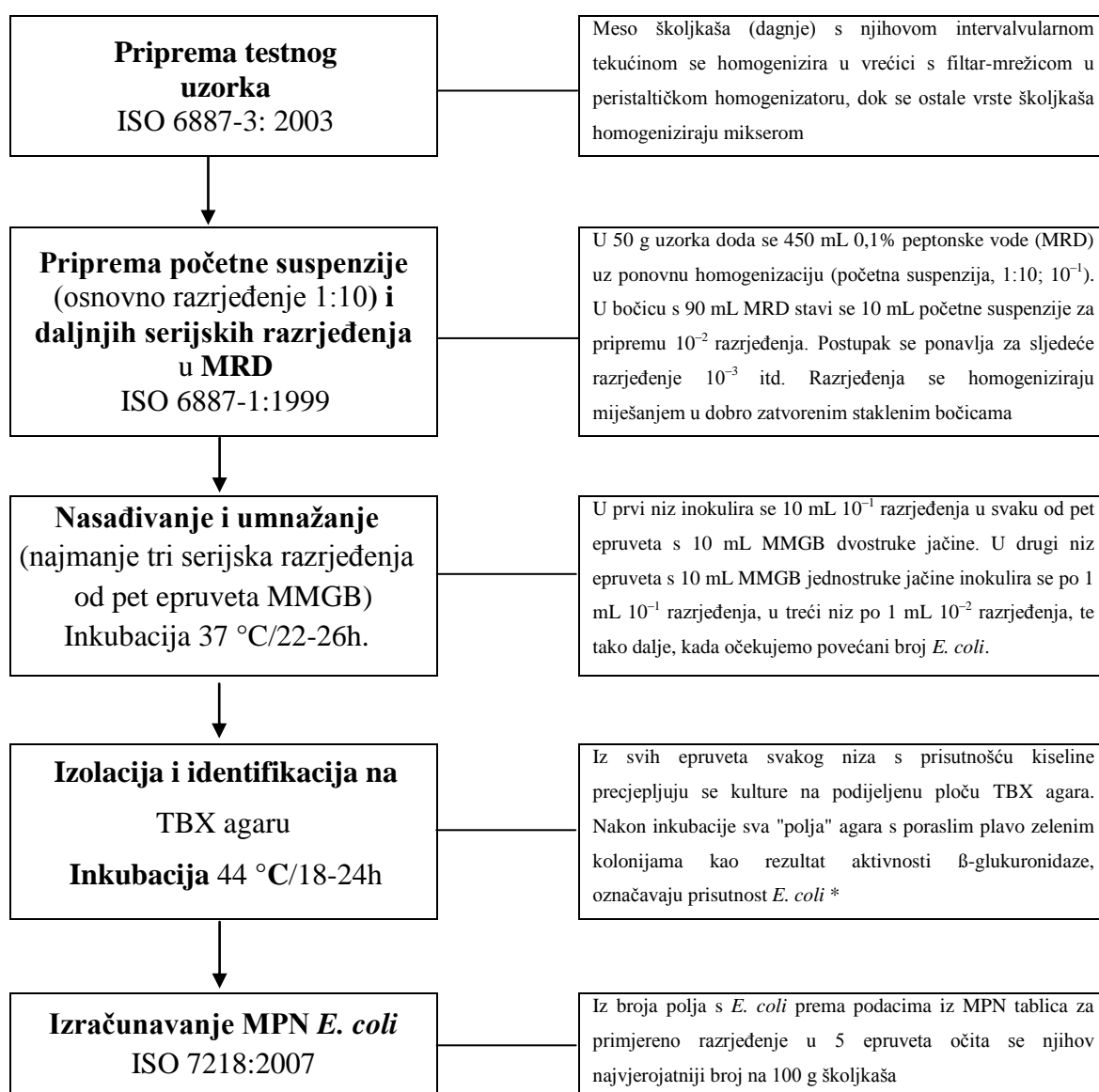
Uzorak predstavlja 2 kg školjkaša uzetih na propisani način, s točke uzorkovanja propisane planom monitoringa, a označen je imenom i brojem točke. Nakon dolaska u laboratorij uzorci se pohranjuju u hladnjak na  $3^{\circ} \pm 2^{\circ}$  C do trenutka testiranja, koje je započelo u roku 24 sata ili iznimno 48 sati od uzorkovanja. Zamrzavanje školjkaša za određivanje mikrobiološke kvalitete živih školjkaša nije dozvoljeno.

Laboratorijski uzorak predstavlja najmanje 15 dagnji, 10 kamenica/kunjki ili 30 prnjavica. Za pripremu homogeniziranog uzorka (testni uzorak) odbacuje se svaki otvoreni školjkaš i oni oštećene ljuštore. Ostali školjkaši se oribaju četkicom i isperu pod mlazom hladne tekuće vode provjerene kvalitete i osuše slaganjem na upijajući papir ili staničevinu. Školjkaši se otvaraju specijalnim sterilnim nožem i pri tom se sva tekućina prikuplja u izvaganu sterilnu posudu ili vrećicu za homogenizaciju, a meso se izreže i ostruže se sadržaj donje ljuštore. Težina očišćenih školjkaša varira ovisno o njihovoj veličini i međuljuštornoj tekućini. Radi pripreme što ujednačenijeg testnog uzorka nakon sakupljanja dovoljne količine uzorka (oko 250 g) u vrećici s filter-mrežicom sadržaj se homogenizira u peristaltičkom homogenizatoru (dagnje), dok se ostale vrste školjkaša homogeniziraju štapnim mikserom pulsirajućim pokretima u sterilnoj posudi. Nakon pripreme testnog uzorka slijedi priprema

osnovnog razrjeđenja s diluentima (početna suspenzija) ovisno o propisanoj ili odabranoj metodi ISO 6887-1:1999 (ANON., 1999.) i ISO 6887-3:2003 (ANON., 2003.a)

## 4.2. Postupci izolacije i identifikacije *E. coli*

### 4.2.1. Metoda za brojanje i izolaciju $\beta$ -glukuronidaza pozitivne *E. coli* (ISO/TS 16649-3/2005)



\*Tehnika nacjepljivanja s porastom  $\beta$ -glukuronidaza pozitivne *E. coli* na TBX agar prikazan je na slici 18.

**Shema 1.** Metoda ISO/TS 16649-3/2005 za brojanje i izolaciju  $\beta$ -glukuronidaza pozitivne *E. coli* pri 44 °C u uzorcima školjkaša (ANON., 2005.b)

Opća načela pretrage se zasnivaju na oživljavanju eventualno oštećenih bakterija *E. coli* u diluentu za oporavak - MRD (Maximum recovery diluent, Biolife Italiana) uz umnažanje u epruvetama serijskih razrjeđenja modificiranog mineralnog glutamatnog bujona - MMGB, (Glutamate Selective Broth, Biokar Diagnostics, France). Broj *E. coli* se određuje očitavanjem najvjerojatnijeg broja mikroorganizama (MPN) izolacijom na kromogenom tripton žučnom glukuronid agaru - TBX, (Tryptone bile X-GLUC agar, Biolife Italiana) iz niza serijskih razrjeđenja od pet epruveta iz tablica norme ISO 7218:2007, (ANON., 2007c).

#### **4.2.2. Metode za izolaciju $\beta$ -glukuronidaza negativne *E. coli***

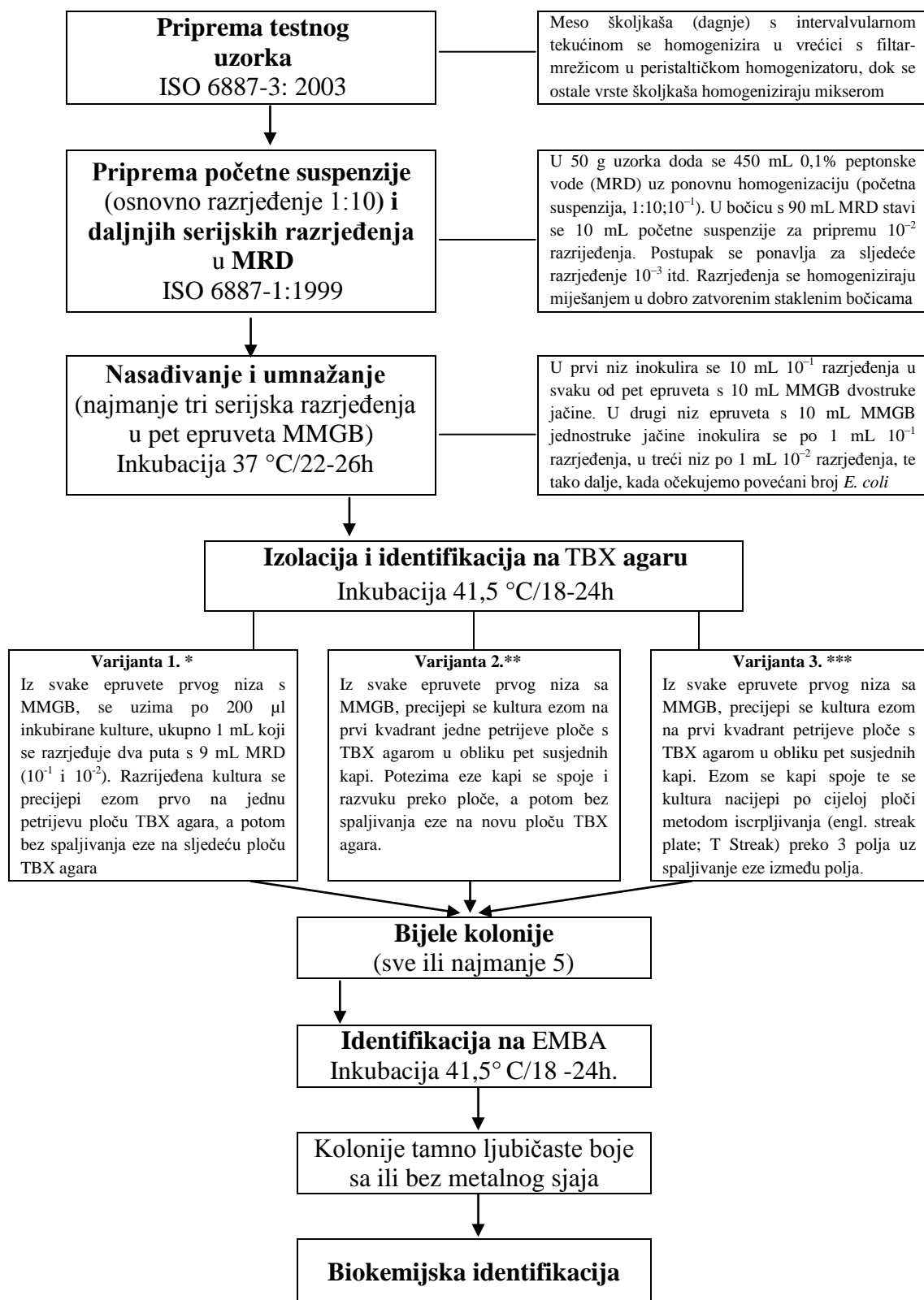
Kroz trogodišnji period istraživanja korištene su tri metode s istim ciljem izolacije kolonija morfoloških karakteristika presumptivnih VTEC sojeva,  $\beta$ -glukuronidaza negativne *E. coli* O157:H7

Zbog mogućeg pregustog rasta miješane bakterijske kulture i/ili prerastanja neciljanog mikroorganizma preko ploča selektivnih agara, te zbog mogućnosti da ciljani mikroorganizmi ne budu prisutni u volumenu koji se naciepljuje na ploču u količini dostatnoj za izolaciju, usporedili smo više tehnika (varijante) naciepljivanja bujonskih kultura na ploče izabranih agara, za svaku metodu. Školjkaši uzorkovani po redovnom monitoringu dalje su pretraživani najprimjerenijim postupcima.

#### **Metoda 1. Modifikacija ISO/TS 16649-3 MPN metode za izolaciju $\beta$ -glukuronidaza negativne *E. coli* na TBX agaru inkubacijom pri 41,5 °C**

Opća načela pretrage se zasnivaju iskorištenju početne suspenzije i umnažanja svih *E. coli* (bez obzira na biokemijske karakteristike) u MMGB kao dijela standardne MPN metode, uz izdvajanje na propisanom TBX agaru uz modifikaciju temperature inkubacije sa 44 °C na 41,5 °C za osjetljive *E. coli* O157:H7. Porasle bijele  $\beta$ -glukuronidaza negativne kolonije precjepljuju se na EMBA agar (Eo. Me. Blue Agar w/lactose and sucrose, Biolife Italiana) za presumptivnu identifikaciju bakterija *E. coli*. Pogodnost ove metode je korištenje prve faze standardne metode ISO/TS 16649 - 3 / 2005 iz redovne rutinske pretrage školjkaša u bujonu bez žučnih soli i antibiotika kao mogućih inhibitora, bez dodatne homogenizacije uzorka uz ekonomski aspekt korištenja postojećih hranjivih medija i bez uvođenja novih skupljih podloga.





\* Varijanta 1 prikazana je na slici 10.

\*\* Varijanta 2 prikazana je na slici 11.

\*\*\*Varijanta 3 prikazana je na slici 11.

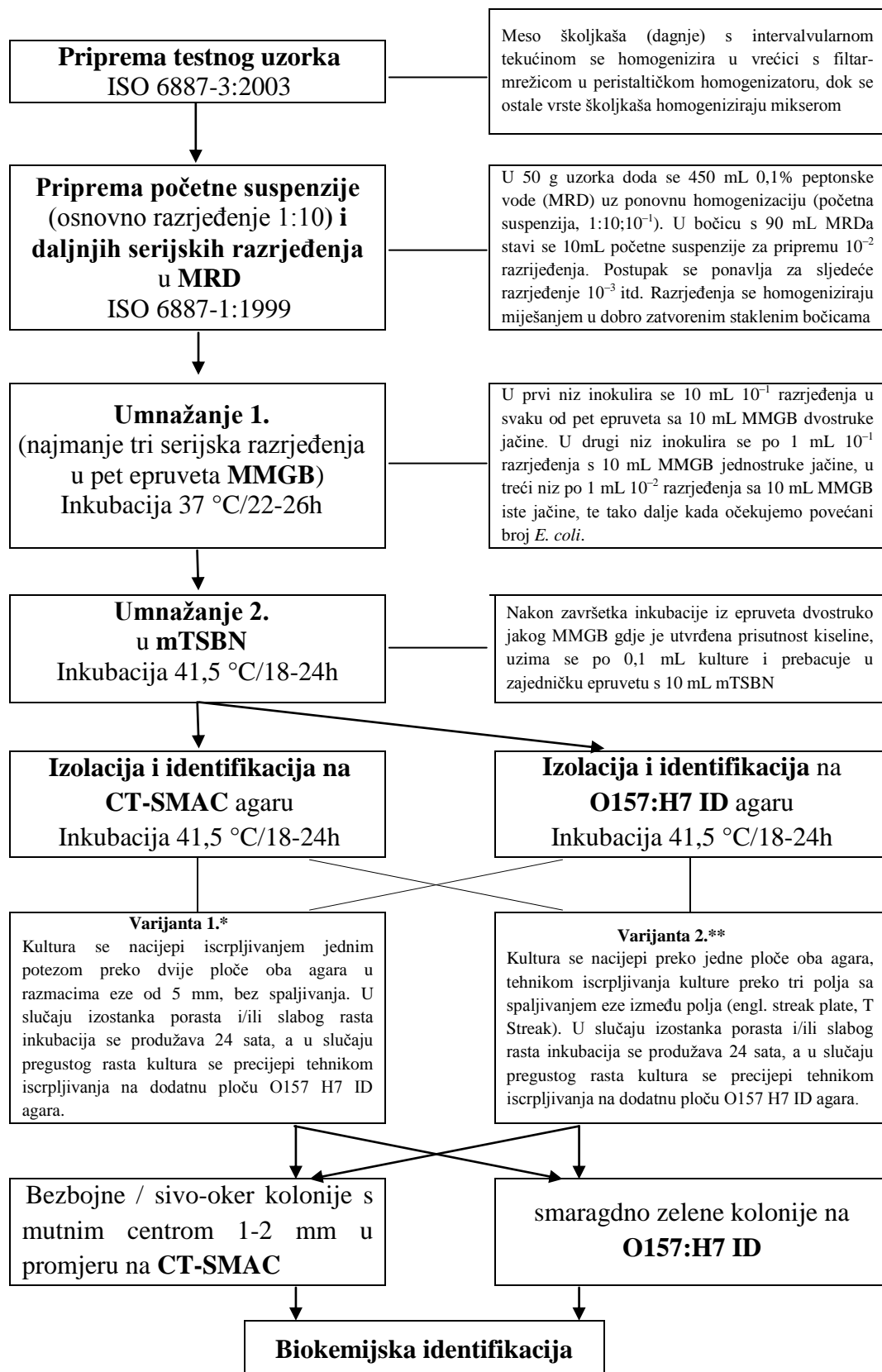
**Schema 2.** Metoda 1. Modifikacija ISO/TS 16649-3 MPN metode za izolaciju β-glukuronidaza negativne *E. coli* na TBX agaru uz inkubaciju pri 41,5 °C

## **Metoda 2. Kombinacija MPN metode i metode za izolaciju $\beta$ -glukuronidaza negativne *E. coli* s dodatnim obogaćenjem u mTSBN i izdvajanjem na O157:H7 ID agaru**

Opća načela pretrage se zasnivaju na korištenju početne suspenzije i umnažanja *E. coli* u MMGB kao dijela standardne MPN metode, uz dodatak drugog po redu bujona (Tryptic soy broth modified, mTSB, Biolife Italiana), mTSBN - modificirani tripton soja bujona s dodatkom novobiocina završne koncentracije 20 mg/L, za selektivno umnažanje *E. coli* O157:H7.

Izdvajanje se zasniva na otkrivanju  $\beta$ -glukuronidaza negativnih kolonija na kromogenom agaru O157:H7 ID (O157:H7 - ID medium / O157:H7 ID - F, BioMerieux, SA, France). Za početnu kontrolu metode istovremeno se koristi uobičajeni Cefiksim-Telurit-Sorbitol MacConkey agar - CT-SMAC (SMAC-CT agar, BioMerieux, SA, France) za izdvajanje sorbitol negativnih kolonija. Agar O157:H7 ID sadrži mješavinu ugljikohidrata i dvije kromogene tvari za otkrivanje enzimske aktivnosti  $\beta$ -galaktozidaze prisutne u gotovo svim sojevima *E. coli* bez obzira na njihov serotip i  $\beta$ -glukuronidaze prisutne u gotovo svim *E. coli* non-O157. Serotip *E. coli* O157:H7 na ovom mediju raste kao dobro vidljive smaragdno zelene kolonije između kolonija ostalih sojeva koje su bezbojne, ružičaste, tamno ljubičasto-modre do purpurno-crvene. Na CT-SMAC agaru kolonije koje fermentiraju sorbitol su ružičasto do crvene boje, a tipične kolonije O157:H7 koje ne fermentiraju sorbitol su bezbojne ili neutralne-sivo-okker boje s mutnim centrom 1-2 mm u promjeru.

Pogodnost ove metode je korištenje prve faze standardne metode (ISO/TS 16649 - 3 / 2005, ANON., 2005.b) iz redovne rutinske pretrage školjkaša u bujonu bez žučnih soli i antibiotika kao mogućih inhibitora, bez dodatne homogenizacije uzorka. Utrošak drugog po redu bujona mTSBN samo je 10mL po uzorku, ali je ukupno vrijeme izolacije produženo za 24 sata radi inkubacije dva bujona.

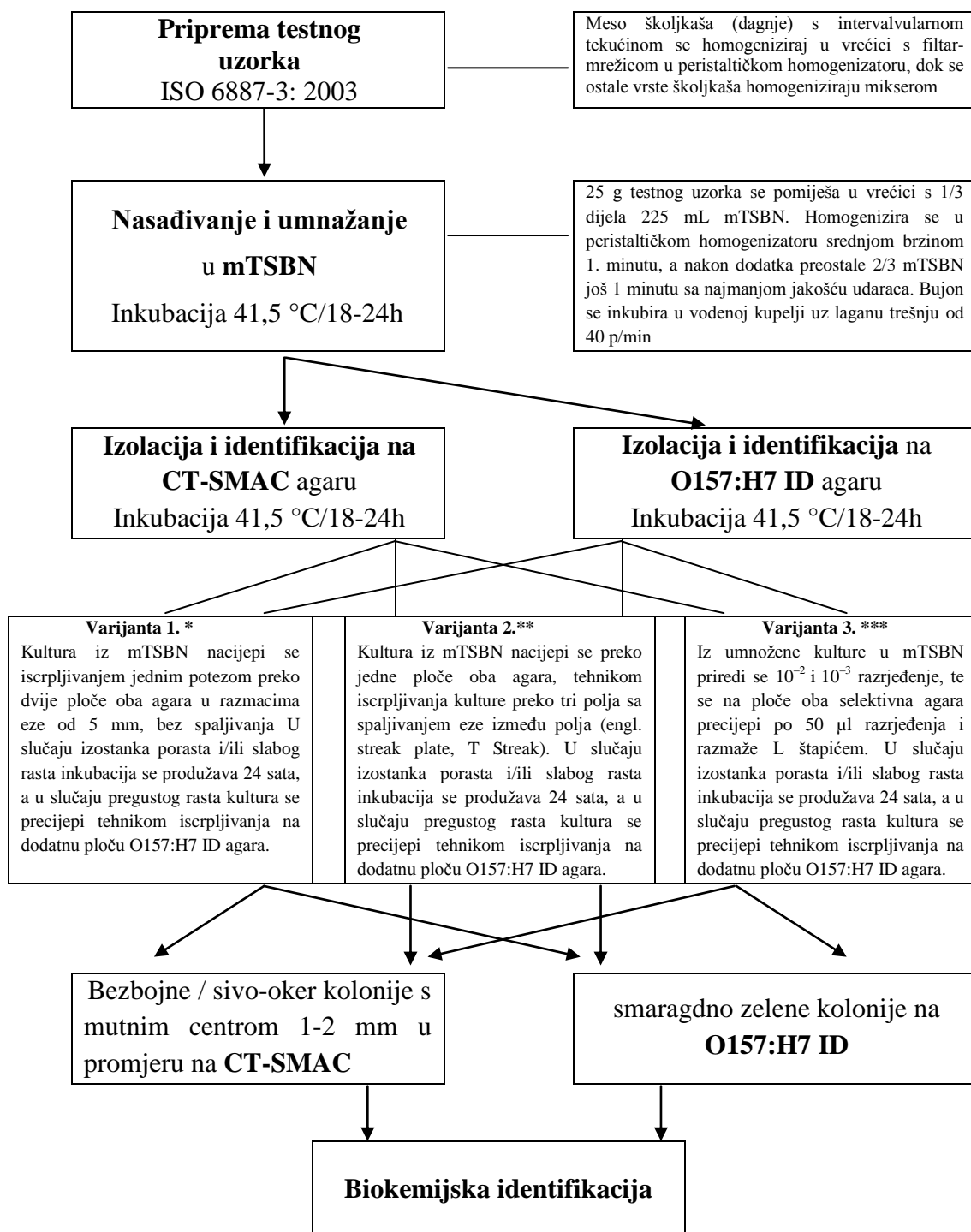


\* Varijanta 1 prikazana je na slici 13.

\*\*Varijanta 2 prikazana je na slici 12.

**Shema 3.** Metoda 2. Kombinacija MPN metode i metode za izolaciju β-glukuronidaza negativne *E. coli* sa dodatnim obogaćenjem u mTSBN i izdvajanjem na O157:H7 ID agaru

**Metoda 3. Metoda za izolaciju  $\beta$ -glukuronidaza negativne *E. coli* obogaćenjem u mTSBN i izdvajanjem na O157:H7 ID (i CT-SMAC agaru)**



\* Varijanta 1 prikazana je na slikama 14 -16.

\*\* Varijanta 2 prikazana je na slikama 14 -16.

\*\*\*Varijanta 3 prikazana je na slikama 14 -16.

**Shema 4. Metoda 3. Metoda za izolaciju  $\beta$ -glukuronidaza negativne *E. coli* obogaćenjem u mTSBN i izdvajanjem na O157:H7 ID (i CT-SMAC agaru)**

Metoda 3. se zasniva na općem principu umnažanja bakterije *E. coli* O157 po standardnoj proceduri ISO 16654:2001 uz izdvajanje β-glukuronidaza negativnih *E. coli* na kromogenom agaru (bez imunomagnetske separacije primjenjive samo za *E. coli* O157:H7) i početnu usporedbu na propisanom CT-SMAC agaru. Za izbor najprikladnije tehnike izdvajanja kolonija na pločama agara uspoređeno je više varijanti izolacije preporučenom po BAM (Bacteriological analytical manual) protokolu (FENG i WEAGANT, 2002.; 2009.).

Princip djelovanja selektivnog umnažanja *E. coli* O157 u mTSBN i izdvajanja β-glukuronidaza i sorbitol negativnih kolonija na CT-SMAC agaru i O157:H7 ID agaru opisan je u prethodnoj metodi 2.

Svrha i pogodnost ove metode je istovremeno korištenje obogaćene kulture *E. coli* u mTSBN bujonu za dvije metode, izolaciju i identifikaciju presumptivne VTEC O157 (i drugih β-glukuronidaza negativnih *E. coli*), "klasičnim" mikrobiološkim postupkom naciepljivanja ploče agara, te dokaz prisutnosti verotoksina ELISA metodom u uzorcima školjkaša. Stoga je ova metoda korištena istovremeno s pretragom školjkaša na prisutnost verotoksina u periodu od 2009. godine pa do kraja istraživanja.

### Biokemijska identifikacija β-glukuronidaza negativnih izolata

Sve karakteristične β-glukuronidaza i sorbitol negativne kolonije presumptivne *E. coli* O157 izolirane pomoću navedenih metoda, se precijepu na neselektivni agar (najčešće krvni agar radi provjere čistoće kulture) i inkubiraju se na 37 °C/24sata. Odabere se najmanje 10 sumnjivih kolonija ili sve ako ih je manje, te se identificiraju „malim biokemijskim nizom“ - indol, metilensko crvenilo, Voges-Proscaur i citrat, tvz. IMViC test.

**Tablica 5.** Tumačenje IMViC testa

TEST	POZITIVNO	NEGATIVNO	<i>E. COLI</i>
Indol	ružičasto-crveni prsten	žuti prsten	+
Metilensko crvenilo	narančasto-crveno	žuto-narančasto	+
Voges-Proscaur	roza - crveno	bez vidljive promjene (oker-smeđe)	-
Citrat	plavo	bez vidljive promjene (zeleno)	-

Pri biokemijskoj determinaciji korištene su hranjive podloge i reagensi Biolife, Italija. Tipične reakcije su kao i kod svih *E. coli*. U slučaju potvrdne (ili sumnjive) biokemijske identifikacije presumptivne *E. coli* O157 kolonije se dodatno identificiraju na minijaturnom biokemijskom sistemu - API 20 E strip (Biomeriaux). Kulture koje daju uzorak po redosljedu slova IMViC: +++- i/ili kombinacije biokemijskih reakcija na API 20 E strip koje se po uputi proizvođača očitavaju kao „dobra identifikacija“, smatraju se potvrđene *E. coli* (biotip 1).

### **Presumptivna serološka identifikacija *E. coli* O157:H7**

Morfološki tipične kolonije bakterije *E. coli* O157 i biokemijski potvrđene kao *E. coli* potvrđivane su komercijalnim antiserum aglutinacijskim testom, Prolex *E. coli* O157:H7 latex test reagent kit (ProLab diagnostics, Canada). Izolati se prethodno precjepljuju na krvni agar radi indukcije pokretljivosti. Za test se uzimaju pojedinačne dobro izolirane kolonije, radi izbjegavanja lažno pozitivnih reakcija pretjeranom količinom kulture uz prethodnu provjeru samoaglutinacije. Bakterije biokemijski potvrđene kao *E. coli* i koje su pokazale aglutinaciju na predmetnici s antiserumom za O157:H7 smatraju se potvrđen serotip *E. coli* O157:H7.

### **Izbor i pohrana kolonija bakterija *E. coli* za PCR**

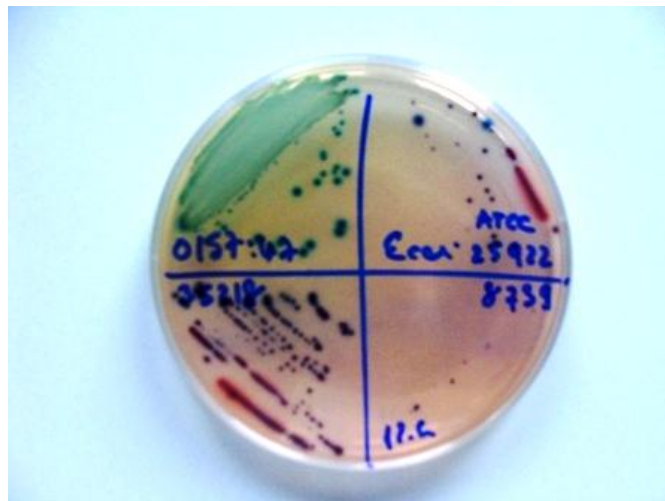
Sve izolirane bakterije iz uzoraka školjkaša potvrđene kao *E. coli*, različitih morfoloških i biokemijskih svojstava, bez obzira na rezultat presumptivne serološke identifikacije, pohranjuju se na agar za konzerviranje, dalje u tekstu STOCK (Stock Culture Agar, BIO-RAD, USA) za provjeru svog toksigenog potencijala odnosno prisustva gena virulentnosti postupkom PCR-a.

#### **4.2.3. Postupak verifikacije metoda izolacije $\beta$ -glukuronidaza negativne *E. coli* sa VTEC O157:H7**

Verifikacija metoda je provjerena umjetnom kontaminacijom uzoraka školjkaša kroz više faza. Prva faza je izbor najbolje tehnike nacjepljivanja umnožene kulture presumptivne  $\beta$ -glukuronidaza negativne [ $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* (verotoksigena *E. coli* O157:H7)] na ploče agara unutar pojedine metode. Druga faza je bila provjera primjenjivosti i određivanje osjetljivosti

metoda različitim odnosom razine zagađenja s verotoksigenom *E. coli* O157:H7 sa znatno višim količinama dodane neciljane *E. coli* non-O157, uz prirodnu mikrofloru školjkaša.

Karakteristike rasta hranjivih podloga, prikladnost opisanih metoda u ovom radu i prilagodba postupaka, provjeravani su i potvrđeni s tri soja *E. coli*  $\beta$ -GLUC(+) i sorbitol pozitivnih (tablica 6): ATCC 8739, 25922, 35218 (dalje u tekstu *E. coli* non-O157). Kao  $\beta$ -galaktozidaza pozitivni -  $\beta$ -GAL(+), a  $\beta$ -GLUC(-) i sorbitol negativni soj, korišten je verotoksigeni *E. coli* O157:H7 (VTEC O157:H7) laboratorijski soj IZS Teramo, Italija (ISS 32 M/00B, liofilizirana kultura 07.05.04) (slika 7).



**Slika 7.** *E. coli* O157:H7 i različiti ATCC sojevi *E. coli* na O157:H7 ID agaru (foto: I. Listeš)

**Tablica 6.** Sojevi korišteni u verifikaciji metoda

Soj <i>E. coli</i>	$\beta$ -glukuronidaza	sorbitol	IMViC tip	<i>Stx</i> geni/toksin
<i>E. coli</i> non-O157				
ATCC 8739	+	+	++-	-
ATCC 25922	+	+	+++	-
ATCC 35218	+	+	+++	-
<i>E. coli</i> O157:H7 ISS 32 M/00B	-	-	+++	+

Očekivane koncentracije naciepljenih bakterija *E. coli* O157:H7 i *E. coli* non-O157 određene su metodom brojanja kolonija na ploči, iz 1 mL korištenih razrjeđenja početne suspenzije mikroorganizama, metodom prelijevanja neselektivnim agarom uz inkubaciju pri temperaturi od 37 °C/24 sata. Broj naciepljenih mikroorganizama izražen je ovisno o količini

korištene suspenzije i metodi koja se verificira kao broj kolonija u određenoj količini školjkaša.

Za kontrolu stvarno prisutne količine prirodne ili dodane  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* u uzorcima školjkaša, broj bakterija je određen standardnom MPN metodom (opisana u ovom poglavlju, tč. 4.2.1.). Stvarno prisutna količina dodane  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7 u uzorcima školjkaša određena je istom MPN metodom 5 epruveta, modificiranom dodatkom kromogenog O157:H7 ID agara uz prilagođenu temperaturu inkubacije od 41,5 °C. Uvrštavanjem broja polja selektivnih agara s vidljivim porastom specifičnih kolonija u MPN tablice procedure ISO 7218:2007 (ANON., 2007.c) određen je broj  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* i *E. coli* O157:H7 u školjkašima.

### **Izbor tehnika (varijanti) nacjepljivanja bujonske kulture na ploče agara**

Verifikacija metoda izolacije VTEC O157:H7 je u prvoj fazi obuhvatila određivanje najprikladnije količine inokuluma i same tehnike nacjepljivanja i/ili iscrpljivanja kulture na određene vrste agara koje će omogućiti izdvajanje dobro uočljivih kolonija, tipičnih karakteristika rasta među ostalim kultiviranim mikroorganizmima.

Za verifikaciju najboljeg postupka metode 1 izdvajanja  $\beta$ -GLUC(-) kolonija na TBX agaru iz MPN metode i metode 2 izdvajanja  $\beta$ -GLUC(-) kolonija kombinacijom MPN metode i obogaćenjem u mTSBN na CT-SMAC i O157:H7 ID agaru, homogeniziran je uzorak školjkaša s prethodno utvrđenim <20 MPN *E. coli*/100g. Homogenat školjkaša u količini od 50 g u 450 mL MRD nacijepljen je suspenzijom *E. coli* O157:H7 i mješavinom tri prije spomenuta  $\beta$ -GLUC(+) ATCC soja *E. coli* koji predstavljaju kompetitivnu mikrofloru, u završnoj koncentraciji od 50 CFU *E. coli* O157:H7 / 70 CFU  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* u 100 g školjkaša. Količina dodanih bakterija je verificirana određivanjem očekivane koncentracije nacijepljenih mikroorganizama u 100 g školjkaša brojanjem kolonija u pripremljenoj suspenziji, s usporedbom stvarnog broja ciljanih bakterija u školjkašima primjenom standardne MPN metode na TBX agaru uz dodatak O157:H7 ID agaru pri 41,5 °C .

Za verifikaciju najbolje tehnike metode 3, izdvajanja pojedinačnih  $\beta$ -GLUC(-) kolonija bakterije *E. coli*, na krutim podlogama O157:H7 ID i CT-SMAC agaru nakon umnažanja u mTSBN bujonu upotrijebljen je također homogenizirani uzorak školjkaša s <20 MPN *E. coli*/100g. Tri poduzorka od 25 g homogenata mesa i intervalvularne tekućine u 225 mL mTSBN su zasebno umjetno onečišćena različitim brojem *E. coli* O157:H7 (6; 12,5 i 25



CFU/25g školjkaša) i mješavinom tri ATCC soja *E. coli* (završna koncentracija 15 i 27,5 CFU/25g školjkaša). Tako su dobiveni različiti odnosi  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* i  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7 u uzorcima izraženo kao CFU/g školjkaša (slike 14-16).

### **Provjera osjetljivosti metoda za izdvajanje $\beta$ -glukuronidaza negativne *E. coli* različitim razinama zagađenja sa VTEC O157:H7**

Druga faza verifikacije metoda je bila provjera primjenjivosti i osjetljivosti cijelog postupka s izabranom tehnikom naciepljivanja, umjetnim zagađenjem uzoraka školjkaša ciljanim mikroorganizmom (VTEC O157:H7) i razinom kompetitivne mikroflore i do 200 puta više od ciljane VTEC. Pripremljena su dva homogenata uzoraka školjkaša, prvi bez bakterija *E. coli* non-O157 (<20 MPN *E. coli*/100g tj. manje od razine detekcije) te drugi s razinom umjetnog zagađenja 5400 MPN  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli*/100g. Oba uzorka su potom umjetno kontaminirana s tri različite količine *E. coli* O157:H7 ( $\beta$ -GLUC(-)). Korištena razrjeđenja ( $10^{-6}$ – $10^{-8}$ ) kulture *E. coli* O157:H7 (inkubirana u PPV 37 °C/18h) koja su dodana u homogenate školjkaša, uz izračunate koncentracije naciepljenih bakterija i postignute pripadajuće MPN vrijednosti u 100 grama zagađenih školjkaša, navedene su u tablici 11. Najvjerojatniji broj *E. coli* O157:H7 i *E. coli* non-O157 u 100 grama školjkaša određen je opisanim MPN metodama u ovom poglavlju, tč. 4.2.3. Metoda 3 čija se faza umnažanja koristi za ELISA metodu provjerena je dvokratno uz spomenuti ELISA test na uzorcima s prirodno prisutnom *E. coli* u količini od 1100 - 5400 MPN *E. coli*/100 g (tablica 13 i 14). Završna potvrda mogućnosti izdvajanja  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* (O157:H7) metodama izabranima u radu, provjerena je na uzorcima živih školjkaša prirodno onečišćenima filtracijom morske vode zagađene s VTEC O157:H7.

### **4.3. Imunoenzimski test – ELISA**

To je najčešći test koji se koristi u brzom detekciji patogena. Iako je većina testova specifično razvijena za detekciju verotoksina (Stx) u kliničkim uzorcima (feces), većina se uspješno može koristiti za hranu koristeći prikladno obogaćenje i proceduru za ekstrakciju toksina. Za povećanje osjetljivosti i specifičnosti, test se izvodi na kulturi inkubiranoj u bujonu. Ovi imunološki testovi predstavljaju veliki napredak jer omogućavaju otkrivanje i VTEC O157 i non-O157 za razliku od tradicionalnih metoda ili drugih metoda van dosega većine rutinskih laboratorija, pa su i najekonomičniji način za rješavanje ovog problema.

Općenito toksin ELISA test ima sposobnost detekcije svih VTEC sojeva. Imunoenzimski test je jednostavna metoda za direktnu detekciju verotoksina *E. coli* O157 i/ili *E. coli* non-O157 u uzorcima.

### **Načela postupka**

Obično se reakcija odvija u četiri faze. Reakcija se temelji na vezanju specifičnih antitijela za verotoksine. Nakon faze ispiranja dodaje se drugi set antitijela konjugiranih s enzimima, koji sada drže Stx u sendviču između dva seta antitijela. Nakon kratke inkubacije i ispiranja, dodaju se enzimski supstrat i kromogen, koji daju plavu ili žutu boju, čiji je intenzitet nakon kratke inkubacije u mraku proporcionalan količini prisutnog Stx u izvornom uzorku. Intenzitet boje u mikrotitarskoj pločici određuje se spektrofotometrom što određuje pozitivan ili negativan rezultat. Kao enzimski imuni test korišten je test Verotoksin Antigen ELISA za determinaciju verotoksina 1 i 2 (Verotoxin Antigen, 6006, Generic Assays), primarno namijenjen za uzorke fecesa.

Verotoxin Antigen 6006 je brzi enzimometrijski imuno test za kvalitativno određivanje oba verotoksina koji zauzimaju poliklonske čvrste imobilizirane faze i monoklonska biotinom obilježena antitijela na verotoksin 1 i verotoksin 2.

Proizvođač predviđa upotrebu testa bez i sa obogaćivanjem, ali radi povećanja osjetljivosti metode preporuča obogaćivanje 1g uzorka u 10 mL bujona (mTSBN ili EHEC bujonu i sl.) s inkubacijom 18-24 sata/41,5 °C. Nakon toga ako je potrebno plutajuće čestice se sedimentiraju centrifugiranjem 10 minuta pri maksimalnoj brzini. Za test se tada uzima supernatant bez daljnjeg razrjeđenja.

### **Opis postupka**

Prva faza postupka je prilagodba uzorka inkubacijom i obogaćivanjem uzorka preko noći u mTSBN bujonu radi povećanja osjetljivosti metode, odnosno smanjenja utjecaja nepoznate vrste uzorka za ovu metodu i razrjeđivanja mogućih inhibitora u školjkašima.

Za ovu fazu koristi se inkubirana kultura prema metodi 3. Početna količina uzorka bila je 25 puta veća od preporučenog 1 grama (iz rutinske pretrage školjkaša ostane dostatno homogenata) da bi se još više povisila osjetljivost tj. mogućnost detekcije verotoksina umnažanjem inicijalno veće količine moguće verotoksigene *E. coli*.

Nakon inkubacije, uzima se 10 mL gornjeg sloja obogaćene kulture iz vrećice unutar filtra, koji se dvokratno centrifugira u epruveti na 3000 o/min, da se odvoje moguće plutajuće čestice. Za sam ELISA test uzima se supernatant u količini od 100 $\mu$ L.

Druga faza je izvođenje testa za kvalitativno očitavanje prisutnosti verotoksina 1 i/ili 2, koje se temelji na vezanju bilo koje vrste verotoksina na prisutna antitijela;

- Nakon što se svi reagensi nježno promiješaju i temperiraju, na sobnoj temperaturi kao i mikropločica, stavlja se po 100  $\mu$ L supernatanta obogaćene kulture uzorka u svaku jažicu. Paralelno sa svakim izvođenjem testa stavlja se po 3 kapi pozitivne i negativne kontrole, pa čak i ako se pretražuje samo jedan uzorak.
- Za vrijeme inkubacije od 60 minuta na 22-25°C verotoksin iz uzoraka i pozitivna kontrola reagiraju s poliklonalnim antiverotoksin protutijelima koja su čvrsto obložena na jažice mikroploče, nakon toga sadržaj jažica se istrese, a materijal koje se nije vezao do kraja se uklanja ispiranjem 6 puta sa 270  $\mu$ L, puferom razrijeđenim 1:10.
- Zatim se dodaju po 3 kapi biotin konjugiranih monoklonskih antitijela (obilježena) sa kojima verotoksin specifično reagira. Inkubira se 30 min pri 22-25°C, nakon toga sadržaj jažica se istrese, a ne-vezani materijal od čvrste faze formiranog imunog kompleksa se do kraja uklanja ispiranjem 6 puta, sa 270  $\mu$ l pufera razrijeđenog 1:10.
- Sljedeća faza je dodatak 3 kapi streptavidina sjedinjenog sa HRP peroksidazom (engl. horseradish peroxidase) koji prepoznaje biotinom obilježena antitijela. Inkubira se 30 min na 22-25°C, istrese sadržaj i ispere na uobičajeni način.
- Zatim se doda 3 kapi bezbojnog supstrata sa 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB), koji HRP pretvara u plavo obojeni produkt. Inkubira se 15 min na 22-25°C zaštićeno od svjetla.
- Enzimska reakcija se zatim zaustavi dodatkom kisele otopine u jažice, što mijenja plave boju u žutu, te se pločica očitava u roku od 30 min.
- Optička gustoća (OG) otopine očita se za optimalne rezultate pri 450 nm valne duljine nasuprot referentnom filtru od 620 nm, što je izravno proporcionalno iznosu sume verotoksina.

S obzirom na graničnu vrijednost (engl. CUT-OFF) rezultati se interpretiraju kao pozitivni ili negativni. Način određivanja granične vrijednosti i primjer navedeni su u tablicama 7 i 8.

**Tablica 7.** Određivanje „cut-off“ vrijednosti

<b>Granična vrijednost</b>	
(OG negativne kontrole + 0.2 OG jedinice)	
<b>Verotoksin antigen</b>	
NEGATIVNO	≤ granična vrijednost
POZITIVNO	> granična vrijednost

**Tablica 8.** Primjer tipičnih rezultata testa po uputi Verotoxin Antigen, 6006, Generic Assays

Jažice	OD (a)	OD (b)	OD (sred. vrijed.)
Negativna kontrola	0,088	0,094	0,091
Pozitivna kontrola	2,916	2,934	2,925
<b>POZITIVNO</b>	<b>&gt;0,091 + 0,200</b>		<b>= 0,291</b>
Uzorak 1	2,022	2,086	2,054 - POZITIVNO
Uzorak 2	0,218	0,226	0,222 - NEGATIVNO

Specifičnost ovog postupka kojeg je odredio proizvođač na obogaćenim kulturama je 98,8%, a osjetljivost 84,6% nasuprot testa citotoksičnosti na verostanicama.

#### 4.3.1. Verifikacija ELISA metode

Metoda je provjerena u više faza.

Prva faza je izbor najprikladnijeg postupka za dokazivanje prisutnosti verotoksina u obogaćenim kulturama uzoraka u ovisnosti o upotrebi različitih bujona klasičnih metoda izolacije (metode 2 i 3), različitih razina zagađenja uzoraka školjkaša s VTEC O157:H7 i različitim odnosima prirodnog i umjetnog zagađenja sa kompetitivnom mikroflorom (non-VTEC). U istim uvjetima također je provjerena i mogućnost utvrđivanja prisutnosti verotoksina u suspenziji uzorka bez umnažanja. Istovremeno je prisutnost VTEC O157:H7 u zagađenim uzorcima kontrolirana dokazom rasta kolonija na pločama agara O157:H7 ID.

Druga faza je kontrola samog izvođenja ELISA metode na pločici, pri svakom testu za koji se koristi pozitivna i negativna kontrola. Ove kontrole se sastoje od količine verotoksina 1 i 2 (dalje u tekstu Stx 1 i Stx 2) koju je odredio proizvođač i koriste se obavezno uz svaki test bez obzira na broj uzoraka. Osim proizvođačke kontrole dodatno je korištena i priređena pozitivna kontrola u laboratoriju iz bakterijskog izolata *E. coli* O157:H7 koji dokazano stvara verotoksine (tablica 6). Ova pozitivna kontrola je supernatant najvećeg razrjeđenja kulture VTEC O157:H7 umnožene preko noći u mTSBN bujonu dobiven razrjeđivanjem u fiziološkoj otopini (FO) 1:10, koji je prethodnim testiranjem trokratno dao pozitivan rezultat na prisutnost verotoksina. Količina od  $5 \times 10^5$  CFU/mL VTEC više ne daje dovoljnu količinu verotoksina za otkrivanje ELISA testom kako je prikazano u tablici 9.

**Tablica 9.** Granica detekcije ELISA testa bez umnažanja (CFU/mL)

Izračunati broj CFU/mL u početnoj suspenziji <i>E. coli</i> O157:H7	Razrjeđenje <i>E. coli</i> O157:H7 početne suspenzije / CFU u mL FO			
$5 \times 10^7$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^5$	$5 \times 10^4$	$5 \times 10^3$
Direktni ELISA test u FO	+	-	-	-

Pozitivna kontrola iz laboratorijske kulture VTEC O157:H7 korištena je uz svaki test, radi usporedne kontrole bujona, postupka centrifugiranja, pripreme supernatanta i izvođenja samog ELISA testa.

### **Provjera ELISA metode uz umjetno dodanu kompetitivnu mikrofloru**

Za verifikaciju postupka obrađena su dva uzorka školjkaša, jedan (oznaka 2268) sa <20 MPN *E. coli* /100 g školjkaša i drugi (oznaka 2270) sa razinom dodanog zagađenja od 5400 MPN *E. coli* non-O157/100g. Uzorci su za dokaz verotoksina umjetno kontaminirani sa tri razine zagađenja VTEC O157:H7 do završne koncentracije od 0,25 CFU/g, 1,9 CFU/g i 45 CFU/g školjkaša. Isti postupak iskorišten je za istovremenu međusobnu provjeru klasičnih metoda izolacije VTEC i ELISA testa, pa je priprema uzoraka i određivanje količine dodanih i poraslih mikroorganizama opisana prethodno (tč. 4.2.3. *Provjera osjetljivosti metoda za izdvajanje β-glukuronidaza negativne E. coli različitim razinama zagađenja sa VTEC O157:H7*).

ELISA test je radi izbora najprikladnijeg postupka napravljen u supernatantima iz više vrsta sljedećih kultura:

- homogenata uzoraka u MRD bez umnažanja,
- obogaćenih kultura (nakon oživljavanja u MRD) dobivenih umnažanjem u MMGB pa u mTSBN (iz metode 2)
- obogaćenih kultura dobivenih umnažanjem u mTSBN (iz metode 3)

### **Provjera ELISA metode uz prirodnu kompetitivnu mikrofloru**

Zbog mogućnosti veće otpornosti kompetitivne mikroflore koja se već nalazi u školjkašima i jače inhibicije VTEC, korištena su dva homogenizirana uzorka školjkaša s različitim razinama prirodne *E. coli*.

ELISA test je napravljen u supernatantima obogaćenih kultura 25 g školjkaša u 225 mL mTSBN po prethodno izabranoj najprikladnijoj klasičnoj metodi za ELISA test – metoda 3.

Jedan uzorak (oznaka 989) nije sadržavao *E. coli* /100 g (<20 MPN *E. coli* /100 g manje od razine detekcije), a drugi (oznaka 1000) je imao prirodnu razinu od 1100 MPN *E. coli* /100g školjkaša (utvrđeno standardnom MPN metodom). Naknadno su uzorci umjetno zagađeni s tri razrjeđenja ( $10^{-6}$  -  $10^{-8}$ ) kulture VTEC O157:H7 umnožene preko noći do završne koncentracije od 0,2 CFU/g, 1,4 CFU/g i 8 CFU/g školjkaša.

Očekivane koncentracije nacijspljenih bakterija *E. coli* O157:H7 i *E. coli* non-O157 određene su u početnoj suspenziji metodom brojanja kolonija na ploči opisanom u poglavlju 4. Materijal i metode, tč. 4.2.3.)

### **Provjera ELISA metode bez umnažanja uz prirodnu kompetitivnu mikrofloru**

Za provjeru razlike primjene obogaćenja u bujonima i direktnog ELISA testa bez obogaćenja, korištena su dva homogenizirana uzorka školjkaša s različitim razinama prirodne *E. coli*.

Jedan uzorak (oznaka 2920, dagnje) je sadržavao <20 MPN *E. coli* /100 g (manje od razine detekcije), a drugi uzorak (oznaka 2946, prnjavice) prirodnu razinu od 5400 MPN *E. coli* /100g školjkaša (utvrđeno standardnom MPN metodom). Uzorci su umjetno zagađeni po prijašnjim saznanjima (tablica 9) s  $10^{-1}$  i  $10^{-2}$  razrjeđenjem kulture VTEC O157:H7 prethodno umnožene preko noći do završne koncentracije od  $2 \times 10^5$  CFU/g i  $2 \times 10^6$  CFU/g školjkaša.

Koncentracije dodanih bakterija *E. coli* O157:H7 određene su direktnim brojanjem jednog mL homogenata školjkaša metodom brojanja kolonija na ploči.

ELISA test je napravljen u supernatantima obogaćenih kultura mTSBN iz metode 3, a ispitivana je mogućnost izbora korištenja direktnog ELISA testa u supernatantima homogenata 25 g školjkaša u 225 mL mTSBN bez obogaćivanja za brzi presumptivni dokaz verotoksina (predviđena od proizvođača za uzorke fecesa). Namjera nije bila verificirati ovu tehniku izvođenja ELISA testa, nego dokazati da obogaćenje znatno povisuje osjetljivost metode.

### **Osjetljivost, specifičnost i podudarnost ELISA metode**

Iz svih gore navedenih postupaka verifikacije ELISA testa uz istovremenu upotrebu klasične metode izdvajanja VTEC O157:H7 umnažanjem 25g uzorka školjkaša u 225 mL mTSBN, usporedbom dobivenih rezultata porasta VTEC kolonija i dokazane prisutnosti verotoksina, određena je osjetljivost, specifičnost i podudarnost ELISA metode.

Uspoređen je ELISA postupak za određivanje Stx u supernatantima diluenta za oživljavanje (MRD) bez umnažanja i ELISA test u supernatantima umnoženih kultura u mTSBN na različitim razinama zagađenja s VTEC.

### **4.3.2. Dokazivanje mogućnosti onečišćenja živih školjkaša s VTEC putem prirodne filtracije morske vode**

Dokazivanje mogućnosti preživljavanja verotoksigene *E. coli* u moru i onečišćenja živih školjkaša kao posljedice prirodne filtracije mora zagađenog s VTEC je ujedno i završna verifikacija funkcioniranja izabranog postupka s metodama za izdvajanje VTEC (*E. coli* O157:H7) i njenih verotoksina (Stx) u živim školjkašima koje su izabrane ovim radom.

Izdvajanje VTEC i dokaz prisutnosti Stx u uzorcima živih školjkaša zagađenih prirodnim putem za razliku od pretraga zagađenjem homogenata školjkaša je poželjna potvrda učinkovitosti izabranih metoda u uvjetima najsličnijim prirodnim i istovremena potvrda mogućeg nalaza VTEC u živim školjkašima i moru.

## **Postupak onečišćenja živih školjkaša**

Prvi dio pokusa, unos VTEC u organizam živih školjkaša filtriranjem mora zagađenog s *E. coli* O157:H7 u imitiranim prirodnim uvjetima obavljen je na Institutu za oceanografiju i ribarstvo Split – IZOR. U laboratoriju za mikrobiologiju hrane i hrane za životinje Veterinarskog zavoda u Splitu (S-2 VZS) je prvo priređena kultura *E. coli* O157:H7 umnožena preko noći, čijim su razrjeđivanjima priređene dvije suspenzije ciljanog mikroorganizma u 1L MRD. Isti dan je preliminarno određen stvarni broj dodane *E. coli* O157:H7 u svrhu provjere dostatne količine za količinu mora od cca 1000 L, te je sutradan izvršena kontaminacija uz ponovnu provjeru stvarnog broja.

U bazen 1 s morskom vodom dodana je suspenzija kulture u količini od  $1,55 \times 10^6$  VTEC O157:H7, a u bazen 2 je stavljena manja količina od  $1,54 \times 10^5$ . Nakon miješanja mora u bazenima uzeti su prvo uzorci mora za ponovnu određivanje broja *E. coli* O157:H7 u bazenima radi mogućeg šokiranja i inhibicije morskom vodom. Na dno bazena je zatim stavljeno po 4 kg dagnji radi kontaminacije koja je trajala jedan sat, pri temperaturi od 20 °C i uz lagani protok kisika. Nakon završetka filtracije, dagnje i prije uzeti uzorci mora (oznake 1B i 2B) odmah su preneseni u laboratorij S-2 VZS, gdje je nastavljen pokus.

## **Dokazivanje prisutnosti VTEC i verotoksina u onečišćenim živim školjkašima metodama verificiranim u ovom radu**

Drugi dio pokusa bio je izdvajanje  $\beta$  GLUC(-) kolonija VTEC O157:H7 u školjkašima (i moru) i dokaz prisutnosti verotoksina ELISA postupkom u uzorcima školjkaša nakon obogaćenja.

U uzorcima morske vode uzetih nakon dodatka *E. coli* O157:H7 utvrđen je broj mikroorganizama. Broj *E. coli* O157:H7 i drugih mikroorganizama u moru provjeren je metodom brojanja kolonija postupkom membranske filtracije (MF), a ukupni broj bakterija metodom prelijevanja agara.

Nakon toga su uzorci dagnji (označeni oznakama bazena B1 i B2) obrađeni kombinacijom izabranih kulturnih metoda za brojanje i izdvajanje svih *E. coli* uz dva ponavljanja (A i B), te postupkom za dokaz verotoksina (Stx). Radi određivanja konačnog broja  $\beta$ -GLUC(-) i  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* nakon infiltracije u tkivu školjkaša, korištena je MPN



metoda (ISO/TS 16649-3:2005) na TBX agaru uz dodatak O157:H7 ID agara inkubiranog pri 41,5 °C.

Za izdvajanje *E. coli* uz detekciju Stx korištena je metoda za izolaciju  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* na kromogenom O157:H7 ID agaru obogaćenjem u mTSBN (metoda 3). Kako je faza pripreme primarne suspenzije i faza obogaćenja gore navedene MPN metode identična metodama 1 i 2, sve hranjive podloge i izabrane temperature u pokusu koriste se i za ove dvije metode, pa se tako ovim pokusom verificira i 1. faza metoda 1 i 2 i izbor hranjivih podloga i temperatura inkubacije.

Za ELISA test se koristi ista umnožena kultura iz metode 3. Test je proveden direktno na uzorcima dagnji B1 i B2 u supernatantima obogaćenja mTSBN umnoženih za 18 sati.

Dodatno je promatrana održivost stvaranja verotoksina kroz cijeli ciklus od zagađenja mora do izolacije VTEC kultura, pa je ELISA test proveden i u izoliranim kolonijama iz mora i iz uzoraka. Ista pločica za više ELISA testova dodatno je iskorištena za utvrđivanje stvarne proizvodnje verotoksina iz pohranjenih *E. coli* kultura koje su PCR postupkom otkrivene kao pozitivne odnosno imaju gene za proizvodnju Stx (što ne znači da će i izraziti tu sposobnost). Ove kulture kao i izolirane kolonije u pokusu, umnažane su također u mTSBN,  $20 \pm 2$  sata na 41,5 °C.

#### **4.4. Lančana reakcija polimerazom - PCR i verifikacija postupka**

Lančana reakcija polimerazom (PCR) je obavljena na sakupljenim pohranjenim izolatima miješanih i čistih kultura dobivenih iz svih prije navedenih metoda izolacije *E. coli* tijekom ovog istraživanja.

##### **Pohrana i priprema kultura za PCR**

Kulture su sakupljane od 9. mjeseca 2007. godine do 6. mjeseca 2010. godine iz svih uzoraka školjkaša gdje je izolirana i/ili potvrđena *E. coli*, a pohranjivane su na agar za konzerviranje (STOK agar) i čuvane do PCR pretrage na temperaturi od 1 °C - 5 °C. Izolati *E. coli* iz svakog uzorka su pohranjivani zasebno, a sakupljeni su na sljedeći način;

- ako se radilo o pojedinačnim  $\beta$  glukuronidaza pozitivnim kolonijama evidentno različitih morfoloških karakteristika rasta na ploči (glatke, sluzave, blijede, tamne, okrugle, cvjetaste, s prozirnim rubom ili bez i slično) kao i one posebnih traženih biokemijskih osobitosti (npr.  $\beta$ -

GLUC(-) / sorbitol(-) kolonije) i potvrđene *E. coli* drugih osobitosti - svaka kolonija je uzeta ubodnom ezom i pohranjena zasebno s kraticom opisa:

- ako se radilo o ploči punoj kolonija istih morfoloških karakteristika za *E. coli* s vidljivim pojedinačnim kolonijama, struganjem je skinuto s ploče desetak kolonija istim potezom eze, te su pohranjivane u zajednički STOK agar s oznakom „skupni“.

- ako je ploča bila puna kolonija karakterističnih za *E. coli* bez pojedinačnih kolonija što je najčešće kod MPN metode kada kolonije porastu na svih pet polja, istim potezom eze je uzet porast preko cijele ploče, te je sadržaj iscrpljen preko dodatne ploče istog agara metodom spaljivanja eze 3 ili 4 puta. Nakon što su dobivene pojedinačne kolonije ovisno o karakteristikama rasta, postupljeno je kako je prethodno opisano.

Za što uspješniju pretragu izolata PCR postupkom, kulture su revitalizirane na krvnom agaru, a onda je iz svježih kultura pripreman materijal za ekstrakciju DNK. S obzirom na da se tijekom istraživanja sakupio veliki broj izolata (1100) *E. coli*, STOK kulture su spajane zajedno, za skupnu PCR pretragu.

Izolati su oživljavani po tjednoj frekvenciji oko 100 kultura. STOK kulture su precjepljivane na svježi agar bogat hranjivim tvarima, krvni agar sa 7% ovčje krvi (KA) ne stariji od 7 dana, po principu 5 kultura na 5 označenih polja jedne krvne ploče. Nakon inkubacije od 24 sata na 37 °C do 10 sada svježih kultura je spajano te je uzeta puna eza (od cca 5 µl) porasta kulture sa svakog polja ploče (svaka kultura posebna eza radi daljnje pretrage kultura) i stavljena u zajedničku obrojčenu DNK/RNK čistu epruveticu s 0,75 µL DNK „free“ vode s oznakom pul (engl. pool). Te mješavine kultura suspendirane u vodi – pulovi, isti su dan transportirani u HVI Zagreb. Ploče KA s ostatkom kultura su zamatane u nepropusnu foliju i spremene do povrata rezultata. U slučaju pozitivnog rezultata s ploča pozitivnog pula su pretraživane pojedinačne kulture sve do identifikacije pozitivnog uzorka školjkaša, a zatim do pojedinačnih kolonija za pohranu čistih kultura za daljnju serološku identifikaciju.

### **Načela postupka**

Za pretragu je upotrijebljena multipleks (engl. multiplex) PCR metoda za detekciju više gena koji kodiraju značajnije virulentne faktore koji mogu sudjelovati u patogenezi. To su geni za prije spomenute shiga tj. verotoksine *stx1* i *stx2*, zatim dodatni virulentni gen *eaeA* za

intimin - protein vanjske membrane (dalje u tekstu *eae*) i gen EHEC *hlyA* (dalje u tekstu *hlyA*) koji kodira enterohemolizin karakterističan za enterohemoragične *E. coli*.

Nakon dopreme pulova u DNA „free“ vodi, slijedi ekstrakcija DNK zagrijavanjem i centrifugiranjem. Nakon te početne denaturacije dvostrukog lanca DNK dodaju se specifične početnice u posebnoj mješavini reagensa i *Taq* polimeraze (termostabilna DNK polimeraza). Početnice se vežu za krajeve komplementarnih lanaca denaturirane DNK, a *Taq* polimeraza sintetizira komplementarne lance.

Na kraju, slijedi očitavanje elektroforezom u gelu ili kapilarnom elektroforezom, gdje amplificirani produkt putuje do određenog mjesta u gelu ili kapilari pa se usporedbom s markerom po veličini produkta zna o kojem se traženom genu radi.

### Izbor početnica

Radi dobre uočljivosti razlika u veličini dobivenog produkta parova baza za detekciju gena *stx1*, *stx2*, *eaeA*, *hlyA*, korištene su početnice (Invitrogen Limited, USA) po referencama PATON i PATON (1998.a) kako je prikazano u tablici 10.

**Tablica 10.** Korištene početnice za amplifikaciju

Početnice	Sekvenca nukleotida (5'–3')	Specifična regija gena	Veličina produkta umnažanja(bp)
stx1F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	nukleotide 454–633 A subjedinice <i>stx1</i>	<b>180</b>
stx1R	AGAACGCCCACTGAGATCATC		
stx2F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	nukleotide 603–857 A subjedinice <i>stx2</i> , uključujući <i>stx2</i> varijante	<b>255</b>
stx2R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
eaeAF	GACCCGGCACAAGCATAAGC	nukleotide 27–410 <i>eaeA</i> (regija koja je konzervirana između EPEC i STEC)	<b>384</b>
eaeAR	CCACCTGCAGCAACAAGAGG		
hlyAF	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	nukleotide 70–603 EHEC <i>hlyA</i>	<b>534</b>
hlyAR	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT		

## **Opis postupka**

### **Izolacija DNK**

Bakterijske kulture su razmućene u 100 µl destilirane vode bez DNaza i RNaza (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen, Škotska), a zatim su kuhane 20 minuta na 95 °C te centrifugirane na 14 000 o / 1 minutu. Supernatant je korišten kao DNK kalup u PCR reakciji.

### **Detekcija gena**

PCR reakcijska smjesa ukupnog volumena 20 µl sadržavala je 10 µl Multiplex PCR Master Mix-a (Qiagen, Njemačka), 1 µl vode RNase-Free (Qiagen, Njemačka), 5 µl smjese početnica i 2 µl DNA. Konačna koncentracija svake početnice u reakcijskoj smjesi bila je 0,25 µM, (Invitrogen, Škotska). Umnažanje gena provedeno je pomoću uređaja Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD) s početnom denaturacijom (95 °C/15 min), nakon koje su uslijedila četiri koraka denaturacije, vezanja početnica i produljivanja lanaca i to:

1. korak s 10 ciklusa denaturacije (95 °C/1 min), vezanja početnica (65 °C/2 min) i produljivanja lanaca (72 °C/1,5 min);

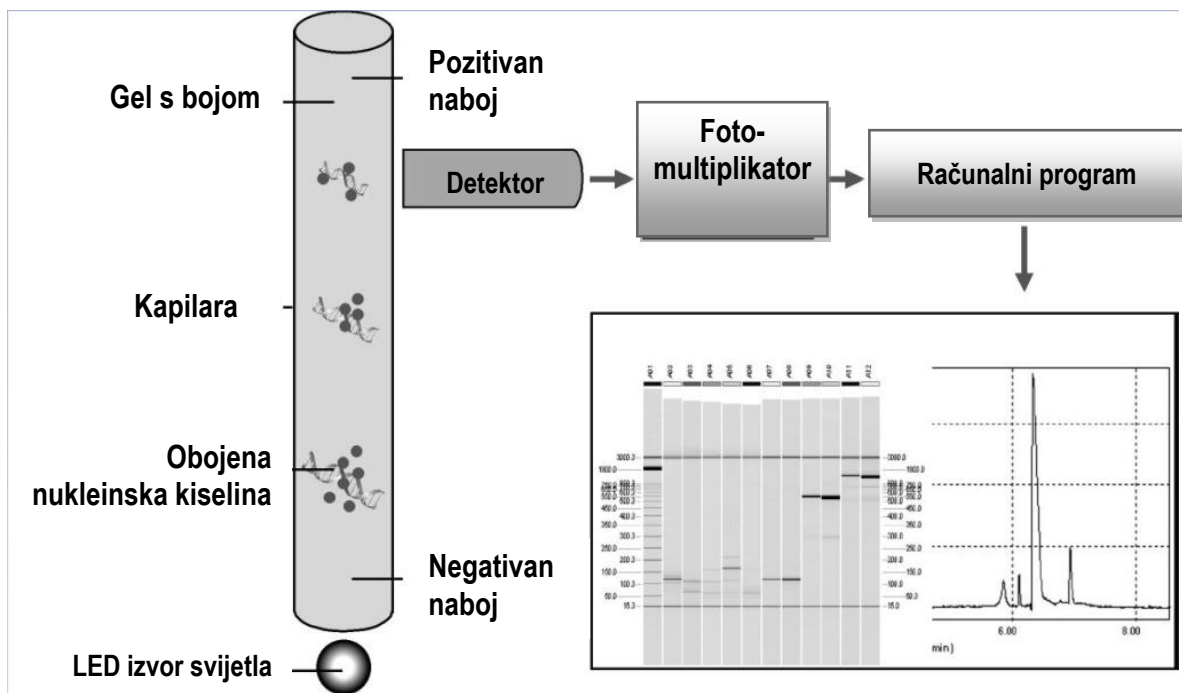
2. korak s 5 ciklusa u kojima se temperatura vezanja početnica postupno smanjivala sa 65 °C na 60 °C;

3. korak s 10 ciklusa denaturacije (95 °C/1 min), vezanja početnica (60 °C/2 min) i produljivanja lanaca (72 °C/1,5 min);

4. korak s 10 ciklusa u kojima se vrijeme produljivanja lanaca postupno povećalo s 1,5 na 2,5 minuta.

Nakon 4. koraka uslijedio je završni korak produljivanja lanaca (72 °C/10 min).

Produkti umnažanja detektirani su pomoću uređaja QIAxcel analyzer (Qiagen, Njemačka) i analizirani kompjuterskim programom BioCalculator Software (Qiagen, Njemačka). Na početku PCR testiranja i pri prvoj verifikacija postupka izborom pozitivne kontrole do nabavke novog uređaja, korištena je detekcija umnoženih produkata tradicionalnom tehnikom razdvajanja elektroforezom u gelu (slika 30).



**Slika 8.** Prikaz kapilarne gel-elektroforeze

QIAXcel analyzer koristi kapilarnu gel-elektroforezu kako bi se omogućilo brzo odvajanje nukleinskih kiselina na temelju veličine. Za razliku od tradicionalne agarozne gel-elektroforeze razdvajanje se izvodi u kapilarama koje su dio pred-zgotovljenog gel uloška. Svaki uzorak se automatski nanosi u pojedinačnu kapilaru (ovisno o naponu i vremenu trajanja), te se provodi struja. Negativno nabijene molekule nukleinskih kiselina migriraju kroz kapilaru do pozitivno nabijenog kraja (Slika 8).

Kao i kod agarozne gel-elektroforeze, molekule niske molekularne težine migriraju brže nego one visoke molekularne težine. Kako molekule migriraju kroz kapilaru, prolaze detektor koji otkriva i mjeri fluorescentni signal. Foto-multiplikirajući detektor pretvara emisijski signal u podatak u elektronskom obliku, koji se zatim prenosi na računalo za daljnju preradu koristeći BioCalculator softver. Nakon obrade, podaci su prikazani kao elektroferogram ili gel slike.

### **Verifikacija PCR metode**

Kao potvrda svakog ciklusa koristila se uobičajeno negativna kontrola - uzorak koji ne sadrži nijedan od ciljanih gena (DNK čista voda; engl. DNA free water), te dodatno pozitivna kontrola - uzorak s više traženih gena koji služe kao indikatori ispravne reakcije gdje njihova pozitivna očitavanja garantiraju uspješnost postupka.

**Pozitivna kontrola** je uspostavljena izborom između bakterijske kulture VTEC O157:H7 ISS 32 M/00B (ljubaznošću IZS, Teramo, Italija) i ekstrahiranih DNA *E. coli* O26, O111 i dvije DNA *E. coli* pohranjene iz izolata porijeklom iz ljudi sa simptomima HUS-a, za koji je prije utvrđeno da imaju gen za intimin (*eae*) (ljubaznošću dr. Merica Carev iz Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Splitsko - Dalmatinske županije, NZJZ SDŽ).

Kriterij izbora pozitivne kontrole je više ciljanih gena, pa je sam PCR postupak dalje verificiran uzorcima ekstrahirane DNA, koji su pokazali "bandove" (fluorescentne trakice na identičnom mjestu kao markeri traženih gena) za sva četiri gena.

Nadalje verifikacija PCR metode je obuhvatila provjeru više različitih parametara koji bi mogli imati utjecaj na različite faze PCR postupka. Postupak spajanja više kultura u različitim odnosima ciljanog i ostalih mikroorganizma u zajednički uzorak u DNA „free“ vodi (pul) i dobra ekstrakcije njegove DNA bez obzira na količinu drugog materijala, provjerena je dvokratno semikvantitativnom tehnikom miješanja *Stx*, *eae*, *hlyA* pozitivne VTEC O157:H7 i non-VTEC *E. coli* ATCC 8739, ATCC 25922, ATCC 35218 u različitim omjerima.

Provjeravani su parametri:

- **subkultivacija** VTEC pozitivne kulture, kontrolom više pasaža na krvnom agaru
- vremenski utjecaj dužine pohrane, kontrolom VTEC pozitivne kulture pohranjene u istim uvjetima kao testni uzorci
- **utjecaj količine ciljane DNK**, upotrebom jedne kolonije VTEC pozitivne kulture u DNA free vodi do pune eze kolonija u istoj količini vode
- **utjecaj količine neciljane DNK** prisutne u izoliranim pohranjenim čistim kulturama i/ili moguće miješanim izoliranim kulturama, kontrolom različite količine VTEC pozitivne kulture u miješanoj kulturi non-VTEC sojeva ATCC 8739; 35218; 25922. Najveća razlika količina je jedna kolonija PCR pozitivne kulture naprema punoj ezi kolonija po svakom non-VTEC ATCC soja u zajedničkoj epruvetici (pul).
- **utjecaj transporta**, kontrolom pripremljenog uzorka PCR pozitivne kulture u DNK "free" vodi u laboratoriju VZS u Splitu i svježe kulture pripremljene sa KA u laboratoriju HVI Zagreb.

#### 4.5. Serološka identifikacija VTEC

Kulture koje su se ELISA ili PCR postupkom pokazale verotoksigene - VTEC i kulture koje su imale gen za intimin ili enterohemolizin, kao i  $\beta$ -glukuronidaza negativne *E. coli* (presumptivne *E. coli* O157:H7), izolirane bilo kojom od prije opisanih klasičnih mikrobioloških metoda, pohranjivane su na STOCK agar za kasniju serotipizaciju aglutinacijom.

Pozitivan test aglutinacije, sam nije pokazatelj prisutnosti relevantnih gena virulencije. O antiserumi prikladni za otkrivanje površinskih antigena na živim kulturama su poliklonski serumi proizvedeni imunizacijom kunića sa cijelim stanicama ubijenima formalinom. Stoga serum sadrži antitijela protiv O, K, H i drugih proteina antigena koji se nalaze na površini stanica. Ova pozitivna reakcija mora biti potvrđena serotipizacijom s kuhanim kulturama. Za razliku od prije spomenutih O antiseruma, O antiserumi prikladni za otkrivanje termostabilnih lipopolisaharida (LPS) u vanjskoj membrane *E. coli*, su poliklonska antitijela proizvedena imunizacijom kunića s kuhanim stanicama. Kuhanjem su uklonjeni svi H, K i F antigeni, pa su križne-reakcije rijetke.

Serotipizacija je obavljena na NZJZ SDŽ s komercijalnim antiserumima po uputi proizvođača Bio rad; Trivalent I + II + III antisera i *E. coli* monovalentnim antiserumima, za najučestalije humane VTEC/EPEC serotipove iz njihova spektra uporabe; O26, O55, O86, O103, O111 O114, O119, O124, O125, O126, O127, O128, O157.

Kulture su za aglutinaciju prvo precjepljivane na svježi KA za oživljavanje i dobivanje pojedinačnih kolonija, a zatim na kosi hranjivi agar. Postupak serotipizacije je obuhvaćao aglutinaciju žive kulture na predmetnici, a u slučaju pozitivne reakcije, aglutinaciju kuhanih kultura na  $>90^{\circ}$  C 1 sat, u epruvetici ili mikroploči.

Kulture kojima nije određen serotip nadalje su slane u HZJZ Zagreb, u Nacionalni referentni centar za salmonelle (i druge gram-negativne enteropatogene) na serotipizaciju s ostalim komercijalno dostupnim antiserumima (osim upotrijebljenih u NZJZ SDŽ) za najučestalije humane VTEC/EPEC serotipove iz njihova spektra uporabe za područje Hrvatske; O4, O18. O25, O44, O78 O91, O112, O118, O142, O145, O164 (Imunološki zavod, Zagreb; Staten serum institute, Denmark)

#### 4.6. Statistička obrada podataka

U razdoblju od rujna 2007. godine do kraja lipnja 2010. godine, kombinacijom klasičnih mikrobioloških metoda za izolaciju  $\beta$ -glukuronidaza pozitivne i negativne *E. coli*, ELISA metode za dokaz verotoksina u uzorcima i PCR metode za utvrđivanje virulentnih gena za VTEC u prethodno izoliranoj *E. coli*, pretraženo je ukupno 900 uzoraka školjkaša na prisutnost verotoksigene *E. coli* (VTEC) iz svih 12 proizvodnih područja školjkaša dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana.

Prevalencije VTEC/EPEC su izražavane na broj ukupno pretraženih uzoraka školjkaša i na broj uzoraka školjkaša s izoliranom *E. coli* po vrstama školjkaša i proizvodnim područjima školjkaša Dalmacije.

Vrijednosti MPN *E. coli*/100g između skupina provjerene su neparametrijskim Kruskal Wallis testom.

Statistička obrada podataka je obavljena pomoću programa Stata 6.0 (STAT Corp. USA). Frekvencije učestalosti između skupina, vrsta školjkaša i proizvodnih područja provjerene su Hi-kvadrat ili Fisher-exact testom.



### 5.1. Verifikacija prikladnosti metoda 1, 2 i 3 za izdvajanje $\beta$ -glukuronidaza negativne *E. coli* sa VTEC O157:H7

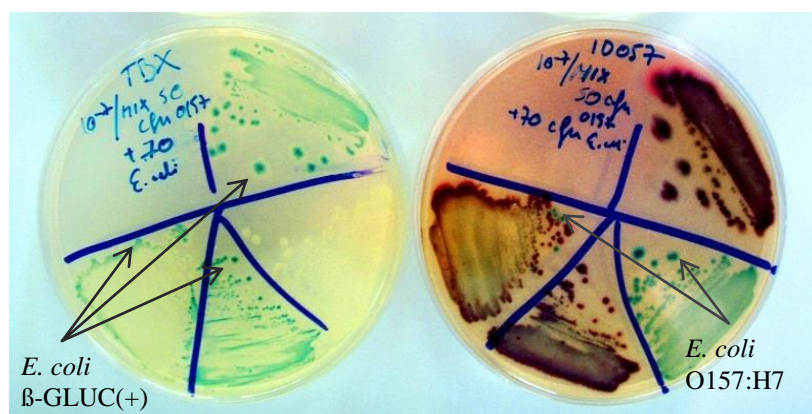
#### 5.1.1. Izbor najprikladnije tehnike naciepljivanja obogaćenih kultura na ploče agara

Postupak je opisan u poglavlju materijal i metode, a odnosi se na odabir najprikladnije od tri opisane metode naciepljivanja obogaćenih kultura na ploče agara.

##### Metoda 1

Provjerom postupka za izdvajanje  $\beta$ -glukuronidaza negativnih kolonija  $\beta$ -GLUC(-) na TBX agaru modifikacijom standardne MPN metode (shema 2) prvo je određen je stvarni broj naciepljenih bakterija *E. coli* non O157:H7 i *E. coli* O157:H7 standardnom MPN metodom uz dodatak O157:H7 ID agaru uz inkubaciju na 41,5 °C (slika 9). Zatim je određena najprikladnija varijanta naciepljivanja metode 1, obogaćenih kultura na ploče agara.

Na slici 9 prikazan je rast kolonija na dva različita agara (TBX i O157:H7 ID agaru). Na TBX agaru za brojanje  $\beta$ -glukuronidaza pozitivnih  $\beta$ -GLUC(+) kolonija vidljiv je porast zelenih kolonija na tri polja što je koncentracija od 80 MPN *E. coli*/100g. Na O157:H7 ID agaru za brojanje  $\beta$ -GLUC(-) kolonija *E. coli* O157:H7 vidljiv je rast smaragdno zelenih kolonija na dva polja u koncentraciji od 50 MPN *E. coli* O157:H7/100g školjkaša.



**Slika 9.** Stvarna količina  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* (tri ATCC soja *E. coli*) i  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7 u 100 g kontaminiranih školjkaša određena MPN metodom na TBX i O157:H7 ID agaru (foto: I. Listeš)

Na ovaj je način potvrđena stvarna koncentracija *E. coli* O157:H7 i ostalih kompetitivnih *E. coli* bakterija u 100 g školjkaša u odnosu na očekivani broj od 50 CFU *E. coli* O157:H7 i 70 CFU mješavine tri ATCC soja *E. coli* (oznaka MIX na pločama) iz dodane suspenzije, određen metodom brojanja kolonija prelijevanjem agara.

Različitim varijantama naciepljivanja obogaćene miješane kulture  $\beta$ -GLUC(+) /  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* iz MMGB po metodi 1, dobiven je različiti porast  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7 kolonija na TBX agaru (slike 10 i 11).

Na TBX agaru su  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7 vidljive kao bijele kolonije, dok su ostale *E. coli* ( $\beta$ -GLUC(+)) kolonije zelene boje.

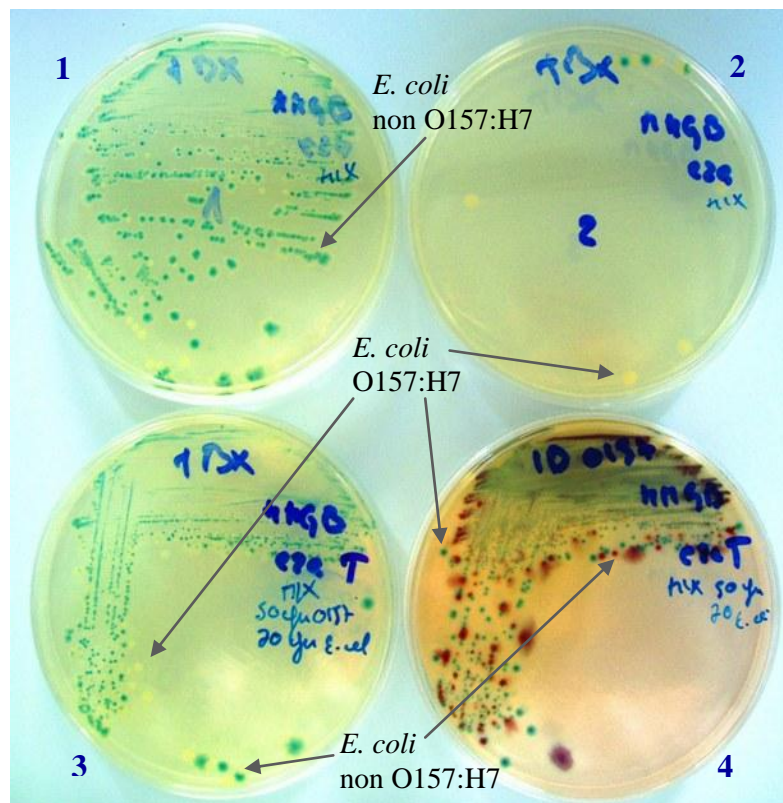
Na kromogenom O157:H7 ID agaru korištenom za kontrolu odnosno direktni usporedni dokaz stvarne prisutnosti i rasta  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7, kolonije su smaragdno zelene boje, dok su ostale  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* vidljive kao crvene, ljubičaste do modre kolonije.



**Slika 10.** Tehnika naciepljivanja metodom 1 - varijanta 1 na TBX agaru, uz kontrolu rasta na O157:H7 ID agaru (foto: I. Listeš)

Na slici 10 prikazana je tehnika naciepljivanja varijantom 1, odnosno tehnikom razrjeđenja obogaćene kulture iz MMGB ( $10^{-1}$  razrjeđenje). Na prvoj petrijevoj ploči s TBX agarom (oznaka 1) vidljiv je rast  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7 kolonija, a na ploči s oznakom 2 ne. Na kontrolnom agaru O157:H7 ID (na slici desno) iz istog razrjeđenja također je vidljiv rast *E. coli* O157:H7.

Na slici 11 prikazane su preostale dvije tehnike izolacije miješane kulture  $\beta$ -GLUC(+) /  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* iz MMGB na TBX agaru, uz dodatnu kontrolu rasta na O157:H7 ID agaru. Upotrijebljene su sljedeće tehnike: varijanta 2 - iscrpljivanje bez spaljivanja eze preko dvije ploče i varijanta 3 - tehnika iscrpljivanja kulture na istoj ploči sa spaljivanjem eze dva puta T-tehnika, koje su dale su podjednako dobre rezultate.



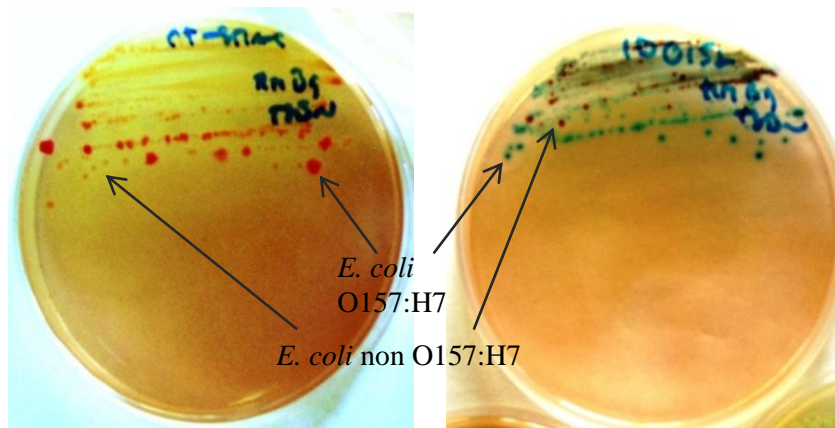
**Slika 11.** Tehnike nacjepljivanja primjenom metode 1 na TBX agaru, varijanta 2 - oznaka 1 i 2 i varijanta 3 - oznaka 3, uz kontrolu rasta na O157:H7 ID agaru - oznaka 4 (foto: I. Listeš)

Metodom 1 primjenom svih varijanti nacjepljivanja, dokazano je dobro umnažanje bakterije *E. coli* O157 u MMGB bez obzira na prisutnost komenzalne mikroflore u količini većoj od ciljanog mikroorganizma. Za daljnju pretragu uzoraka verifikacijom tehnike nacjepljivanja ove metode, varijanta 1 je odbačena kao prezahtjevna zbog potrebe razrjeđivanja, a izabrana je varijanta 2 (iako ekonomski manje prihvatljiva od varijante 3) radi bolje vidljivosti i manje mogućnosti prerastanja kolonija.

## Metoda 2

Za verifikaciju najboljeg postupka za izdvajanje  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7 kolonija na krutim podlogama O157:H7 ID i CT-SMAC agaru prema metodi s kombiniranjem dva bujona, (prvo MMGB, a zatim mTSBN; vshema 3) iskorišten je isti uzorak školjkaša iz verifikacije metode 1.

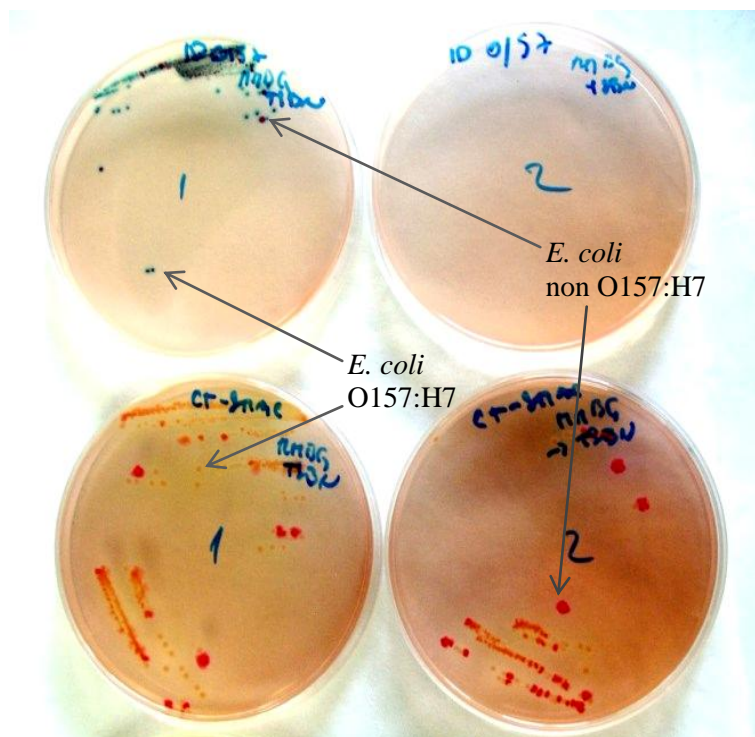
Kao što se vidi na slici 12, T-tehnikom iscrpljivanja na jednoj ploči, obogaćene kulture iz mTSBN bujona prethodno umnožene u MMGB bujonu, dobiven je dostatan rast  $\beta$ -GLUC (-), sorbitol(-) *E. coli* O157:H7 kolonija (smaragdno zelene kolonije na O157:H7 ID agaru, na slici desno, a sitnije i bezbojne do oker na CT-SMAC agaru – na slici lijevo). Istovremeno se dobro uočavaju pojedinačne kolonije, dok tehnika iscrpljivanja preko dvije ploče (slika 13), nije dala bolji rezultat. Vidljivo je da je T-tehnika iscrpljivanja na O157:H7 ID agaru primijenjena i u prethodnoj metodi (slike 10 i 11) kao dodatna kontrola stvarne prisutnosti *E. coli* O157:H7 pokazala izvrsne rezultate.



**Slika 12.** Tehnika nacjepljivanja primjenom metode 2, varijanta 2 (T-tehnika iscrpljivanja na jednoj petrijevoj ploči CT-SMAC agara - lijevo i O157:H7 ID agara - desno) (foto: I. Listeš)

Što se tiče CT-SMAC agara, potvrđene su prijašnje tvrdnje o vrlo slaboj uočljivosti kolonija *E. coli* O157 oker boje, dok je s druge strane vidljivo da je porast ovih kolonija na O157:H7 ID agaru najmanje jednak kao i na ostala dva agara (TBX i CT-SMAC) uz puno bolju uočljivost kolonij- (slike 9 - 13).





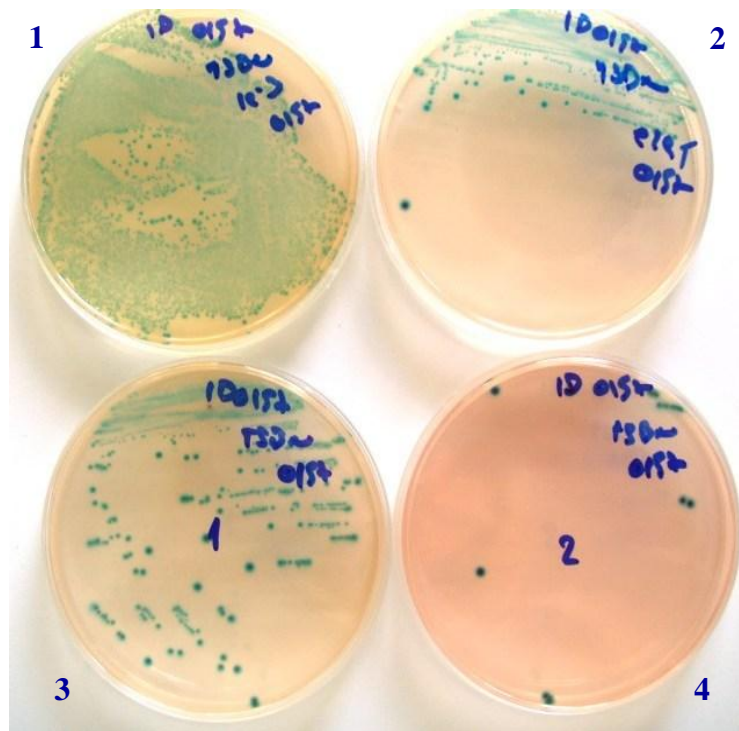
**Slika 13.** Tehnika nacjepljivanja primjenom metode 2, varijanta 1 (iscrpljivanje preko dvije petrijeve ploče O157:H7 ID - gornji red i CT-SMAC agara - donji red) (foto: I. Listeš)

Verifikacijom tehnike nacjepljivanja primjenom metode 2 radi veoma teškog razlikovanja kolonija na CT-SMAC agaru, za daljnju pretragu uzoraka izabrana je varijanta 2 na O157:H7 ID agaru. Verifikacija metode 2 ujedno je pokazala dobar oporavak bakterije *E. coli* O157:H7 u MMGB i umnažanje u mTSBN bujonu, bez obzira na prisutnost komenzalne mikroflore. Ova metoda je korištena tijekom 2008. godine do početka pretraga školjkaša ELISA metodom, kada je upotrijebljena metoda 3.

### Metoda 3

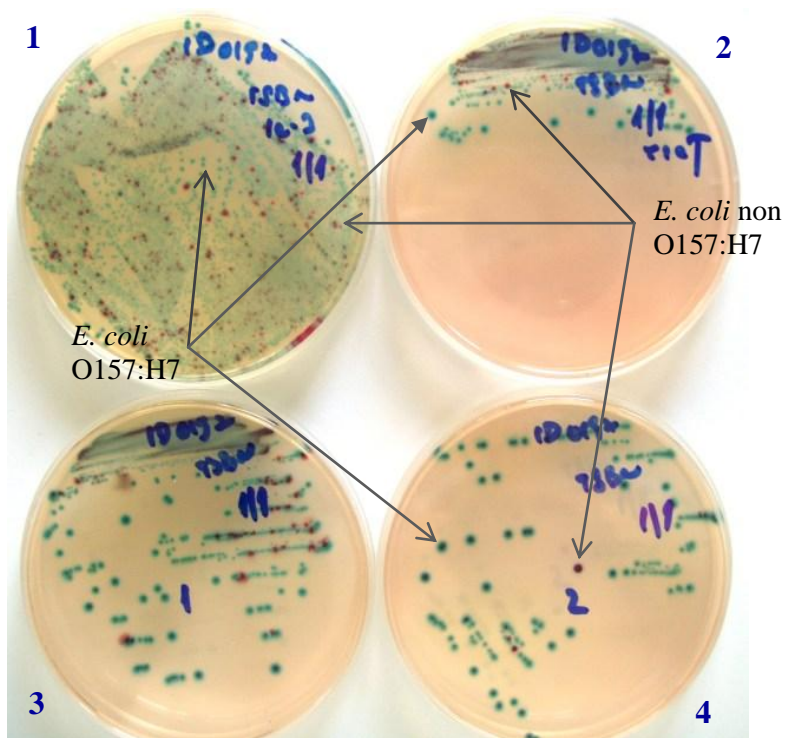
Za verifikaciju najbolje tehnike izdvajanja pojedinačnih  $\beta$ -GLUC(-) kolonija bakterije *E. coli* metodom 3 (shema 4) na krutim podlogama, O157:H7 ID i CT-SMAC agaru, nakon umnažanja u mTSBN bujonu, upotrijebljen je uzorak školjkaša početne količine *E. coli* <20 MPN/100g. Umjetnim zagađenjem dva od tri poduzorka mješavinom tri ATCC soja *E. coli* završne koncentracija 0,6 i 1,1 CFU/g školjkaša i tri razine *E. coli* O157:H7 (0,25; 0,5 i 1 CFU/g školjkaša) dobiveni su odnosi  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7 i  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* u uzorcima za provjeru vidljivosti  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* u manjem i većem broju neciljanog mikroorganizma.

Na slikama 14 -16 su prikazane sve tri varijante naciepljivanja porasle kulture u mTSBN bujonu na O157:H7 ID agaru: varijanta 1 - tehnika iscrpljivanja preko dvije ploče, varijanta 2 - iscrpljivanje preko jedne ploče - T-tehnika i varijanta 3 - tehnika razrjeđenja.

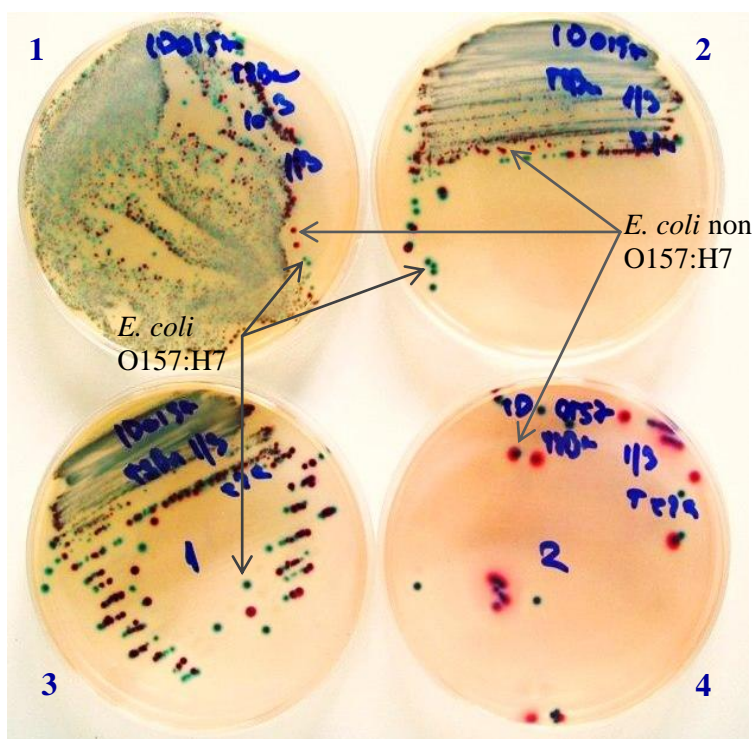


**Slika 14.** Tri varijante metode 3 naciepljivanja čiste kulture od 1 CFU *E. coli* O157:H7/g školjkaša na O157:H7 ID agaru,  $10^{-3}$  razrjeđenje (oznaka 1), T-tehnika (oznaka 2) i iscrpljivanje preko dvije ploče (oznake 3 i 4) (foto: I. Listeš)

Kao što je vidljivo na slici 14, tehnika dvije ploče i T-tehnika iscrpljivanja na jednoj petrijevoj ploči daju dobar rezultat rasta dostatnog broja pojedinačnih  $\beta$ -GLUC(-) kolonija (smaragdno zelene kolonije) bez obzira radi li se o čistoj kulturi *E. coli* O157:H7 (slika 14) ili miješanoj kulturi  $\beta$ -GLUC (+) *E. coli* i  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7 u različitim odnosima (slike 15 i 16). Oznake 1/1 i 1/3 na slikama 15 i 16 označavaju odnos količine (ml) dodanih suspenzija mješavine tri soja  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* i  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7 čije su vrijednosti kasnije određene brojanjem kolonija metodom prelijevanja agarom. Na slikama su petrijeve ploče različitih tehnika naciepljivanja razmještene redom: oznaka 1 petrijeva ploča s razrijeđenom kulturom do  $10^{-3}$ ; oznaka 2 - petrijeva ploča s rastom kulture iscrpljivanjem T-tehnikom na jednoj ploči i iscrpljivanje preko dvije petrijeve ploče – oznake 3 i 4.



**Slika 15.** Tri varijante nacepljivanja metode 3 zagađenjem  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7 i  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* u odnosu 0,5:0,6 CFU/g školjkaša (foto: I. Listeš)



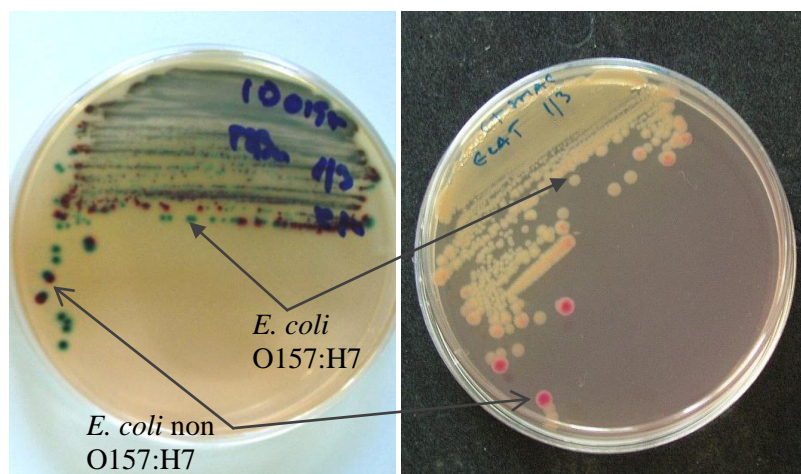
**Slika 16.** Tri varijante nacepljivanja metode 3 zagađenjem  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7 i  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* u odnosu 0,25:1,1 CFU/g školjkaša (foto: I. Listeš)

Tehnika nalijevanja razrjeđenja od  $10^{-1}$  -  $10^{-3}$  (na slici prikazano  $10^{-3}$ ) uvijek daje pregust rast, što znači da trebaju najmanje još dva iduća razrjeđenja za dobivanje pojedinačnih kolonija što je prezahtjevno.

Što se tiče CT-SMAC agara (kao i kod prethodne metode izolacije *E. coli* O157:H7 na istom agaru) potvrđena je slabija uočljivost kolonija *E. coli* O157:H7 u miješanoj kulturi s drugim *E. coli* u usporedbi s O157:H7 ID agarom (slika 17). Pojedinačne kolonije su dobivene, ali je veliki broj kolonija koje se po boji slabo uočavaju što zahtijeva biranje velikog broja kolonija za potvrdnu identifikaciju *E. coli* O157:H7. Rezultati na CT-SMAC pločama u miješanoj kulturi su bili očekivani što potvrđuju u literaturi podaci pa ovaj agar nije uključen u daljnja testiranja.

Daljnji izbor za pretragu uzoraka je kromogeni agar O157:H7 ID agar koji se temelji na enzimatskoj aktivnosti bakterija *E. coli*, a ne na fermentaciji sorbitola. Prve su dvije tehnike naciepljivanja kulture, varijanta 1 i 2 na O157:H7 ID agaru zbog dobro poraslih i dobro uočljivih pojedinačnih kolonija *E. coli* O157:H7 dale jednako vrijedne rezultate.

Verifikacijom tehnike naciepljivanja obogaćene kulture na agaru primjenom metode 3 radi ekonomskog aspekta izabrana je varijanta 2 - tehnika naciepljivanja jedne ploče (u slučaju pregustog rasta kultura se precijepi na dodatnu ploču O157:H7 ID agara).



**Slika 17.** Usporedba porasta miješane kulture  $\beta$ -GLUC/sorbitol(-) *E. coli* O157:H7 i  $\beta$ -GLUC/sorbitol(+) *E. coli* u odnosu 0,25:1,1 CFU/g školjkaša, umnožene u mTSBN bujonu tehnikom iscrpljivanja, na CT-SMAC (desno) i O157:H7 ID agar (lijevo) (foto: I. Listeš)



### 5.1.2. Provjera osjetljivosti metoda različitim razinama zagađenja uzorka s VTEC O157:H7

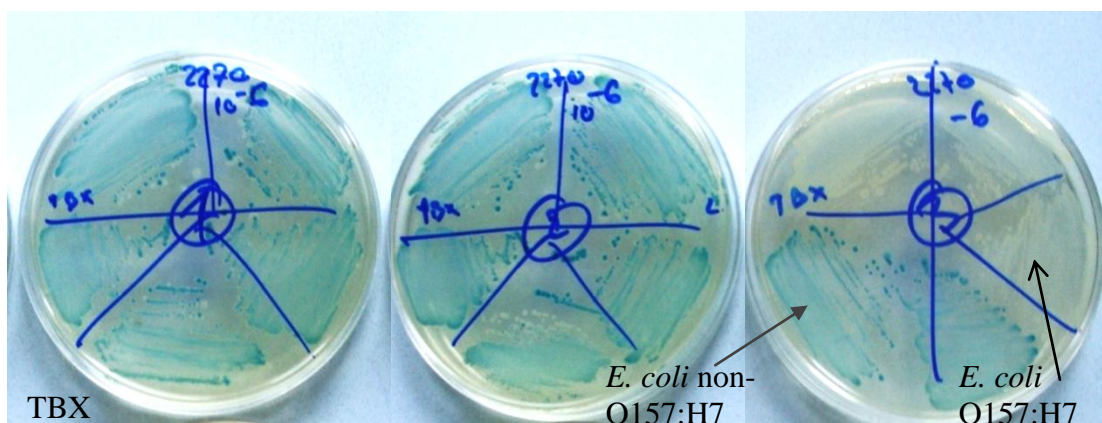
Zagađenjem homogenata uzoraka školjkaša ciljanim mikroorganizmom VTEC O157:H7 uz različite razine prirodne ili umjetno dodane kompetitivne mikroflore (*E. coli* non-O157) verificirana je primjenjivost cjelokupnog postupka i osjetljivosti sve tri metode za izdvajanje  $\beta$ -glukuronidaza negativne *E. coli* (shema 1, 2 i 3). Količina kompetitivne *E. coli* non-O157 je više od 200 x veća od ciljane *E. coli* O157:H7. Stvarni broj dodanih *E. coli* u početnoj suspenziji mikroorganizama određen brojanjem kolonija metodom prelijevanja agarom i najvjerojatniji broj *E. coli* određen u 100 grama školjkaša, podudaraju se uzimajući u obzir interval povjerljivosti od 95% (tablica 11).

**Tablica 11.** Stvarni broj dodane *E. coli* O157:H7/non-O157 određen MPN metodom

Oznaka uzorka	Razina zagađenja sa <i>E. coli</i> non-O157	Razrjeđenje početne suspenzije / razina zagađenja uzorka sa <i>E. coli</i> O157:H7		
		10 <sup>-8</sup> / 25 CFU/100g	10 <sup>-7</sup> / 190 CFU/100g	10 <sup>-6</sup> / 4500 CFU/100g
		MPN <i>E. coli</i> O157:H7/100g školjkaša		
2268	<20 MPN <i>E. coli</i> /100g	<20 (<10-70)*	230 (70-700)*	3500 (1200-10000) *
2270	5400 MPN <i>E. coli</i> /100g	20 (<10-70)*	130 (30-310)*	9200 (3000-32000) *

\*( ) 95% interval povjerljivosti iz MPN tablica ISO 7128, važeća revizija

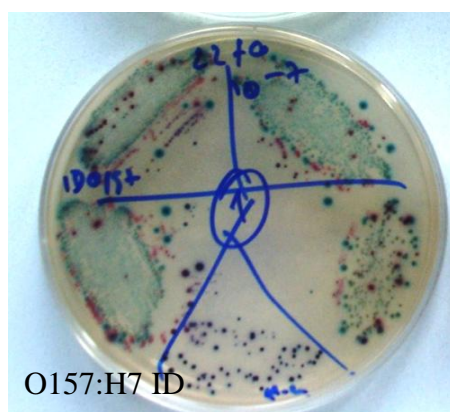
Dokaz stvarno dodanog broja *E. coli* MPN metodom prikazan je na slikama 18 - 21. Uzorak 2268 kontaminiran je samo s *E. coli* O157:H7, pa su za slikovni prikaz verifikacije stvarne razine zagađenja i metoda izabrane slike uzorka 2270. Uzorak je zagađen sa 5400 MPN *E. coli* non-O157:H7/100g školjkaša radi provjere moguće inhibicije *E. coli* O157:H7 s većom količinom kompetitivne *E. coli* non-O157 u prirodnom okruženju (slike 18 - 23). Oznake 10<sup>-6</sup>-10<sup>-8</sup> na petrijevim pločama označavaju korištena razrjeđenja inicijalne suspenzije *E. coli* O157:H7. Bujoni i agari korišteni za pojedinu metodu na petrijevim pločama su naznačeni kraticama: TSB – mTSBN; 2xGlutB – dvostruki MMGB; ID O157 - O157:H7 ID agar. Na O157:H7 ID agaru  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7 vidljive su kao smaragdno zelene kolonije, dok su ostale  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* crvene, ljubičaste do modre boje. Na pločama TBX agara kolonije  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7 su bijele, dok su ostale kolonije *E. coli* ( $\beta$ -GLUC(+)) zelene boje.



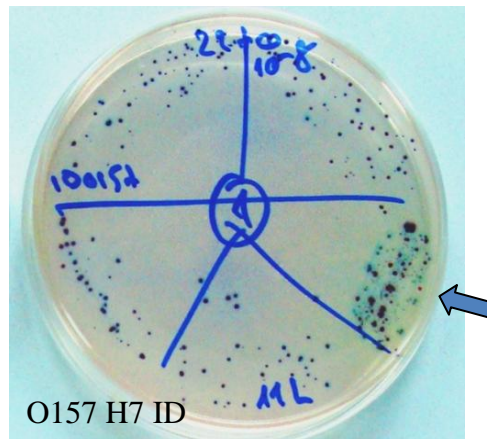
**Slika 18.** Dokaz porasta 5400 MPN *E. coli* non-O157:H7 i zagađenja s 9200 MPN VTEC O157:H7/100g školjkaša na TBX agaru u uzorku 2270 (foto: I. Listeš)



**Slika 19.** Dokaz porasta 9200 MPN VTEC O157:H7 i dodane kompetitivne mikroflore od 5400 MPN *E. coli* non-O157:H7 u 100g školjkaša na O157:H7 ID agaru (foto: I. Listeš)



**Slika 20.** Dokaz rasta 130 MPN VTEC O157:H7 (smaragdno zelene kolonije u poljima) u uzorku s 5400 MPN *E. coli* non-O157:H7 u 100g školjkaša (foto: I. Listeš)



**Slika 21.** Dokaz rasta 20 MPN VTEC O157:H7 (smaragdno zelene kolonije) u uzorku s 5400 MPN *E. coli* non-O157:H7 u 100g školjkaša (foto: I. Listeš)

Određivanjem najvjerojatnijeg broja *E. coli* O157:H7 na TBX agaru i ranije verificiranom O157:H7 ID agaru za kontrolu i vidljivi paralelni dokaz rasta  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7 i na jednom i drugom agaru, potvrđeno je dobro umnažanje VTEC u jednostrukom i dvostrukom MMGB bujonu i uspješno izdvajanje *E. coli* O157:H7 uz inkubaciju od 41,5 °C na TBX agaru, što je potvrda primjenjivosti faze umnažanja i mogućnosti izdvajanja VTEC po metodi 1 bez obzira na kasnije varijante naciepljivanja umnožene kulture (slika 18).

Na slikama uzorka broj 2270 (slike 19 - 21), vidljiv je porast  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7 iz sve tri razine zagađenja, niske, srednje i visoke (25 CFU/100g; 190 CFU/100g; 4500 CFU/100g *E. coli* O157:H7), uz dokazanu visoku razinu kompetitivne mikroflore od 5400 MPN  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* non-O157:H7/100g na TBX agaru (slika 18). Odnos razine zagađenja uzoraka kompetitivnom *E. coli* non-O157 i ciljanom *E. coli* O157:H7 je 215:1.

U tablici 12 i na slikama 18, 22 i 23 prikazana je uspješnost porasta VTEC O157:H7 sa sve tri klasične metode za izdvajanje  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* (metoda 1, 2 i 3). Na pločama se osim oznaka korištenih razrjeđenja za zagađenje nalaze i oznake korištenih bujona za umnažanje i naziv agara. Istovremeno, s ocjenom prikladnosti klasičnih metoda izolacije, isti uzorci (2068 i 2070) korišteni su za istovremenu kontrolu i verifikaciju ELISA metode (tablica 12).

**Tablica 12.** Usporedni prikaz dokaza porasta *E. coli* O157:H7 klasičnim metodama za izdvajanje  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* i ELISA postupkom

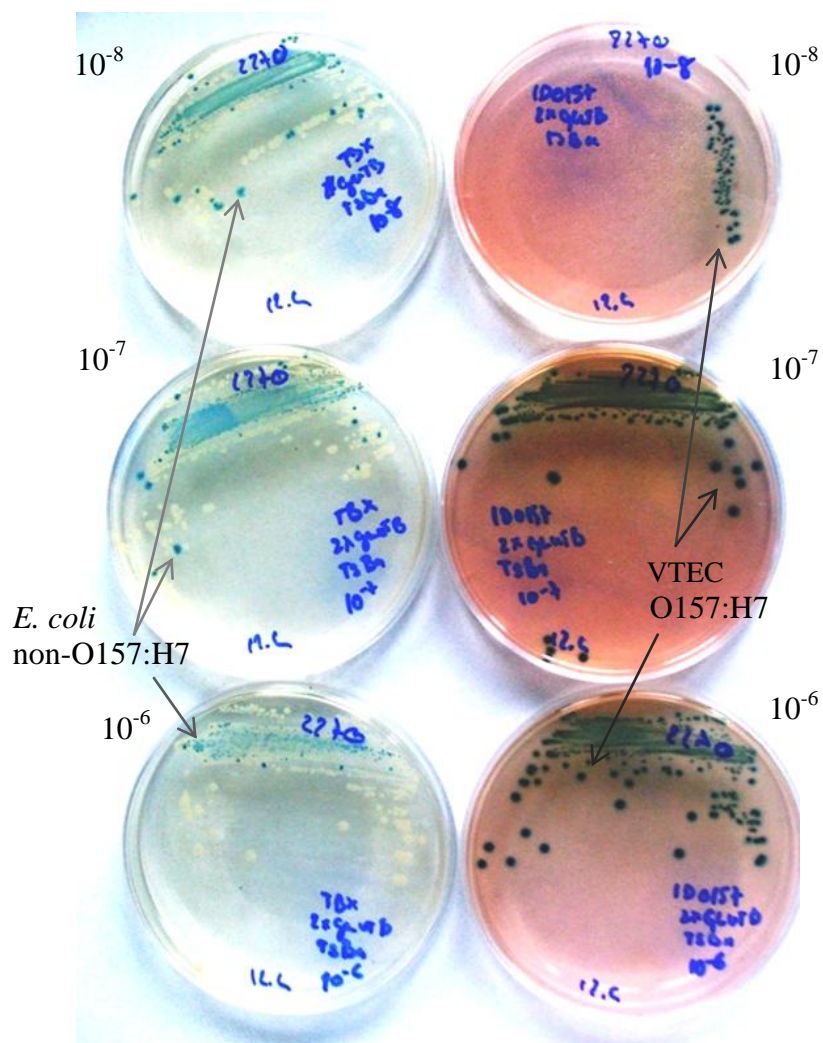
Oznaka uzorka i razina zagađenja s <i>E. coli</i> non-O157	Upotrijebljene metode i njihove faze			Razrjeđenje početne suspenzije / razina zagađenja uzorka s <i>E. coli</i> O157:H7		
				10 <sup>-8</sup> 0,25 CFU/g	10 <sup>-7</sup> 1,9 CFU/g	10 <sup>-6</sup> 45 CFU/g
	Naziv metode	*	**	<b>Porast / dokaz Stx <i>E. coli</i> O157:H7</b>		
Uzorak 2268 <20 MPN/100g	<b>Metoda 1</b>	MRD MMGB	TBX EMBA	-	+	+
	<b>Metoda 2</b>	MRD MMGB mTSBN	O157:H7 ID	-	+	+
	<b>ELISA nakon faze* metode 2</b>		ELISA test	-	+	+
	<b>Metoda 3</b>	mTSBN	O157:H7 ID	+	+	+
	<b>ELISA nakon faze* metode 3</b>		ELISA test	+	+	+
	<b>Direktna ELISA iz MRD bez obogaćenja</b>			-	-	-
Uzorak 2270 5400 MPN/100g	<b>Metoda 1</b>	MRD MMGB	TBX EMBA	+	+	+
	<b>Metoda 2</b>	MRD MMGB mTSBN	O157:H7 ID	+	+	+
	<b>ELISA nakon metode 2</b>		ELISA test	+	+	+
	<b>Metoda 3</b>	mTSBN	O157:H7 ID	+	+	+
	<b>ELISA nakon metode 3</b>		ELISA test	+	+	+
	<b>Direktna ELISA iz MRD bez obogaćenja</b>			-	-	-

\* korišteni diluenti i bujoni za umnažanje *E. coli*

\*\* korišteni agari za izdvajanje i identifikaciju  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* / dokaz verotoksina



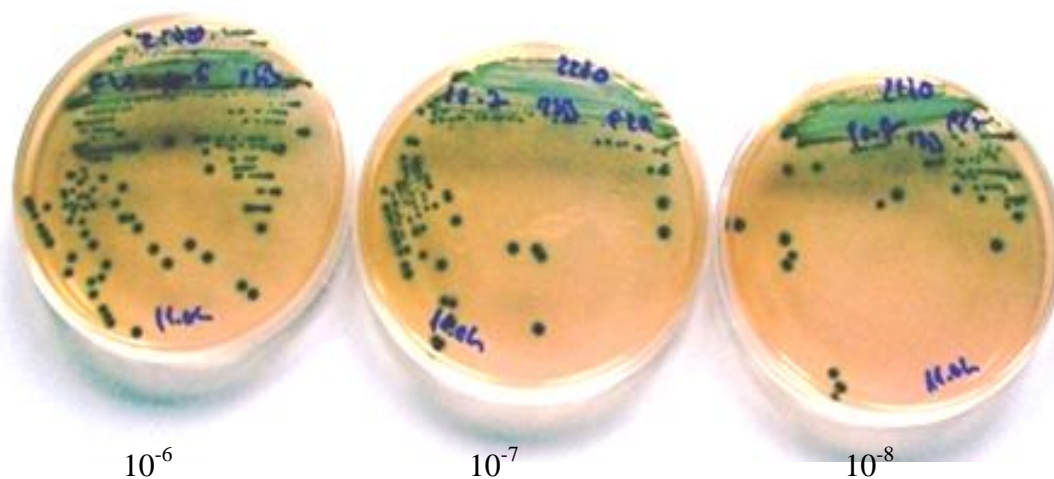
U uzorku 2268 bez inhibitornih mikroorganizama, zagađenje s 0,25 CFU/g školjkaša nije dalo porast metodama 1 i 2 dok je iz uzorka 2270 s velikom količinom kompetitivne mikroflore (>200 puta od ciljanog mikroorganizma) *E. coli* O157:H7 izolirana sa sve tri metode. Prvi razlog je da ciljani mikroorganizam nije ni stavljen u homogenat uzorka 2268 u MRD (diluent koji se koristi i za oživljavanje) jer je količina *E. coli* O157:H7 u epruveti s pripremljenim razrjeđenjem  $10^{-8}$  bila premala da bi bila prisutna u svakom mililitru suspenzije koja se koristila za zagađenje. Drugi mogući razlog je količina dodane *E. coli* O157:H7 od 0,25 CFU/g koja je preblizu granice osjetljivosti MPN metode <0,20 CFU/g, odnosno uz određenu mjernu nesigurnost ispod nje. Metodom 3 (metoda detekcije) iz istog uzorka, ali iz homogenata s mTSBN dokazan je porast u oba uzorka.



**Slika 22.** Dokaz porasta VTEC O157:H7 iz tri razine zagađenja metodom 2 na O157:H7 ID agaru (na slici desno), uz dodatak TBX agara za vidljiv rast *E. coli* non-O157:H7 (na slici lijevo) (foto: I. Listeš)

Metodom 2 i izabranom tehnikom nacjepljivanja agara, na slici 22 prikazan je porast *E. coli* O157:H7 u uzorku broj 2270 na O157:H7 ID agaru (smaragdno zelene kolonije) iz sve tri razine zagađenja (0,25 CFU/g; 1,9 CFU/g, 45 CFU/g) uz kontrolu prisutnosti kompetitivne mikroflore *E. coli* non-O157:H7 na TBX agaru (zelene kolonije).

Ranije utvrđena 200 puta veća razina zagađenja uzorka s *E. coli* non-O157:H7 sa 54 MPN/g (5400 MPN/100g) prikazana je na slici 18.



**Slika 23.** Dokaz bogatog rasta VTEC O157:H7 (smaragdno zelene kolonije) iz sve tri razine zagađenja metodom 3 na O157:H7 ID agaru (**foto: I. Listeš**)

Metodom 3, izabranom tehnikom nacjepljivanja agara, vidljiv je jednak porast *E. coli* O157:H7 u gotovo čistoj kulturi na O157:H7 ID agaru bez obzira na razinu zagađenja, 45 CFU/g, 1,9 CFU/g ili 0,25 CFU/g, uzorka broj 2270 s ranije utvrđenim 54 MPN *E. coli* non-O157:H7/g (slika 23).

Najveće razrjeđenje ciljanog mikroorganizma koje daje porast ciljanih bakterijskih kolonija bez obzira na broj kolonija predstavlja granicu detekcije.

Sa sve tri metode izdvajanja  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7 izdvojene su ciljane bakterije uz utvrđenu granicu detekcije od 0,25 CFU/g *E. coli* O157:H7 (tablica 12, slike 18-23).

## **5.2. Verifikacija ELISA metode dokazom verotoksina u uzorcima homogenata školjkaša zagađenih sa VTEC O157:H7**

ELISA metoda uz obogaćenje je provjerena više puta u smislu različitih odnosa razine zagađenja ciljane VTEC (*E. coli* O157:H7) i kompetitivne dodane i prirodne mikroflore, a također je za usporedbu provjeren i postupak bez obogaćenja. Sve vrijednosti kolonija VTEC O157:H7 izbrojenih na agaru koje su korištene za zagađenje uzoraka izražene su po gramu školjkaša (CFU/g) radi lakše usporedbe s MPN vrijednostima i međusobne usporedbe više metoda primijenjenih u radu.

Granica detekcije je naprotiv izražena kao CFU/količina uzorka koji je ušao u postupak umnažanja.

### **5.2.1. Dokaz verotoksina u školjkašima uz dodanu kompetitivnu mikrofloru**

Verifikacijom ELISA testa u supernatantima kultura umnoženih u bujonima prema metodama 2 i 3, te usporedbom na uzorcima školjkaša bez *E. coli*, a s 5400 MPN dodane *E. coli* non-O157/100g uz tri razine zagađenja s VTEC O157:H7 (tablica 11 i slike 18 - 21) izabran je najprihvatljiviji ELISA postupak (tablica 12). Test je napravljen i u supernatantu homogenata uzoraka bez umnažanja u diluentu za oporavak *E. coli* bez dodataka antibiotika (MRD). U oba uzorka bez obzira na stupanj umjetnog zagađenja, nije dobiven pozitivan rezultat na prisutnost verotoksina (Stx).

U uzorku 2270 s velikom količinom kompetitivne mikroflore (5400 MPN dodane *E. coli* non-O157/100g) umnažanjem 18 sati u bujonima potvrđena je prisutnost Stx iz VTEC O157:H7, bez obzira na razinu onečišćenja s VTEC. Također je potvrđena prisutnost Stx bez obzira je li se radilo o obogaćenoj kulturi dobivenoj umnažanjem u dva bujona MMGB i mTSBN (metoda 2) ili obogaćenoj kulturi dobivenoj umnažanjem u mTSBN (metoda 3).

U uzorku 2260 bez kompetitivnih mikroorganizama zagađenje s 0,25 CFU VTEC O157:H7/g nije dalo pozitivan rezultat, za što je klasičnim metodama izolacije dokazano da količina VTEC O157:H7 u svakom mililitru početne suspenzije nije bila dostatna za zagađenje. Za daljnju primjenu u pretrazi uzoraka živih školjkaša iz proizvodnih područja, izabrana je ELISA metoda s umnažanjem u mTSBN korištenom u metodi 3, te je nadalje taj postupak verificiran.

### 5.2.2. Dokaz verotoksina u školjkaša uz prirodnu kompetitivnu mikrofloru

ELISA postupak uz obogaćenje u mTSBN korištenim u metodi 3, osim uz umjetno dodanu kompetitivnu mikrofloru provjeren je i na uzorku s prirodnim sadržajem non-VTEC od 1100 MPN/100g (školjkaši dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana su većinom razvrstani u razred A sa <230 MPN/100g) dok je kontrolni uzorak bio bez prirodno prisutne *E. coli*.

U oba uzorka i u tri razine kontaminacije s VTEC O157:H7 od 0,2 - 8 CFU/g školjkaša (tablica 13) potvrđena je prisutnost verotoksina iz VTEC O157:H7 nakon umnažanja kroz 18 sati u bujonu (mTSBN) i u uzorcima s najmanjom razinom kontaminacije. Istovremeno je potvrđen rast VTEC O157:H7 iz sve tri razine zagađenja početne suspenzije na O157:H7 ID agaru.

**Tablica 13.** Određivanje prisutnosti verotoksina ELISA postupkom u uzorcima školjkaša s različitom razinom zagađenja s VTEC O157:H7

Oznaka uzorka s prirodnom razinom bakterije <i>E. coli</i>	ELISA test uz kontrolu vitalnosti VTEC izdvajanjem na agaru metodom 3		Razrjeđenje početne suspenzije/ razina zagađenja uzorka s VTEC O157:H7		
			10 <sup>-8</sup> / 0,2 CFU/g	10 <sup>-7</sup> / 1,4 CFU/g	10 <sup>-6</sup> / 8 CFU/g
989 <20 MPN/100g	umnažanje u mTSBN	izdvajanje na O157:H7 ID agaru	+	+	+
		<b>ELISA</b>	+	+	+
1000 1100 MPN/100g	umnažanje u mTSBN	izdvajanje na O157:H7 ID agaru	+	+	+
		<b>ELISA</b>	+	+	+

+ = porast *E. coli* O157:H7/prisutnost Stx

### 5.2.3. Provjera mogućnosti dokaza verotoksina ELISA metodom bez umnažanja

Primjena direktnog ELISA postupka bez umnažanja u supernatantima bujona s dodatkom antibiotika (mTSBN), provjerena je u uzorku školjkaša s prirodnim sadržajem *E. coli* od 5400 MPN/100g i na uzorku bez prirodne, kompetitivne *E. coli* u dvije razine kontaminacije s VTEC O157:H7 (tablica 14). Količine dodane VTEC su u ovom pokusu bile



znatno veće nego pri prethodnoj verifikaciji (tablica 12) kada nisu dokazani verotoksini. Uzorci su pretraženi i ELISA testom nakon obogaćivanja. Test bez umnažanja bio je pozitivan na prisutnost Stx tek kod jako visoke kontaminacije ciljanim mikroorganizmom  $\geq 10^6$  CFU/g za razliku od ELISA testa s prethodnim umnažanjem u mTSBN. Stoga su uzorci školjkaša u radu pretraživani ELISA metodom uz inkubaciju u mTSBNu.

Dodatno je dokazana i stabilnost verotoksina kroz >60 dana u centrifugiranim obogaćenim kulturama, pohranjenima pri temperaturi od 4 °C. Verotoksini su dokazani u supernatantu obogaćenih kultura bez obzira na početnu količinu VTEC i drugih mikroorganizama, za razliku od neobogaćenih kultura VTEC. U neobogaćenim kulturama s  $\geq 10^6$  VTEC CFU/g u uzorku i prirodnoj razini 5400 MPN *E. coli* /100g stabilnost je bila manja (40 dana) nego u uzorima bez *E. coli* (60 dana).

Dokazana stabilnost verotoksina od najmanje 60 dana u obogaćenim kulturama pohranjenima na 4 °C omogućava obradu odjednom više uzoraka zaprimljenih u različito vrijeme na jednoj ELISA pločici. Ova mogućnost je tijekom istraživanja samo iznimno korištena na obogaćenim kulturama starim tjedan dana jedne serije uzoraka školjkaša, uz jednako tretiranu pozitivnu kontrolu.

**Tablica 14.** Određivanje prisutnosti verotoksina u uzorcima školjkaša u ELISA postupku sa i bez obogaćenja

Oznaka uzorka s prirodnom razinom bakterije <i>E. coli</i>	ELISA test uz kontrolu vitalnosti VTEC izdvajanjem na agaru metodom 3		Razrjeđenje početne suspenzije / razina zagađenja uzorka s VTEC O157:H7			
			10 <sup>-2</sup> /2 x 10 <sup>5</sup> CFU/g		10 <sup>-1</sup> /2 x 10 <sup>6</sup> CFU/g	
			0.dan	0.dan	40.dan	60.dan
2920 (dagnje) <20 MPN/100g	umnažanje u mTSBN	izdvajanje na O157:H7 ID agaru	+	+	/	/
		ELISA	+	+	+	+
	mTSBN bez umnažanja	ELISA	-	+	+	+
2946 (prnjavice) 5400 MPN/100g	umnažanje u mTSBN	izdvajanje na O157:H7 ID agaru	+	+	/	/
		ELISA	+	+	+	+
	mTSBN bez umnažanja	ELISA	-	+	+	-

+ = porast *E. coli* O157:H7 ili prisutnost Stx; - = odsutnost Stx; / = nije primjenjivo

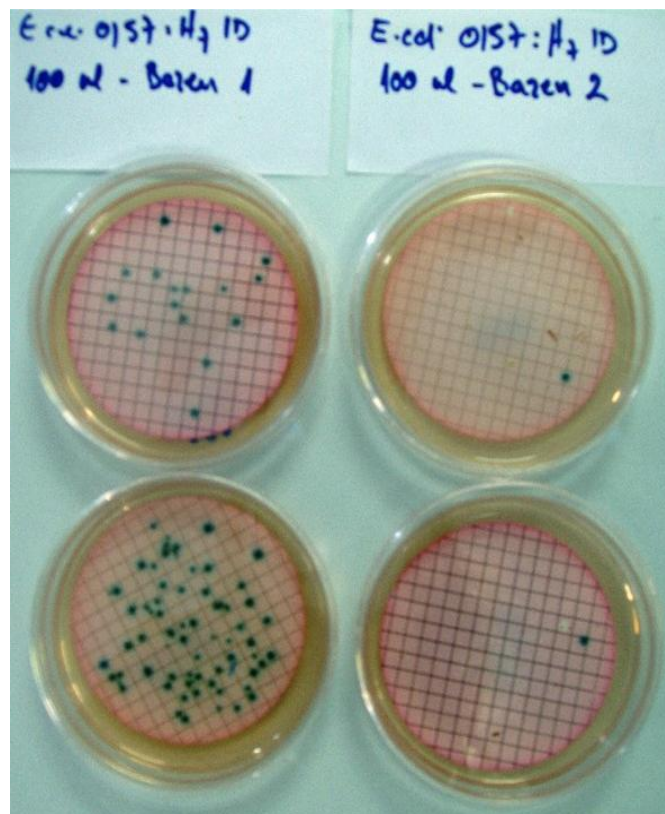
#### 5.2.4. Rezultat pokusa mogućnosti izolacije VTEC i dokaza prisutnosti verotoksina ELISA metodom iz školjkaša zagađenih prirodnim putem filtracijom mora

Simulacijom prirodnih uvjeta i kontaminacijom živih školjkaša s VTEC - *E. coli* O157:H7 ( $\beta$ -GLUC(-)), potvrđena je mogućnosti nalaza VTEC i njihovih toksina u školjkašima filtracijom zagađenog mora. Upotrijebljene su sljedeće metode: modificirana MPN ISO/TS 16649-3:2005 s inkubacijom pri 41,5 °C na TBX agaru i O157:H7 ID agaru za istovremeno brojanje  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* i  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli*, te ELISA metoda s obogaćenjem prema metodi 3 s izdvajanjem  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli*, što je i njihova dodatna verifikacija. U tablici 15 naveden je broj dodanih i utvrđenih bakterijskih stanica *E. coli* O157:H7 i drugih mikroorganizama nakon zagađenja mora. Broj bakterija utvrđen je metodom membranske filtracije (MF) i metodom prelijevanja agara.

**Tablica 15.** Broj mikroorganizama u zagađenom moru

	BAZEN 1	BAZEN 2
<b>Dodani mikroorganizmi u more (VTEC O157:H7/100mL)</b>	155	15,4
<b>Utvrđeni mikroorganizmi u moru</b>		
Ukupni broj mikroorganizama/1ml	72	56
Fekalni koliformi-MF/100 mL	0	0
<i>E. coli</i> -MF/100 mL	0	0
<i>E. faecalis</i> -MF/100 mL	6	4
VTEC O157:H7-MF/100 mL	38	1
<i>Ps. aeruginosa</i> -MF/100 mL	0	0

Kako je vidljivo u slici 24, broj poraslih VTEC O157:H7 iz bazena 1 je djelomično smanjen (oko 4x) s obzirom na inicijalni broj, vjerojatno zbog inhibitornog utjecaja morske (slane) vode i otjecanjem određenog broja VTEC stalnim protokom mora. Bazen oznake 2 nije uzet u obzir za ovaj izračun radi nesigurnosti očitavanja malih brojeva kolonija poraslih na selektivnoj podlozi (< 4 CFU). Broj VTEC O157:H7 u oba bazena bio je dostatan za onečišćenje školjkaša (slike 24, 25, 26 i tablica 15). Broj VTEC O157:H7 u moru nakon kontaminacije je izbrojan MF metodom izražen kao srednja vrijednost broja kolonija poraslih na dvije petrijeve ploče O157:H7 ID agara.

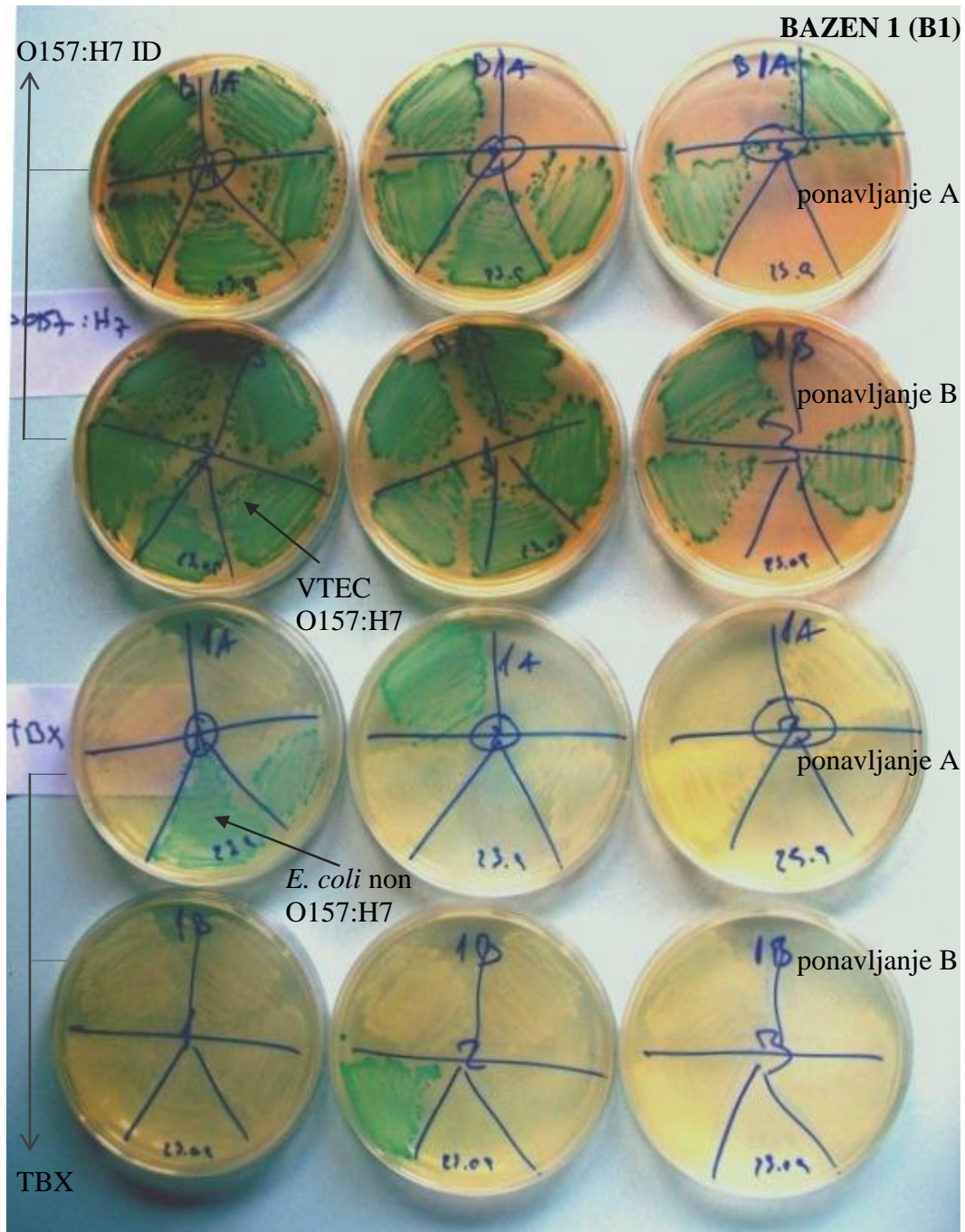


**Slika 24.** Broj VTEC O157:H7 (smaragdno zelene kolonije) MF metodom na O157:H7 ID agaru (**foto: I. Listeš**)

Nakon filtracije mora u vremenu od jednog sata pri temperaturi od 20 °C, modificiranom MPN metodom na TBX agaru uz dodatak O157:H7 ID agara utvrđeno je 9200 MPN VTEC O157:H7/100g školjkaša iz uzorka B1 (slika 25), te do 490 MPN VTEC O157:H7/100g školjkaša iz uzorka B2 (slika 27). Iako u 100 mL mora nije izdvojena ni jedna  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* (*E. coli* non-O157:H7) u školjkašima je utvrđena određena količina *E. coli* koja je u njima bila prisutna u trenutku uzorkovanja iz prirodnog okruženja (proizvodno područje razvrstano u razred A  $\leq$  230 MPN *E. coli*/100 g).

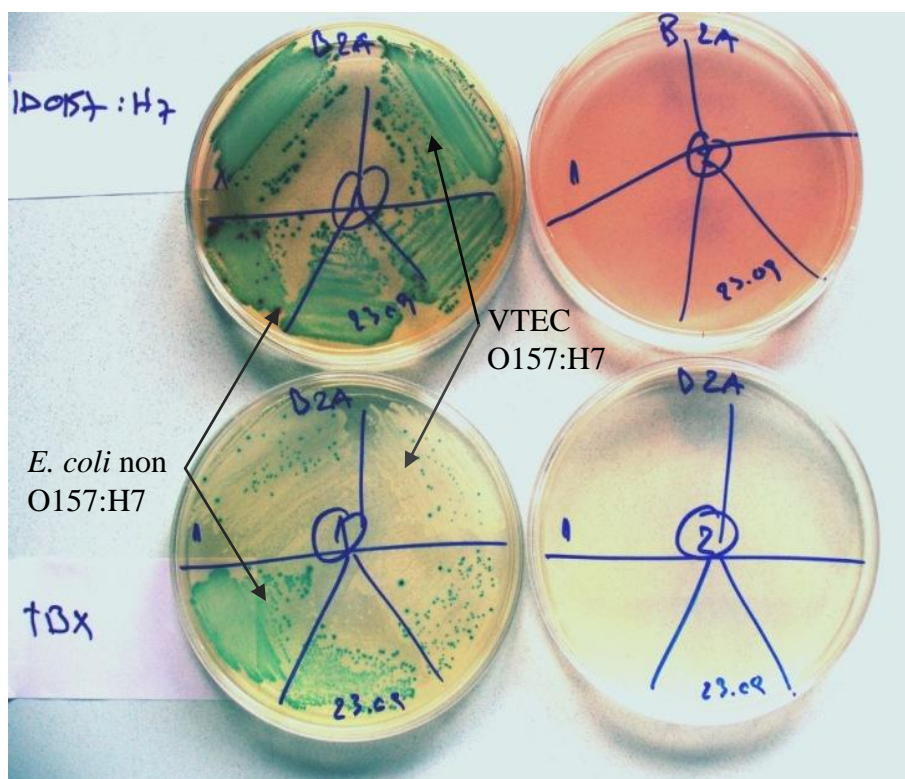
U uzorku B1 u dva ponavljanja utvrđena je prisutnost prirodne  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* od 20 i 80 MPN *E. coli*/100g školjkaša (slika 25, porasle zelene kolonije, donja dva reda petrijevih ploča) i infiltrirane  $\beta$ -GLUC(-) VTEC O157:H7 od 2200 i 9200 MPN/100g školjkaša (slika 25, smaragdno zelene kolonije, gornja dva reda petrijevih ploča). Na slici 25 vidljivo je da su na O157:H7 ID agaru, kolonije  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* non O157:H7 jedva uočljive ili neuočljive zbog izrazito vidljivijih karakteristika rasta kolonija  $\beta$ -GLUC negativne VTEC O157:H7.

Razlika u MPN između ponavljanja (slika 25) je prihvatljiva s obzirom na varijabilnost metode ISO 7218:2007, uz interval povjerljivosti od 95% (ANON., 2007.c).



**Slika 25.** MPN  $\beta$ -GLUC(-)VTEC O157:H7 i  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* non O157:H7 na O157:H7 ID i TBX agaru u uzorku zagađenih živih dagnji bazena 1 (foto: I. Listeš)



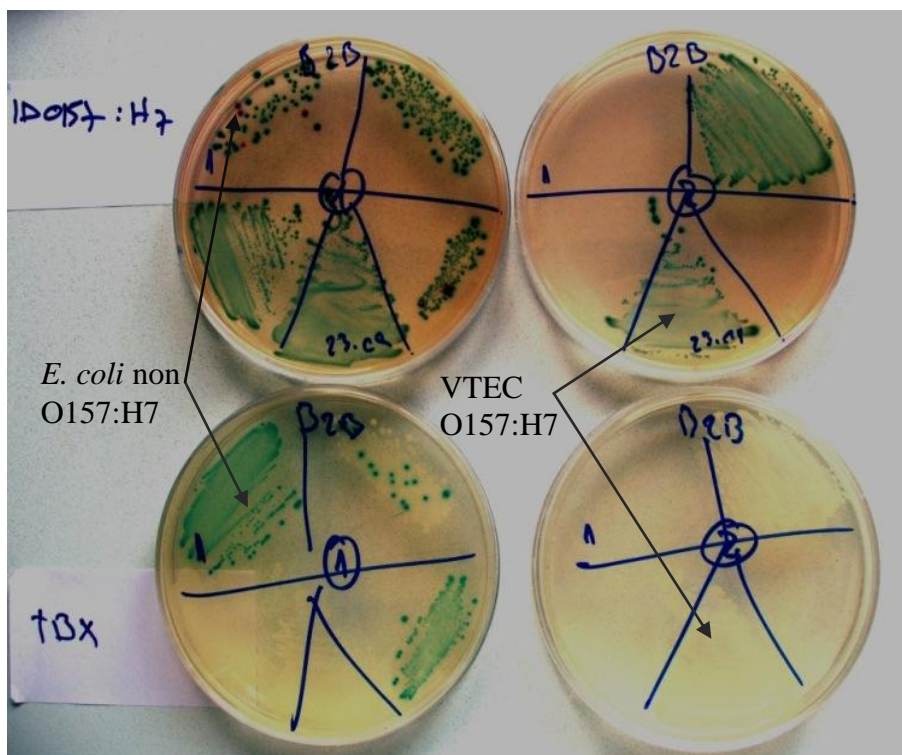


**Slika 26.** MPN  $\beta$ -GLUC(-) VTEC O157:H7 i  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* non O157:H7 na O157:H7 ID i TBX agaru u uzorku zagađenih živih dagnji iz bazena 2, ponavljanje A (foto: I. Listeš)

U uzorku B2 u ponavljanju A (slika 26) dokazana je prisutnost prirodne  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* od 230 MPN *E. coli*/100g školjkaša (zelene kolonije, donji red petrijevih ploča) i 230 MPN infiltrirane  $\beta$ -GLUC(-) VTEC O157:H7/100g školjkaša (smaragdno zelene kolonije, gornji red petrijevih ploča).

U uzorku B2 u ponavljanju B (slika 27) dokazana je prisutnost prirodne  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* od 80 MPN *E. coli*/100g školjkaša (zelene kolonije, donji red petrijevih ploča) i 490 MPN infiltrirane  $\beta$ -GLUC(-) VTEC O157:H7/100g školjkaša (smaragdno zelene kolonije, gornji red petrijevih ploča).

Rezultati oba ponavljanja (slika 26 i 27) ulaze u međusobne intervale povjerljivosti od 95% metode ISO 7218:2007 (ANON., 2007.c).

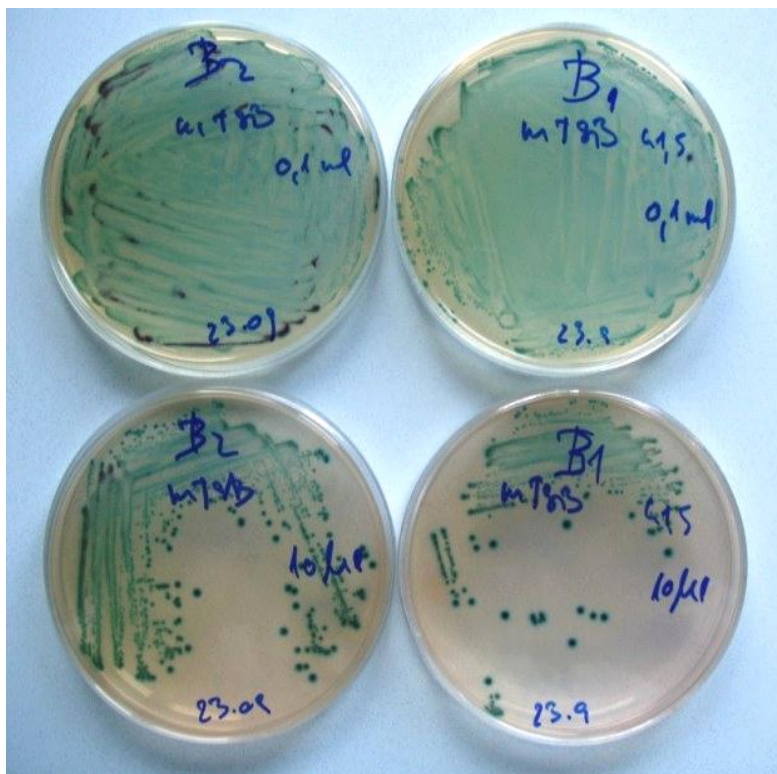


**Slika 27.** MPN  $\beta$ -GLUC(-) VTEC O157:H7 i  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* non O157:H7 na O157:H7 ID i TBX agaru u uzorku zagađenih živih dagnji iz bazena 2, ponavljanje B (foto: I. Listeš)

U slici 28 u donjem redu petrijevih ploča prikazan je porast bakterija u uzorcima prirodno onečišćenih školjkaša, izabranom metodom 3 (obogaćenje uzoraka školjkaša u mTSBN uz izdvajanje  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* tehnikom iscrpljivanja na jednoj ploči (varijanta 2) O157:H7 ID agara). U oba uzorka vidljiv je bogat i poželjan rast pojedinačnih kolonija VTEC O157:H7.

Usporednom tehnikom nacjepljivanja (varijanta 3) veće količine (100 $\mu$ l) obogaćene kulture (prikaz na slici 28, gornji red petrijevih ploča) potvrđen je pregusti rast kulture.

Rezultati ovog pokusa s istovremenom upotrebom modificirane metode MPN ISO/TS 16649-3:2005 za dokaz razine zagađenja i metode 3 ujedno su i potvrda dobre produktivnosti izabranih hranjivih podloga i temperatura umnažanja i izdvajanja, koje su korištene u sve tri klasične metode izdvajanja  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* iz uzoraka živih školjkaša.



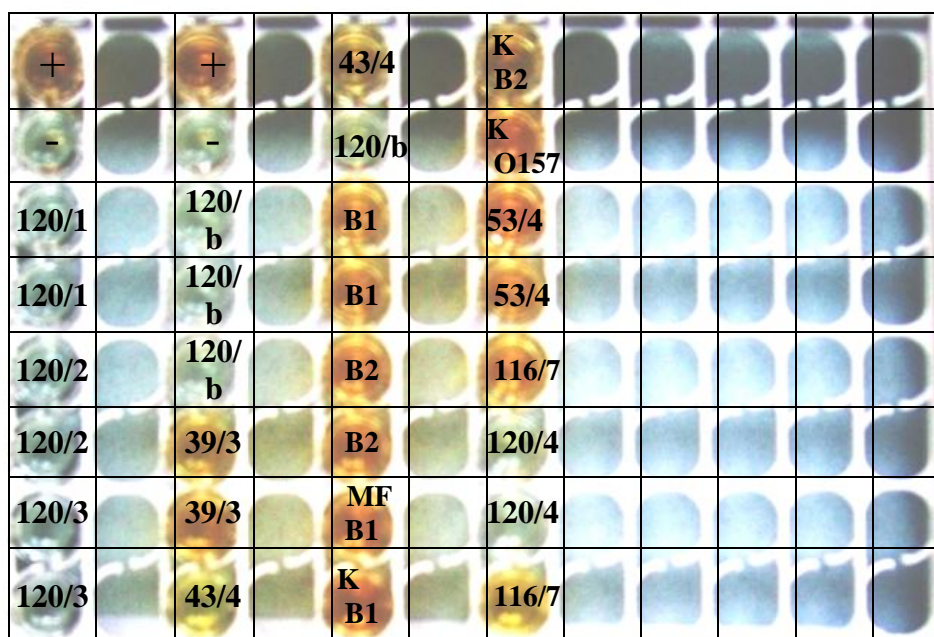
**Slika 28.** Porast  $\beta$ -GLUC(-) VTEC O157:H7/100g školjkaša (smaragдно zelene kolonije) u uzorcima dagnji B1 i B2, metodom 3, varijante 2 i 3 nacjepljivanja na O157:H7 ID agar (foto: I. Listeš)

ELISA metodom uz obogaćenje uzoraka  $18 \pm 2$  sata/41,5 °C u mTBSN, dokazana je prisutnost verotoksina (Stx) u namjerno onečišćenim uzorcima živih dagnji putem filtracije morske vode (oznake B1 i B2) s VTEC O157:H7 (slika 29).

U izoliranim kolonijama *E. coli* O157:H7 iz mora i iz uzoraka u svrhu potvrde prisutnosti i stabilnosti verotoksina, također je potvrđena prisutnost Stx.

Istim ELISA testom dokazani su i verotoksini u kolonijama pohranjenih kultura *E. coli* za koje je PCR postupkom otkriveno da posjeduju gene za proizvodnju Stx, osim u uzorku kulture broj 120 koja je bila pozitivna u PCR postupku.

Rezultati pokusa potvrđuju mogućnost prijenosa VTEC O157:H7 kroz more i koncentriranje bakterije u organima školjkaša do količine od 9200 MPN *E. coli* O157:H7/100g kroz samo sat vremena.



**Slika 29.** ELISA test na uzorcima iz pokusa onečišćenja živih školjkaša putem mora i pozitivnim izolatima *E. coli* iz školjkaša u PCR testu (oznake 39-120)

**Legenda:**

narančasta i žuta boja jažica – prisutnost Stx / prozirna do izrazito svjetlo žuta – odsutnost Stx;

+ pozitivna kontrola proizvođača / - negativna kontrola proizvođača;

**B1 - B2**, dagnje iz kontaminiranih bazena, 2 ponavljanja pretrage;

**MF B1**, kolonije dobivene membranskom filtracijom mora na O157:H7 ID agaru;

**K B1; K B2**, kolonije izolirane na O157:H7 ID agaru iz uzoraka (slika 28);

**K O157**, laboratorijska pozitivna kultura (1 CFU *E. coli* O157:H7u 10mL mTSBN);

**39/3;43/4;53/4;116/7;120/1-4** pohranjene kolonije na STOCK agaru PCR pozitivnih kultura

### 5.2.5. Osjetljivost, specifičnost i podudarnost ELISA metode

Iz gore navedenih pokusa usporedbom s klasičnom metodom izolacije VTEC O157:H7, metoda 3, određena je osjetljivost, specifičnost i podudarnost ELISA metode (tablica 16). Sve vrijednosti CFU su izražene na 25g uzorka radi ujednačavanja s metodom izdvajanja *E. coli* O157:H7 (metoda 3).



**Tablica 16.** Usporedba osjetljivosti, specifičnosti i podudarnosti ELISA metode s klasičnom kulturelnom metodom 3

Oznaka uzorka	Razina prirodnog / umjetnog zagađenja <i>E. coli</i> non O157:H7 <sup>a</sup>	Razina kontaminacije sa VTEC O157:H7 CFU/25g	Broj pozitivnih / broj pretraženih		
			metoda 3	ELISA (u mTSBN)	ELISA bez inkubacije <sup>b</sup>
989 dagnje	<5 CFU/25g (<20 MPN/100g)	5	1/1	1/1	/
		35	1/1	1/1	/
		200	1/1	1/1	/
		nenacijepljen	0/1	0/1	/
1000 dagnje	275 CFU/25g (1100 MPN/100g)	5	1/1	1/1	/
		35	1/1	1/1	/
		200	1/1	1/1	/
		nenacijepljen	0/1	0/1	/
2268 dagnje	<5 CFU/25g (<20 MPN/100g)	6,25	1/1	1/1	0/1
		47,5	1/1	1/1	0/1
		1125	1/1	1/1	0/1
		nenacijepljen	0/1	0/1	0/1
2270 dagnje	1350 CFU/25g (5400 MPN /100g)	6,25	1/1	1/1	0/1
		47,5	1/1	1/1	0/1
		1125	1/1	1/1	0/1
		nenacijepljen	0/1	0/1	0/1
2920 dagnje	<5 CFU/25g (<20 MPN/100g)	2 x 10 <sup>5</sup>	1/1	1/1	0/1
		2 x 10 <sup>6</sup>	1/1	1/1	1/1
		nenacijepljen	0/1	0/1	0/1
2946 prnjavice	1350 CFU/25g (5400 MPN /100g)	2 x 10 <sup>5</sup>	1/1	1/1	0/1
		2 x 10 <sup>6</sup>	1/1	1/1	1/1
		nenacijepljen	0/1	0/1	0/1
B1	20 CFU/25g	575 <sup>c</sup>	2/2	2/2	/
B2	57 CFU/25g	30 <sup>c</sup>	2/2	2/2	/
<b>Σ</b>			26	26	14
Broj pozitivnih uzoraka			20	20/20	2/10
Broj negativnih uzoraka			6	6/6	4/4
<b>Osjetljivost (%)</b>				<b>100</b>	<b>20</b>
<b>Specifičnost (%)</b>				<b>100</b>	<b>100</b>
<b>Podudarnost (%)</b>				<b>100</b>	<b>43</b>

**a** - preračunato iz očitanih MPN vrijednosti; sve vrijednosti CFU su izražene na 25g uzorka radi ujednačavanja s metodom izdvajanja *E. coli* O157:H7;

**b** - umjesto diluenta po protokolu proizvođača ELISA postupku za feces, korišten je MRD - diluent za maksimalni oporavak *E. coli* (ISO/TS 16649-3:2005);

**c**- prosječna vrijednost iz 2 ponavljanja pretrage uzoraka kontaminiranih filtracijom zagađenog mora;

/ - metoda nije primijenjena u navedenim uzorcima

ELISA metoda za određivanje Stx upotrijebljena bez umnažanja, na supernatantima homogeniziranih školjkaša u diluentu za oživljavanje (MRD) dala je rezultat od samo 20% osjetljivosti i 43% podudarnosti uz visoku razinu zagađenja od  $2 \times 10^6$  CFU/25g.

Istom ELISA metodom upotrijebljenom u supernatantima umnoženih kultura u mTSB s novobiocinom i na najmanjoj razini zagađenja od 5 CFU/25g detektiran je isti broj pozitivnih i negativnih uzoraka kao kod metode klasične izolacije VTEC O157:H7. To rezultira sa 100% osjetljivosti i specifičnosti, te podudarnosti od 100%.

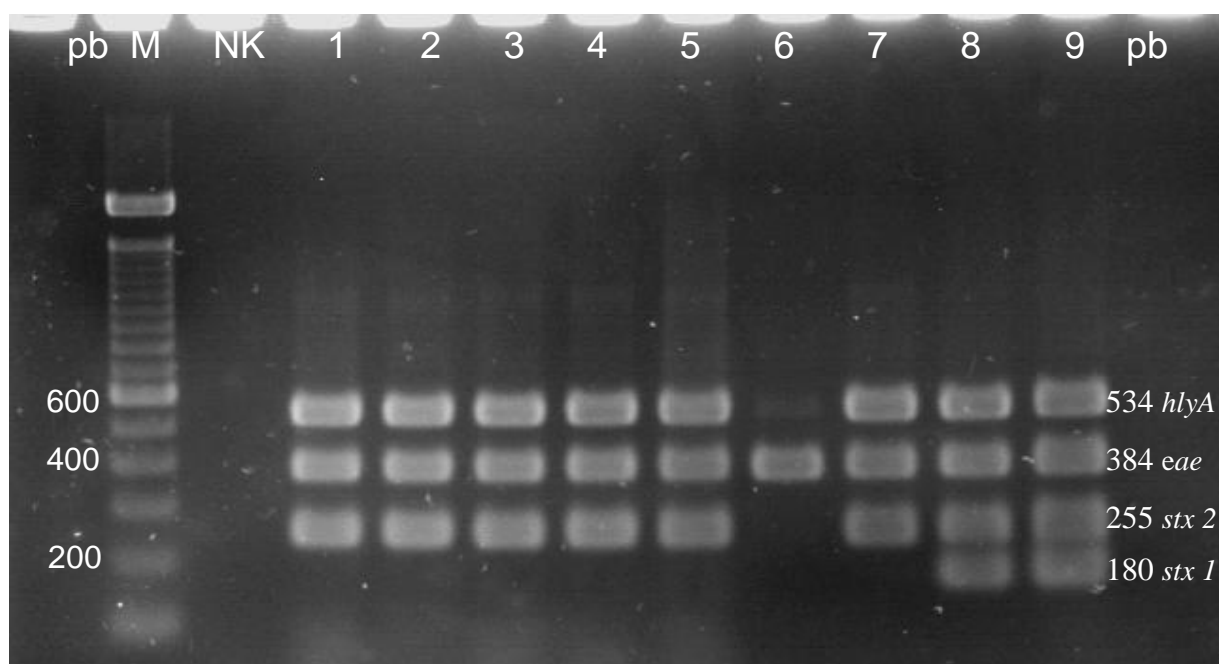
Granica detekcije ELISA testa s umnažanjem, izabranog za daljnju pretragu uzoraka školjkaša, jednaka je upravo najmanjoj količini dodane ciljane VTEC pri kojoj su dokazani verotoksini u 25g homogenata školjkaša. Granica detekcije kod prirodno kontaminiranih uzoraka gdje je odnos VTEC naprema non-VTEC; 1:50, iznosi 5 CFU/25g, a kod umjetno kontaminiranih uzoraka gdje je količina kompetitivne non-VTEC 215 puta veća od VTEC iznosi 6,25 CFU/25g.

Dodatno, uz proizvođačku kontrolu uz svaki ELISA test radi usporedne kontrole bujona, postupka centrifugiranja, pripreme supernatanta i izvođenja samog postupka korišteno je  $10^{-1}$  razrjeđenje kulture *E. coli* O157:H7 umnožene preko noći u mTSBN, te je svaki put dobiven rezultat očitavanja prisutnosti Stx.

### **5.3. Verifikacija PCR metode**

Izbor pozitivne kontrole za stalnu provjeru pravilne primjene PCR postupka tijekom pretrage testnih uzoraka verificirana je bakterijskim kulturama koje sigurno posjeduju *stx* gene (VTEC O157:H7, porijeklo ISS Teramo), te ekstrahiranim DNA *E. coli* iz ljudi sa simptomima HUS-a. Određena pozitivna kontrola je ekstrahirana DNA uzorka s najviše ciljanih gena, oznaka 8 i 9 na slici 30, u kojima su očitani bandovi (180, 255, 384 i 534 pb) za sva četiri gena.

Verifikacija PCR metode koja je osim potvrde učinkovitosti postupka pozitivnom kontrolom obuhvatila i parametre utjecaja pohrane kultura, pripreme uzorka i transporta kultura, te spajanja kultura različitih količina ciljane i neciljane DNA u zajedničkom pulu, prikazana je slikom 30.



**Slika 30.** Verifikacija PCR postupka i izbor pozitivne kontrole

**M** - marker s označenim bandovima od 200, 400 i 600 pb; **NK** – negativna kontrola; **1.** jedna kolonija VTEC O157:H7 u 75 µl DNA free vode (1 pasaža pohranjene kulture stare godinu dana); **2.** više kolonija VTEC O157:H7 u 75 µl DNA free vode (2 pasaža); **3.** miješana kultura jedne kolonije VTEC O157:H7 i po nekoliko kolonija po soju non-VTEC, ATCC 8739; 35218; 25922 u 75 µl DNA free vode; **4.** miješana kultura jedne kolonije VTEC O157:H7 sa punom ezom kulture po soju non-VTEC, ATCC 8739; 35218; 25922 u 75 µl DNA free vode; **5.** čista kultura *E. coli* O157:H7 s KA pripremljenog u HVI-Zagreb (ostali uzorci bakterijskih kultura su pripremljeni u lab. S-2 VZS); **6.** izolirana DNA *E. coli* O:26 iz ljudi sa simptomima HUS-a; **7.** izolirana DNA *E. coli* O:111 iz ljudi sa simptomima HUS-a; **8. i 9.** izolirane DNA *E. coli* iz ljudi sa simptomima HUS-a sa prije utvrđenim genom samo za intimidin (*eae*)

Na slici 30 vidljivo je da bez obzira da li se radilo o čistoj kulturi (kultura broj 1, 2 i 5) ili pulu koji se sastojao od samo jedne kolonije *E. coli* O157:H7 sa znatno većom količinom drugih *E. coli* (kultura broj 4) uvijek imamo 3 banda s istim parovima baza tj. pozitivan PCR rezultat. Također, nema razlike u rezultatu transportirane i pohranjene kulture stare godinu dana (kultura broj 1) ili netom pripremljene kulture VTEC (kultura broj 5).

#### 5.4. Rezultati pretrage školjkaša na prisutnost verotoksigena *E. coli* u proizvodnim područjima školjkaša dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana

Rezultati ciljane pretrage školjkaša na prisutnost VTEC u proizvodnim područjima školjkaša dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana, statistički su obrađeni s obzirom na utjecaj vrste školjkaša, proizvodnih područja i vrijednosti MPN *E. coli*/100g. Također su prikazani rezultati prisutnosti EPEC u školjkašima kao dodatni nalaz u PCR postupku za otkrivanje VTEC. Obrađene su međusobne razlike između vrsta školjkaša i proizvodnih područja s obzirom na pojavnost *E. coli* i vrijednosti MPN *E. coli*/100g, kao i kronološke i sezonske razlike u pojavnosti VTEC i EPEC.

Rezultati su prikazani na grafikonima 3 – 23 i u tablicama 17 – 29.

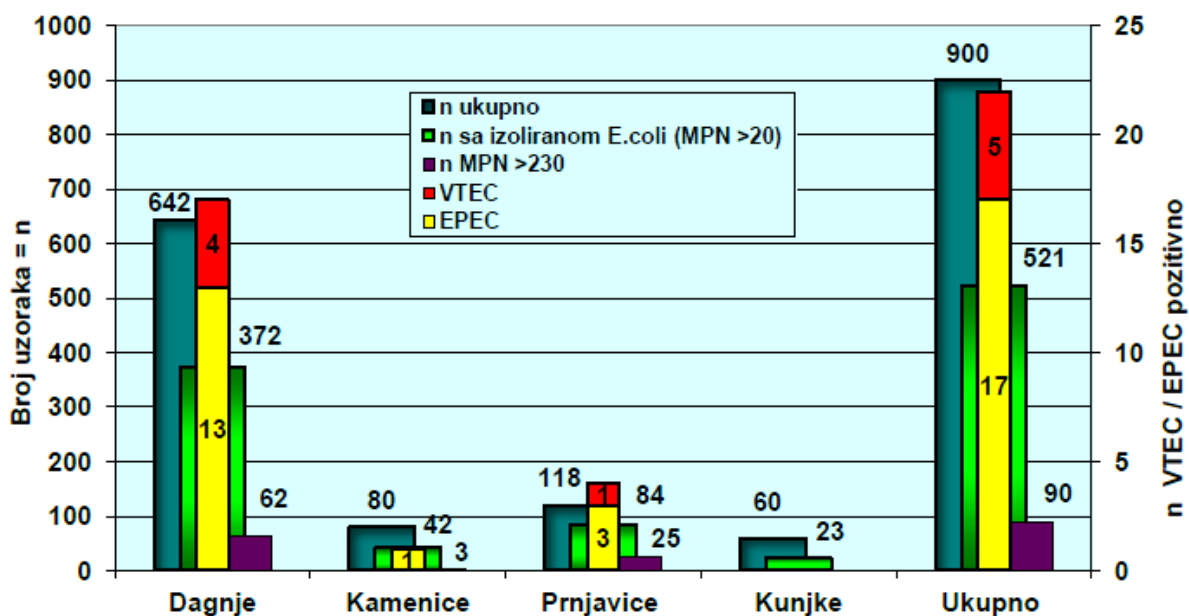
##### 5.4.1. Odnos uzoraka školjkaša s izoliranom *E. coli* i ukupnog broja pretraženih školjkaša

Uzorak od ukupno 900 školjkaša sadržavao je 71,3% dagnji, 8,9% kamenica, 13,1% prnjavica i 6,7% kunjki. U 521 (57,9%) uzorku utvrđena je *E. coli* (dalje izolirana *E. coli* ili >20 MPN). Utvrđena je *E. coli* u 41,3% pretraženih uzoraka dagnji, 4,7% kamenica, 9,3% prnjavica i 2,6% kunjki u odnosu na ukupni broj pretraženih školjkaša (tablica 17). U tablici 17 prikazani su i rezultati utvrđenog broja školjkaša unutar pojedine vrste u kojima je izolirana *E. coli*. Tako je bakterija utvrđena u 57,9% uzoraka dagnji 52,5% kamenica, 71,2% prnjavica i 38,3% kunjki.

**Tablica 17.** Udjeli uzoraka školjkaša s izoliranom *E. coli* u ukupnom broju pretraženih školjkaša po vrstama

Vrsta školjkaša	n	Udio vrste pretraženih školjkaša, %	Udio školjkaša s izoliranom <i>E. coli</i> , %	
			u odnosu na ukupni broj uzoraka, %	u odnosu na vrstu, %
Dagnje	642	71,3	41,3	57,9
Kamenice	80	8,9	4,7	52,5
Prnjavice	118	13,1	9,3	71,2
Kunjke	60	6,7	2,6	38,3
Ukupno	900	100,0	57,9	/

Odnos vrsta školjkaša u broju uzoraka s izoliranom *E. coli* (vrijednosti >20 MPN /100g školjkaša) prema ukupnom broju pretraženih školjkaša po vrstama, uz utvrđene VTEC i EPEC pozitivne uzorke prikazan je na grafikonu 3. Na istom grafikonu, također je naveden broj uzoraka s vrijednosti >230 MPN/100g u određenoj vrsti školjkaša (neispravni uzorci za tržište po Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/08).



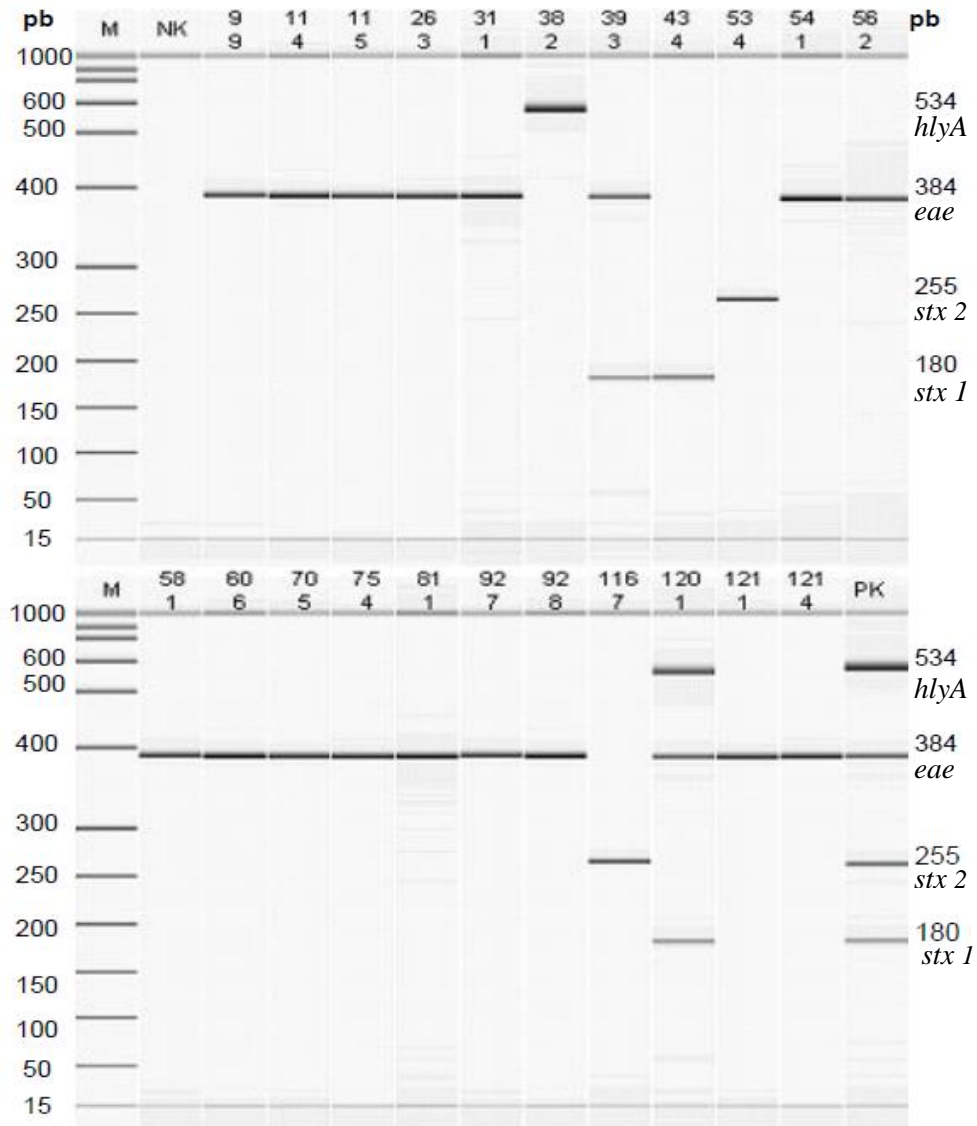
**Grafikon 3.** Broj uzoraka školjkaša sa izoliranom *E. coli*, VTEC i EPEC, prema broju pretraženih školjkaša

#### 5.4.2. Dokaz VTEC i EPEC PCR metodom nalaza gena u kulturama *E. coli*

Multipleks PCR pretragom su najprije utvrđene VTEC/EPEC zajedničke pozitivne kulture (pul) koje su se sastojale od do deset oživljenih kultura *E. coli* s agara za konzerviranje, izoliranih iz različitih uzoraka školjkaša u istraživanom periodu. Nakon toga su iz utvrđenog pozitivnog pula ponovnim PCR testom iz pojedinačnih kultura *E. coli*, identificirane one koje su sadržavale tražene gene, a time je utvrđen VTEC i EPEC pozitivan uzorak školjkaša (slika 31, tablice 18 i 19).

Bakterija *E. coli* izolirana je iz 521 uzorka školjkaša, a ukupno 1100 kultura je uzeto u daljnju pretragu PCR postupkom na prisutnost verotoksigenih gena i dodatnih virulentnih markera. Sveukupno je prisutnost traženih gena utvrđena u 22 bakterijske kulture koje su potjecale od 22 uzoraka školjkaša. U pet uzoraka je potvrđena prisutnost verotoksigenih *E. coli*-VTEC, a na osnovi nađenih samo *eae* gena dodatno i 16 enteropatogenih *E. coli* - EPEC.

U jednoj od izoliranih kultura *E. coli*, utvrđen je samo *hlyA* gen za enterohemolizin, karakterističan i za enterohemoragične *E. coli* (EHEC) kao podskupinu VTEC. Radi daljnje statističke obrade podataka pošto u ovom soju nisu utvrđeni *stx* geni pridružen je ostalim utvrđenim dijaroičnim *E. coli* što sačinjava ukupno 17 EPEC kultura

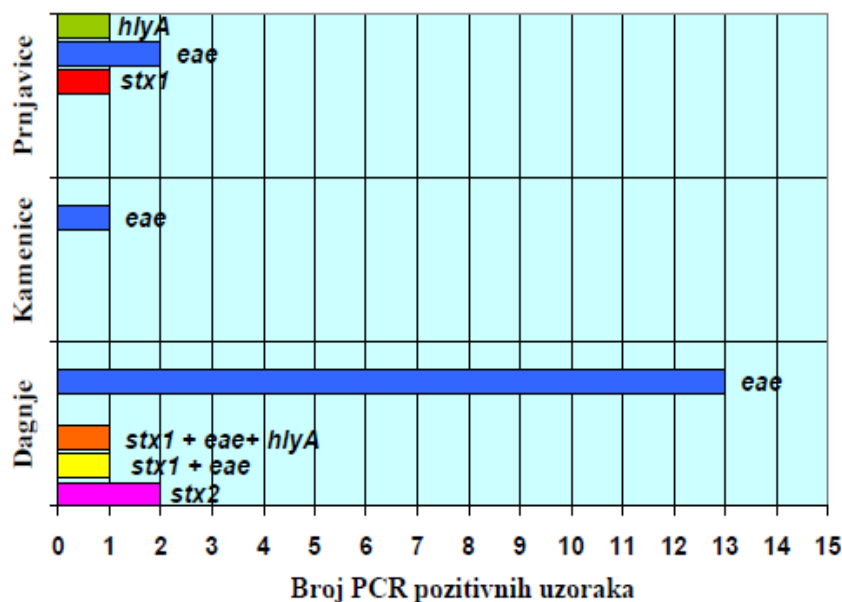


**Slika 31.** PCR pozitivne kulture *E. coli* iz pojedinačnih uzoraka školjkaša

pb-parovi baza, NK – linija negativne kontrole, PK – linija pozitivne kontrole sa veličinom banda 180, 255, 384 i 534 pb, M – marker s oznakom bandova od 15, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800 i 1000 pb

PCR pretragom izoliranih kultura *E. coli* iz uzoraka na prisutnost Shiga toksina (*stx1* i *stx2*), gena za intimin (*eae*) i enterohemolizin (*hlyA*), u pet kultura utvrđeni su *stx1* ili *stx2* geni za VTEC. Čak 3/5 pohranjenih kultura identificiranih kao VTEC nose *stx1* gene, a 2/5 nose *stx2*.

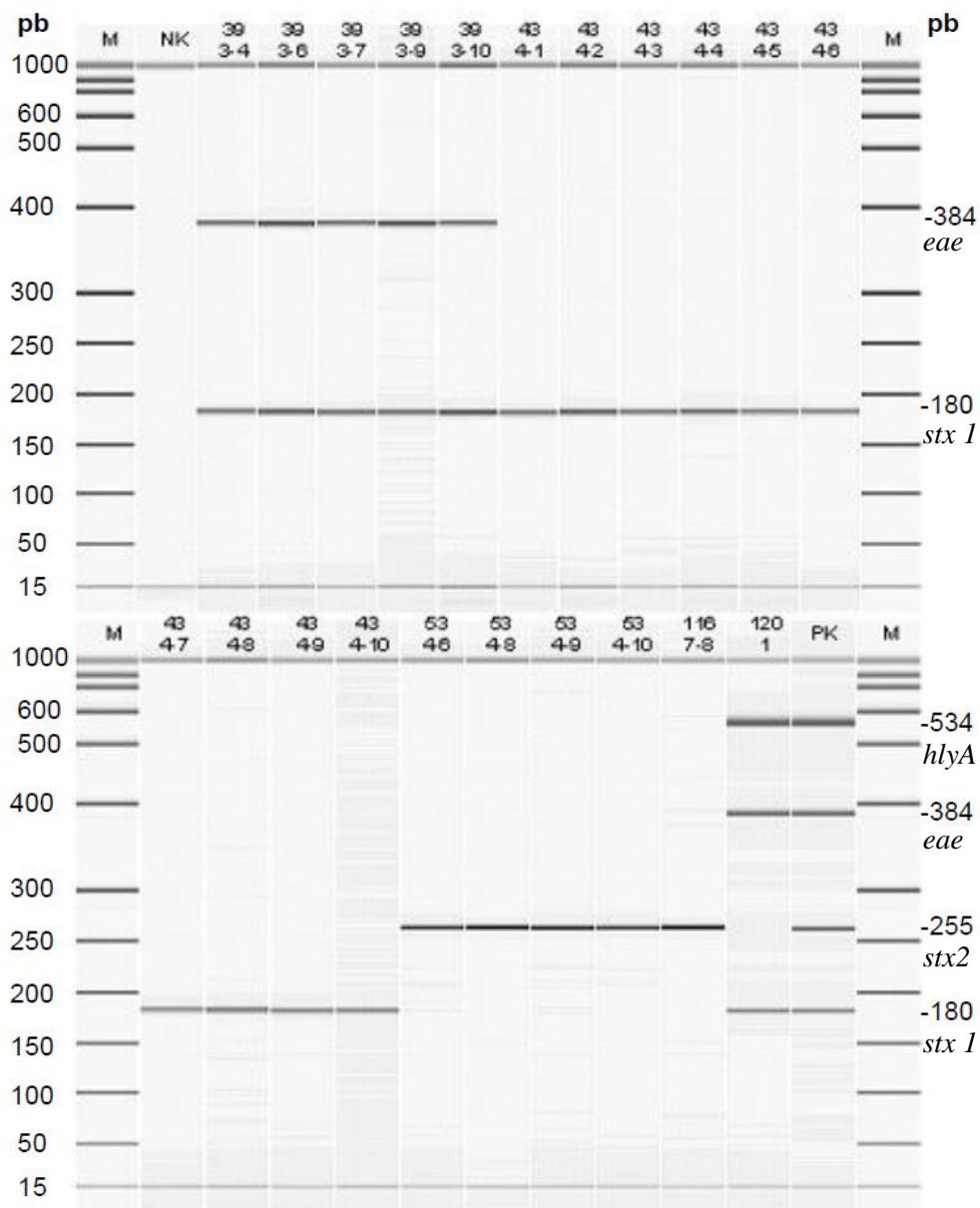
U 2/5 VTEC utvrđena je prisutnost i *eae* dodatnih virulentnih gena, a *hlyA* gen je utvrđen u 1/5 kulturi VTEC koja je imala i *stx1* i *eae* gene. U ostalih 17 kultura *E. coli* utvrđena je samo prisutnost gena dodatnih virulentnih faktora i to, u 16 kultura *eae* gen koji je sam, bez *stx* gena, pokazatelj pripadnosti EPEC patotipa i jedna kultura *E. coli* s *hlyA* genom. Kombinacije gena markera za VTEC i dodatnih virulentnih gena prikazane su u grafikonu 4.



**Grafikon 4.** Distribucija gena unutar vrsta školjkaša

*Stx 1* i *stx2* genotipovi su jednako zastupljeni u dagnjama (2:2), dok je među prnjavicama dokazan samo genotip *stx1*. To je 100% -tna zastupljenost *stx2* genotipa u dagnjama dok je *Stx 1* genotip raspoređen u dagnjama – 67% i u prnjavicama – 33%. U ostalim vrstama školjkaša nisu dokazani *stx* geni. Od *eae* pozitivnih izolata 83% je utvrđeno u dagnjama, 6% u kamenicama i 11% u prnjavicama. *HlyA* geni su utvrđeni u dvije kulture *E. coli*, jedan u dagnjama i jedan u prnjavicama.

Za daljnje određivanje serotipa i pohranu VTEC/EPEC „čistih“ izolata iz pozitivnih PCR kultura *E. coli*, uzastopnom subkultivacijom iscrpljivanjem na TBX i izolacijom na krvnom agaru dobivene su pojedinačne kolonije, te su ponovo pretražene u PCR postupku (slika 32). Provjerenim testom pojedinačnih kolonija PCR pozitivnih VTEC kultura, potvrđeni su *stx* geni u uzorcima 39-3, 43-4, 53-4 i 116-7 u broju kolonija od 1 do 10 ovisno o uzorku. U uzorku oznake 120-1 u 30 pojedinačnih kolonija nisu ponovo utvrđeni *stx* i *hlyA* geni, a potvrđena je prisutnost *eae* gena. Ponovljeni multipleks PCR test na prethodno izdvojenoj i pohranjenoj DNA iz kulture *E. coli* uzorka 120-1 dao je identičan rezultat kao i prvi put (slika 32).



**Slika 32.** Zastupljenost VTEC kolonija unutar PCR pozitivnih *E. coli* kultura iz pojedinog uzorka školjkaša

pb-parovi baza, NK – linija negativne kontrole, PK – linija pozitivne kontrole sa veličinom bandova 180, 255, 384 i 534 pb, M – marker s oznakom bandova od 15, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800 i 1000 pb, linije 39 do 116 su PCR pozitivne pojedinačne kolonije iz *E. coli* kultura pojedinačnog uzorka; linija 120-1 je ponovljen test na pohranjenoj DNA *E. coli* kulture uzorka (u pojedinačnim kolonijama nisu utvrđeni *stx* geni)



### 5.4.3. Genotipske i fenotipske karakteristike PCR pozitivnih kultura *E. coli*

**Tablica 18.** Karakteristike kultura VTEC izdvojenih iz školjkaša

Vrsta školjkaša	Oznaka	<i>stx 1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>hlyA</i>	Serotip <sup>a</sup>	Stx ELISA		β-GLUC	SOR
							uzorak <sup>b</sup>	izolati <sup>c</sup>		
Dagnje	81-1	-	-	+	-	na	np	/	+	+
Dagnje	92-7	-	-	+	-	O:103	np	/	+	+
Dagnje	92-8	-	-	+	-	na	np	/	+	+
Dagnje	75-4	-	-	+	-	O:128	np	/	+	+
<b>Dagnje</b>	<b>53-4</b>	-	+	-	-	<b>O:78</b>	np	+	+	+
Prnjavice	54-1	-	-	+	-	na	np	/	+	+
Dagnje	56-2	-	-	+	-	na	np	/	+	+
Dagnje	58-1	-	-	+	-	O:126	np	/	+	-
Dagnje	60-6	-	-	+	-	O:125	np	/	+	+
Kamenice	70-5	-	-	+	-	O:127	np	/	+	+
<b>Prnjavice</b>	<b>43-4</b>	+	-	-	-	<b>O:55</b>	+	+	+	+
Prnjavice	9-9	-	-	+	-	na	-	/	+	+
Dagnje	11-4	-	-	+	-	na	-	/	+	+
Dagnje	11-5	-	-	+	-	na	-	/	+	+
Dagnje	26-3	-	-	+	-	na	np	/	+	-
Dagnje	31-1	-	-	+	-	na	np	/	+	-
Prnjavice	38-2	-	-	-	+	na	np	/	+	+
<b>Dagnje</b>	<b>39-3</b>	+	-	+	-	<b>O:55</b>	np	+	+	+
<b>Dagnje</b>	<b>116-7-8</b>		+	-	-	<b>O:7</b>	np	+	+	+
<b>Dagnje</b>	<b>120-1</b>	+	-	+	+	<b>O:78</b>	np	-	+	+
Dagnje	121-1	-	-	+	-	na	np	/	+	+
Dagnje	121-4	-	-	+	-	na	np	/	+	+

<sup>a</sup> na-nije aglutinabilan sa antiserumima O4, O18, O25, O26, O44, O55, O78, O86, O91, O103, O26, O104, O111, O112, O114, O118, O119, O124, O125, O126, O127, O128, O142, O145, O157, O164.

<sup>b</sup> ELISA je tijekom 2009. godine primjenjena u obogaćenim kulturama u mTSBN od 258 uzoraka, ostali uzorci nisu pretraženi ovom metodom (np - nije pretraženo)

<sup>c</sup> provjera sposobnosti proizvodnje toksina u PCR *stx* pozitivnim pojedinačnim izolatima

Sve utvrđene VTEC i EPEC kulture su kao većina non-O157:H7 *E. coli* sojeva  $\beta$ -glukuronidaza pozitivne (22/22, 100%), dok sorbitol na agaru fermentira 14 od 17 EPEC kultura (82%) i svi VTEC sojevi (5 ili 100%) što je prikazano u tablici 18.

ELISA metodom verificiranom u ovom radu, na prisutnost VTEC pretražen je dio školjkaša tijekom 2009. godine. Na prisutnost verotoksina pretraženo je 258 uzoraka, što čini 29% uzoraka školjkaša pretraženih ovom metodom. Pretragom kulture školjkaša obogaćene preko noći na prisutnost verotoksina 1 i 2 (Stx) utvrđen je jedan pozitivan uzorak (43-4), iz kojega su pohranjeni izolirani *E. coli* sojevi također potvrđeni i PCR postupkom kao VTEC (tablica 18).

Sposobnost proizvodnje verotoksina u izolatima koji su dali PCR pozitivni nalaz potvrđena je ELISA metodom u četiri uzorka, dok u petom uzorku VTEC (120-1), u pojedinačnim kolonijama uzorka nisu utvrđeni verotoksini (sukladno odsutnosti *stx* gena).

Od 900 uzoraka pretraženih školjkaša izolirano je 27 izolata *E. coli* koji su imali tipične morfološke karakteristike za serotip O157:H7,  $\beta$ -glukuronidaza i sorbitol negativan. Aglutinacija ovih izolata lateks testom za *E. coli* O157:H7, kao i kasnije živih i kuhanih kultura sa antiserumima za *E. coli* O157, dala je negativan rezultat. U ovim sojevima nije utvrđena prisutnost traženih virulentnih gena, pa dalje nisu razmatrani u istraživanju.

Serotipizacijom živih i kuhanih kultura VTEC i EPEC, s raspoloživim O antiserumom serotipova VTEC/EPEC koji su u najčešćoj uporabi u determinaciji humanih sojeva za ovo područje (tablica 18), utvrđeno je pet VTEC kultura u kojima su aglutinacijom određena tri različita serotipa, O7, O55 i O78.

Dodatno je uspješno serotipizirano pet od ukupno 17 izolata EPEC, te su utvrđeni serotipovi O103, O125, O126, O127, O128, dok je jedan soj bio O rough. Sve VTEC (i EPEC) kulture su bile morfološki i serološki aglutinacijom negativne na serotip O157:H7.

#### **5.4.4. Područja i točke uzorkovanja školjkaša s utvrđenim VTEC/EPEC**

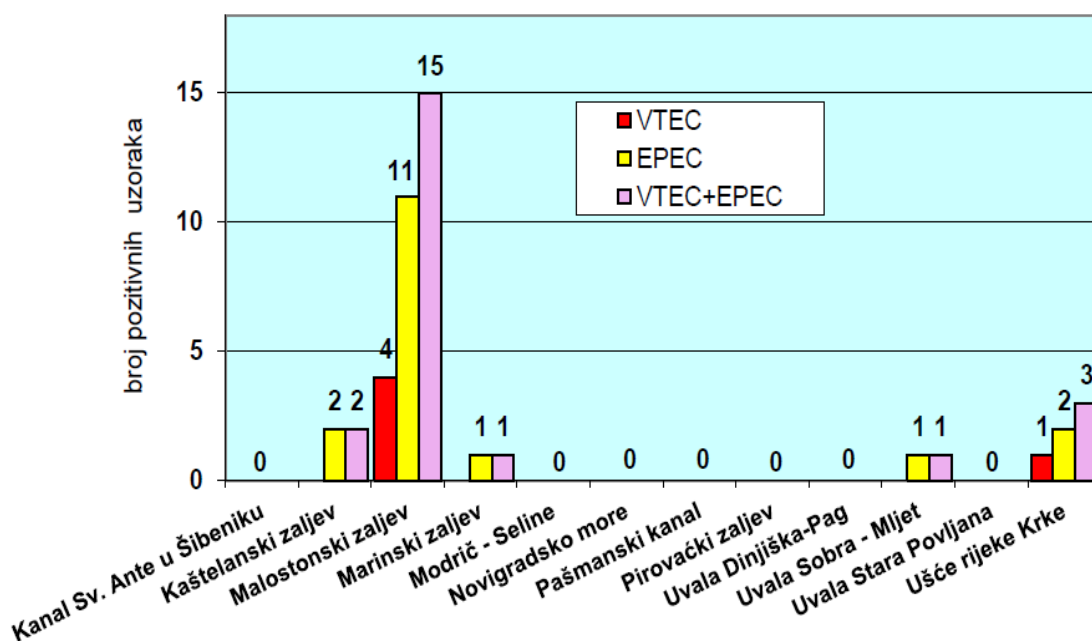
VTEC i EPEC pozitivni uzorci školjkaša navedeni su po kronološkom redu pojavljivanja, s identifikacijom proizvodnog područja, oznake točke uzorkovanja, vrste školjkaša i vrijednosti MPN *E. coli*/100g školjkaša u tablici 19.

**Tablica 19.** Nalaz VTEC/EPEC u školjkašima prema kronološkom redu i točkama uzorkovanja

Oznaka	Mjesec / godina	Patotip	Proizvodno područje	Naziv točke uzorkovanja	MPN <i>E. coli</i> /100g	Vrsta školjkaša
81-1	listopad-07	EPEC	Uvala Sobra Mljet	Sobra M1	40	Dagnje
92-7	prosinac-07	EPEC	Malostonski Zaljev	Brijesta I M14	220	Dagnje
92-8	prosinac-07	EPEC	Malostonski Zaljev	Blaževo M17	40	Dagnje
75-4	ožujak-08	EPEC	Marinski Zaljev	Stipan Jaz M1	20	Dagnje
53-4	listopad-08	<b>VTEC</b>	Malostonski Zaljev	Bjejevica M12	20	Dagnje
54-1	travanj-08	EPEC	Kaštelanski Zaljev	Trogirski Kanal M3	90	Prnjavice
56-2	studen-08	EPEC	Malostonski Zaljev	Bistrina M11	80	Dagnje
58-1	studen-08	EPEC	Ušće Rijeke Krke	Šibenik IV M4	50	Dagnje
60-6	prosinac-08	EPEC	Ušće Rijeke Krke	Strmica M6	170	Dagnje
70-5	prosinac-08	EPEC	Malostonski Zaljev	Sutvid M19	170	Kamenice
43-4	lipanj-09	<b>VTEC</b>	Malostonski Zaljev	Malostonski Zaljev M1	130	Prnjavice
9-9	srpanj-09	EPEC	Malostonski Zaljev	Malostonski Zaljev M1	230	Prnjavice
11-4	kolovoz-09	EPEC	Malostonski Zaljev	Soca M8	20	Dagnje
11-5	kolovoz-09	EPEC	Malostonski Zaljev	Soca M9	50	Dagnje
26-3	siječanj-10	EPEC	Malostonski Zaljev	Kabli M16	40	Dagnje
31-1	veljača-10	EPEC	Malostonski Zaljev	Soca M9	20	Dagnje
38-2	veljača-10	EPEC*	Kaštelanski Zaljev	K.Gomilica M7	790	Prnjavice
39-3	veljača-10	<b>VTEC</b>	Malostonski Zaljev	Brijesta II M15	2400	Dagnje
116-7-8	lipanj-10	<b>VTEC</b>	Ušće Rijeke Krke	Šibenik I M1	16000	Dagnje
120-1	lipanj-10	<b>VTEC</b>	Malostonski Zaljev	Usko-Kanal M13	2400	Dagnje
121-1	lipanj-10	EPEC	Malostonski Zaljev	Bjejevica M12	700	Dagnje
121-4	lipanj-10	EPEC	Malostonski Zaljev	Banje M7	230	Dagnje

\*utvrđen je samo *hlyA* gen za enterohemolizin, pa je dalje kultura pribrojena u ostale patogene *E. coli*; EPEC

Na grafikonu 5 prikazana su proizvodna područja iz kojih su potjecali uzorci školjkaša. VTEC pozitivni uzorci nađeni su u dva, a EPEC pozitivni uzorci u pet područja (n=12).



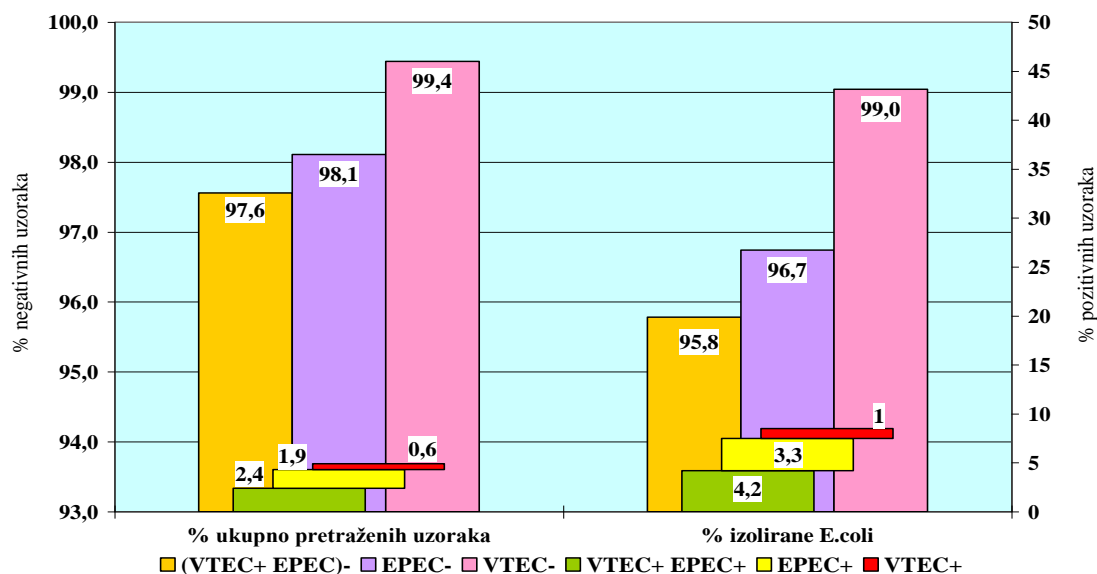
**Grafikon 5.** Proizvodna područja sa utvrđenim VTEC i EPEC u uzorcima školjkaša

#### 5.4.5. Prevalencija VTEC/EPEC u školjkašima dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana

U ukupno pretraženim uzorcima školjkaša u Dalmaciji i uzorcima s izoliranom *E. coli*, broj VTEC i EPEC pozitivnih uzoraka je naveden u tablici 20, a prevalencije su prikazane u grafikonu 6.

**Tablica 20.** Broj VTEC/EPEC u ukupno pretraženim i uzorcima s izoliranom *E. coli*

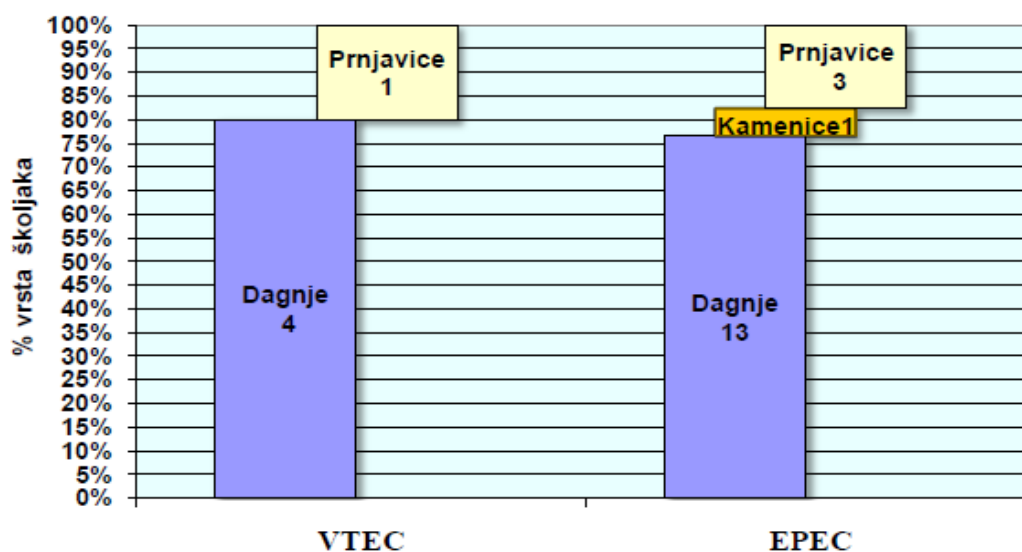
Broj uzoraka, n	VTEC	EPEC	VTEC+ EPEC
ukupno pretraženo	900	900	900
negativno	895	883	878
nalaz <i>E. coli</i>	521	521	521
negativno	516	504	499
<b>pozitivno</b>	<b>5</b>	<b>17</b>	<b>22</b>



**Grafikon 6.** Prevalencija VTEC i EPEC u ukupno pretraženim uzorcima i uzorcima s izoliranom *E. coli*

Kao VTEC potvrđeno je 1% kultura *E. coli* izoliranih iz 521 uzorka školjkaša, a EPEC 3,3%. Sveukupno je 4,2% kultura potvrđeno kao patogene dijaroične *E. coli*, VTEC+EPEC. Prevalencija u ukupnom broju pretraženih školjkaša za VTEC je 0,6% i 1,9% EPEC, odnosno 2,4% patogene *E. coli* (VTEC + EPEC).

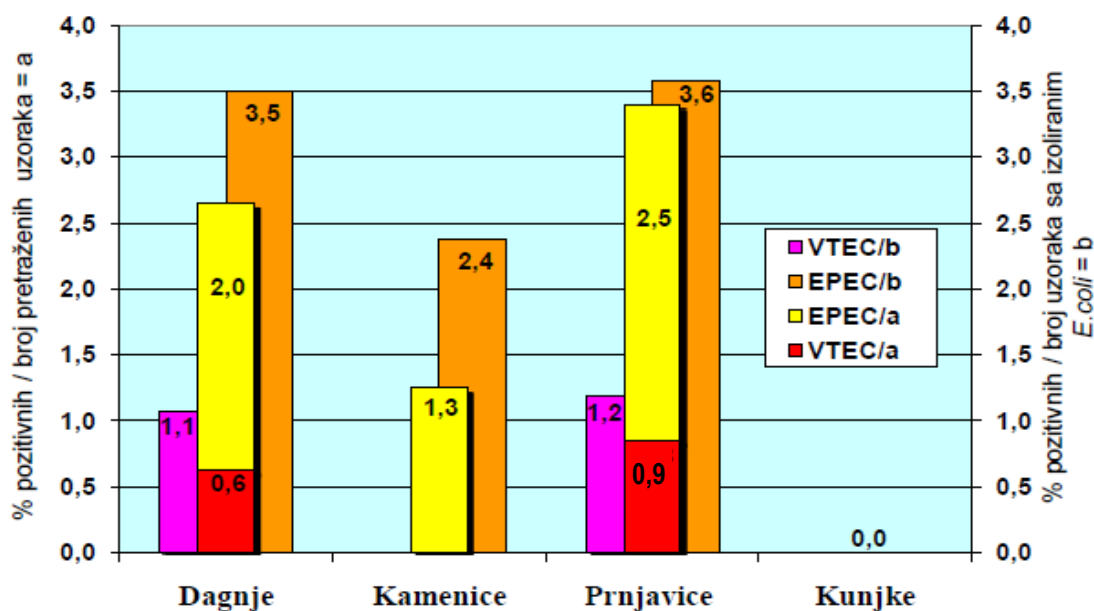
#### 5.4.6. Utjecaj vrste školjkaša na prevalenciju VTEC/EPEC i odnosi među vrstama



**Grafikon 7.** Udio pojedinih vrsta školjkaša u VTEC i EPEC uzorcima

U grafikonu 7 prikazani su udjeli pojedinih školjkaša s utvrđenim VTEC/EPEC uzorcima. Tako je 80% VTEC kultura utvrđeno u dagnjama, a 20% u prnjavicama. EPEC kulture su utvrđene u dagnjama (76%), prnjavicama (17,6%) i kamenicama (5,9%).

Odnosi broja uzoraka po vrstama školjkaša s obzirom na utvrđenu pojavnost VTEC i EPEC u izoliranim kulturama *E. coli*, kao i u ukupno pretraženim uzorcima prikazani su grafikonom 3, dok su njihove prevalencije prikazane u grafikonu 8.



**Grafikon 8.** Odnos prevalencija VTEC i EPEC u pretraženim uzorcima i uzorcima s izoliranom *E. coli* po vrstama školjkaša

Od 642 pretražena uzorka dagnji *E. coli* je izolirana u 372 uzorka, a sojevi VTEC u 4 ili 1,1% uz prevalenciju od 0,6%. U kulturama *E. coli* izoliranih iz prnjavica, utvrđen je jedan VTEC soj ili 1,2% što je prevalencija od 0,9% u odnosu na ukupni broj pretraženih prnjavica (n=118). U kamenicama i kunjkama nisu utvrđeni sojevi VTEC u izoliranim kulturama *E. coli* (tablica 21).

Iz kultura *E. coli* izoliranih iz dagnji EPEC sojevi su utvrđeni u 13 ili 3,5% uzoraka, što je prevalencija od 2,0%. U prnjavicama su sojevi EPEC utvrđeni u tri ili 3,6% uzoraka, što je 2,5% u odnosu na broj pretraženih prnjavica (n =118). U kamenicama je utvrđena samo jedna EPEC (2,4%) što je 1,3% u odnosu na broj pretraženih kamenica (n=80).U kunjkama u kojih je najmanji broj izoliranih kultura *E. coli* (23/60 ili 38,3%) nisu utvrđene EPEC. U kunjki VTEC i EPEC nisu utvrđene.

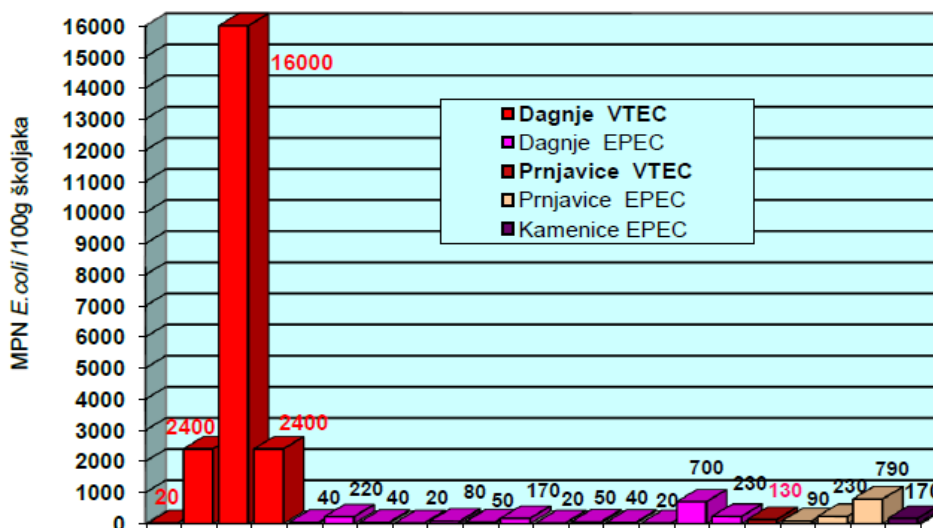
VTEC su gotovo podjednako utvrđene u dagnjama i prnjavicama, a nalaz EPEC je u dagnjama i prnjavicama učestaliji nego u kamenicama. Ipak opažene razlike u prevalenciji VTEC i EPEC, u ukupno pretraženim uzorcima između različitih vrsta školjkaša nisu statistički značajne ( $p = 0,8$ ), kao ni razlike u prevalenciji VTEC ( $p = 1$ ) i EPEC ( $p = 0,8$ ) iz kultura izoliranih *E. coli* (tablica 21).

**Tablica 21.** Razlike u učestalosti VTEC-EPEC između vrsta školjkaša

Vrsta školjkaša		Ukupno pretraženi uzorci					Izolirana <i>E. coli</i> (uzorci s >20MPN)				
		VTEC		EPEC		Ukupno	VTEC		EPEC		Ukupno
		neg	poz	neg	poz		neg	poz	neg	poz	
Dagnje	n	638	4	629	13	642	368	4	359	13	372
	%	99,38	<b>0,62</b>	97,98	2,02	100	98,92	<b>1,08</b>	96,51	3,49	100
Kamenice	n	80	0	79	1	80	42	0	41	1	42
	%	100	0	98,75	1,25	100	100	<b>0,0</b>	97,62	2,38	100
Prnjavice	n	117	1	115	3	118	83	1	81	3	84
	%	99,15	<b>0,85</b>	97,46	2,54	100	98,89	<b>1,19</b>	96,43	3,57	100
Kunjke	n	60	0	60	0	60	23	0	23	0	23
	%	100	0	100	100	100	100	0	100	0	100
Ukupno	n	895	5	883	17	<b>900</b>	516	5	504	17	<b>521</b>
	%	99,44	<b>0,56</b>	98,11	1,89	100	99,04	<b>0,96</b>	96,74	3,26	100

#### 5.4.7. Utjecaj MPN *E. coli* na pojavnost VTEC/EPEC u školjkašima

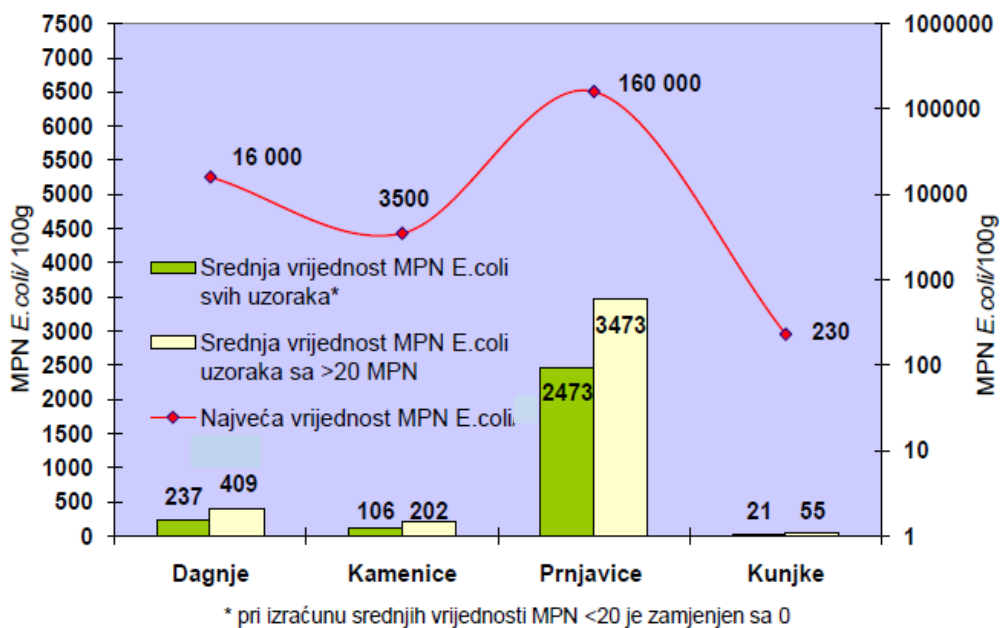
Vrijednosti MPN *E. coli* /100g VTEC/EPEC u uzorcima školjkaša su navedene u tablici 19 i prikazane grafikonom 9. Najveće vrijednosti MPN *E. coli*/100 g u uzorcima s potvrđenom VTEC uočene su u dagnjama (16000 MPN) kao i najniže vrijednosti (20 MPN), dok je u prnjavicama taj broj iznosio 130 MPN. Kod uzoraka školjkaša s pozitivnom EPEC, raspon vrijednosti je u prnjavica bio od 90 - 790 MPN/100 g, u dagnjama od 20 - 700 MPN *E. coli* /100g, a u kamenicama u jednom je uzorku vrijednost bila 170 MPN *E. coli* /100 g.



**Grafikon 9.** MPN *E. coli*/100 g u VTEC i EPEC pozitivnim uzorcima po vrstama školjkaša

#### 5.4.8. Odnos vrijednosti MPN *E. coli* različitih vrsta školjkaša

Odnos srednjih vrijednosti MPN *E. coli*/100 g uzoraka različitih vrsta školjkaša prikazani su u grafikonu 10. Srednje vrijednosti su izračunate dvojako. Prvim načinom su uzete u obzir sve vrijednosti uzorkovanih školjkaša među kojima su i uzorci s vrijednosti <20 MPN *E. coli*/100 g (vrijednost određena granicom detekcije metode, a označava uzorak u kojem zapravo nisu uočene *E. coli*) pa je navedena vrijednost radi izračuna zamijenjena s brojem 0.



**Grafikon 10.** Odnos srednjih i maksimalnih vrijednosti MPN/100g prema vrstama školjkaša



Drugi način je izračun srednjih vrijednosti MPN *E. coli*/100 g samo iz uzoraka s  $\geq 20$  MPN *E. coli*. Vrijednosti iz oba načina izračuna su u korelaciji, a najveće prosječne vrijednosti MPN *E. coli* uočene su u prnjavicama (3473 CFU *E. coli*/100 g), dok su najniže u kunjkama (55 CFU *E. coli*/100 g). Uočene razlike prosječnog MPN *E. coli* u 100 grama uzorka statistički se razlikuju između različitih vrsta školjkaša ( $p < 0,001$ ).

Uzorci po skupinama vrijednosti MPN *E. coli* /100 g različitih vrsta školjkaša s obzirom na prisutnost *E. coli* ( $\geq 20$  *E. coli*) i MPN  $>230$ , vrijednost koja je granica prihvatljivosti školjkaša za tržište po važećim pravilnicima RH, prikazani su u grafikonu 3.

U tablici 22 prikazane su razlike između vrsta školjkaša s obzirom na prisutnost *E. coli* i vrijednosti MPN *E. coli*/100 g. Najniža učestalost nalaza s izdvojenom *E. coli* iz 100 grama školjkaša uočena je kod kunjki (23 ili 38%), a najviša u prnjavica (84 ili 71%). Opažene razlike u učestalosti nalaza *E. coli* u 100 grama uzorka između različitih vrsta školjkaša također su statistički značajne ( $p < 0,001$ ).

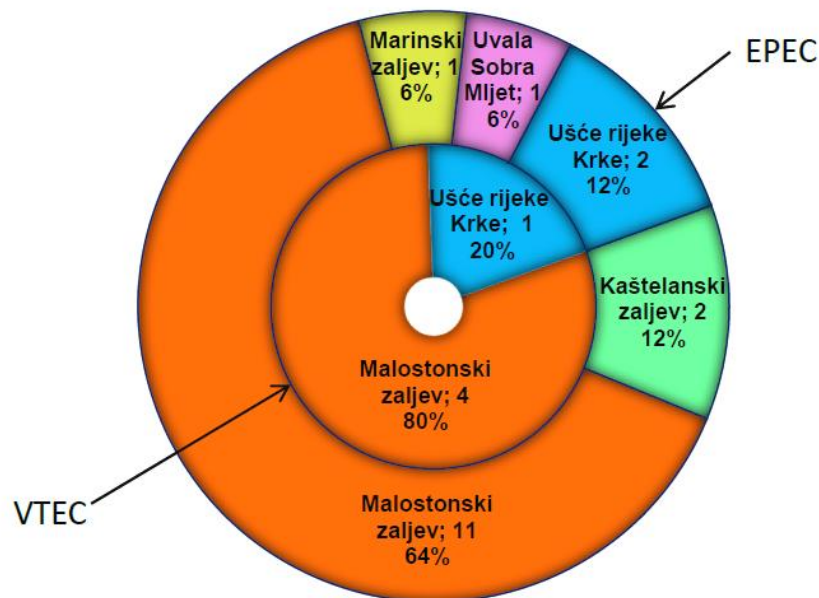
**Tablica 22.** Razlike između vrsta školjkaša s obzirom na prisutnost *E. coli* i nezadovoljavajuće vrijednosti MPN *E. coli*/100 g

MPN <i>E. coli</i> /100g		Uzorci bez utvrđene <i>E. coli</i> $<20$	Uzorci s izoliranom <i>E. coli</i> $\geq 20$	Mikrobiološki zadovoljavajući uzorci $<230$	Uzorci nezadovoljavajući za tržište $>230$	Ukupno
Vrsta						
Dagnje	n	270	372	580	62	642
	%	<b>42,06</b>	<b>57,94</b>	<b>90,34</b>	<b>9,66</b>	100
Kamenice	n	38	42	77	3	80
	%	<b>47,50</b>	<b>52,50</b>	<b>96,25</b>	<b>3,75</b>	100
Kunjke	n	37	23	60	0	60
	%	<b>61,67</b>	<b>38,33</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	100
Prnjavice	n	34	84	93	25	118
	%	<b>28,81</b>	<b>71,19</b>	<b>78,81</b>	<b>21,19</b>	100
Ukupno	n	379	521	810	90	900
	%	<b>42,11</b>	<b>57,89</b>	<b>90</b>	<b>10</b>	100

Najmanja učestalost nezadovoljavajućih uzoraka za stavljanje na tržište s  $>230$  MPN *E. coli* u 100 grama školjkaša je utvrđena kod kunjki (0/60 ili 0%), a najviša u prnjavica (25/118 ili 21,19%). Opažene razlike u učestalosti nezadovoljavajućih nalaza za tržište su između različitih vrsta školjkaša statistički značajne ( $p < 0,001$ ).

#### 5.4.9. Utjecaj različitih proizvodnih područja dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana na prevalenciju VTEC / EPEC i njihovi međusobni odnosi

U grafikonu 11 prikazana je zastupljenost proizvodnih područja (izlovna i uzgojna) u ukupnom broju uzoraka školjkaša u kojima su utvrđene VTEC/EPEC.



**Grafikon 11.** Prikaz odnosa proizvodnih područja prema zastupljenosti uzoraka s izdvojenom VTEC/EPEC u ukupnom broju pozitivnih uzoraka školjkaša

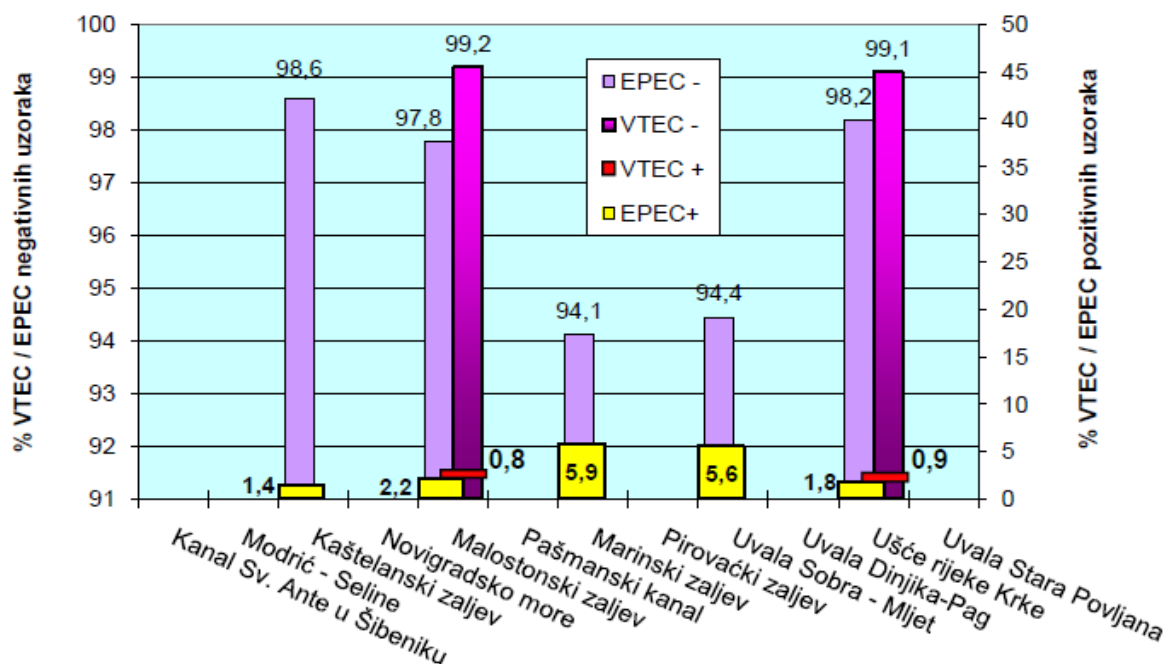
Najveći broj školjkaša koji su sadržavali VTEC u odnosu na ukupni broj pozitivnih uzoraka u Dalmaciji, utvrđen je u Malostonskom zaljevu (80%), dok su EPEC utvrđene u 64% svih uzoraka školjkaša. Ostali udio od 20% uzoraka s potvrđenim VTEC i 12% uzoraka s EPEC sojevima pripada području Ušća rijeke Krke, 12% Kaštelanskom zaljevu, a 6% od ukupno utvrđenih EPEC je raspodijeljeno na Uvalu Sobra i Marinski zaljev.

Odnosi proizvodnih područja s obzirom na utvrđenu pojavnost VTEC i EPEC u uzorcima s izoliranim sojevima *E. coli* i u ukupno pretraženim uzorcima, prikazani su u grafikonu 14, dok su prevalencije prikazane u grafikonima 12 i 13. Proizvodna područja su na grafikonima navedena abecednim redom.

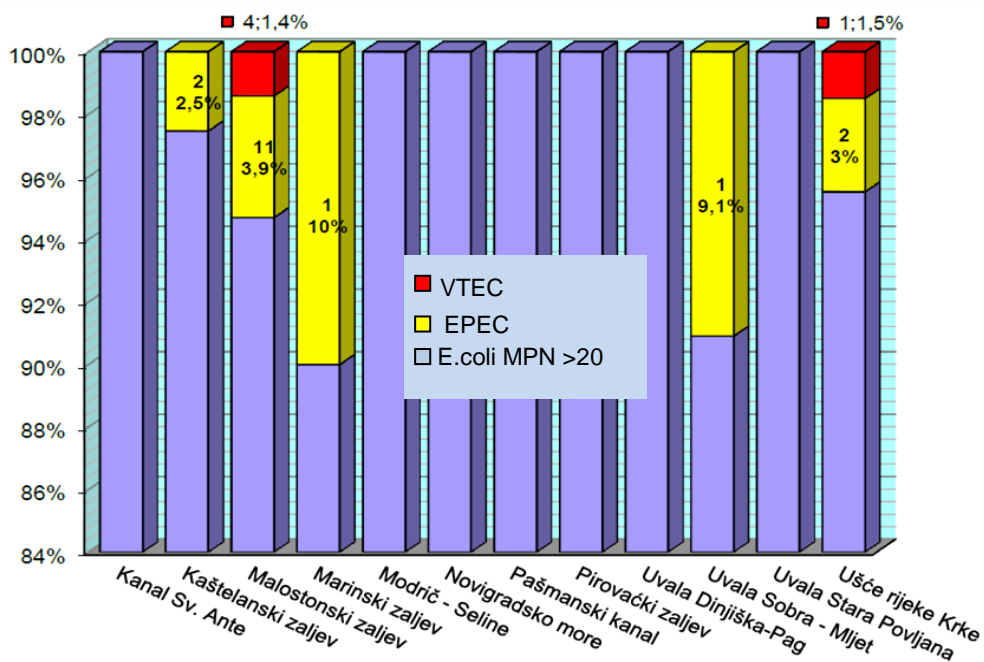
U sljedećim proizvodnim područjima utvrđeni su sojevi VTEC:

- iz Malostonskog zaljeva utvrđene su 4 VTEC (1,4%), odnosno u 57% od ukupno pretraženih (n=498) izoliranih kultura *E. coli* što daje prevalenciju od 0,8% VTEC u svim pretraženim školjkašima iz ovog područja u periodu istraživanja,

- iz ušća rijeke Krke utvrđena je 1 VTEC (1,5%), odnosno u 61% od ukupno pretraženih (n=110) izoliranih kultura *E. coli* što daje prevalenciju od 0,9% VTEC od ukupno pretraženih u ovom području. U ostalim proizvodnim područjima školjkaša u kojima je u izolirana *E. coli* nisu utvrđene VTEC (prevalencija od 0%).



**Grafikon 12.** Prevalencija VTEC/EPEC u uzorkovanim školjkašima po proizvodnim područjima



**Grafikon 13.** Odnos prevalencija VTEC i EPEC u uzorcima s izdvojenom *E. coli* u školjkašima iz ispitanih proizvodnih područja

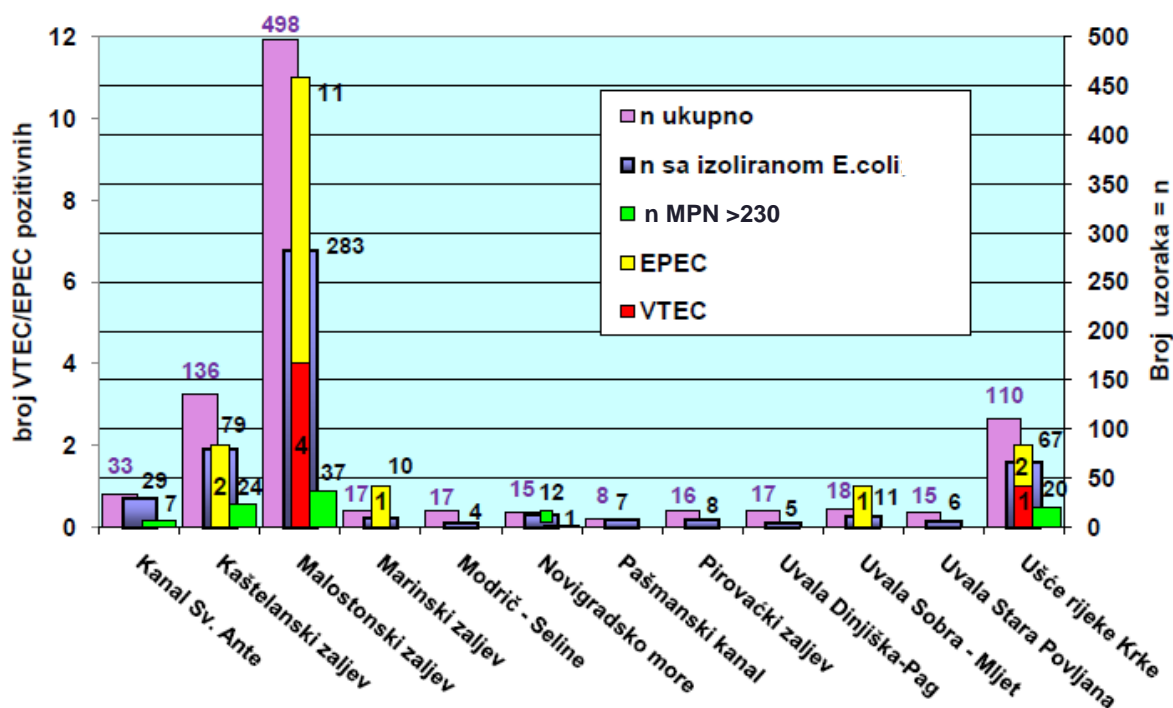
Što se tiče nalaza EPEC u kulturama *E. coli* izoliranim iz Kaštelanskog zaljevu, od pretraženih izolata utvrđene su 2 (2,5%), što daje prevalenciju od 1,5% EPEC u ukupno pretraženim školjkašima (n=136) iz ovog područja u periodu istraživanja.

U Malostonskom zaljevu su u školjkašima (n=498) izolirane 283 kulture *E. coli* a njih 11 (3,9%) je potvrđeno kao EPEC, što je prevalencija od 2,2% u ukupno pretraženim školjkašima (sve vrste ukupno).

U izoliranim kulturama *E. coli* u školjkašima iz Marinskog zaljeva (59%) u jednom od 10 uzoraka je utvrđena EPEC, a prevalencija je 5,9% EPEC od ukupno pretraženih školjkaša u ovom području (n = 17).

Slični su odnosi i u Uvali Sobra – otok Mljet gdje je u 61% izoliranih kultura *E. coli*, utvrđena jedna EPEC (9,1%), a prevalencija je bila 5,6% (n=18).

U izoliranim kulturama *E. coli* iz Ušća rijeke Krke (n=67). utvrđena su dva soja EPEC (3%) što je prevalencija od 1,8% (n =110). U ostalim proizvodnim područjima u izoliranim kulturama *E. coli* nisu utvrđene EPEC.



**Grafikon 14.** Odnos broja izoliranih VTEC i EPEC u školjkašima prema proizvodnim područjima i broja uzoraka prema MPN vrijednosti

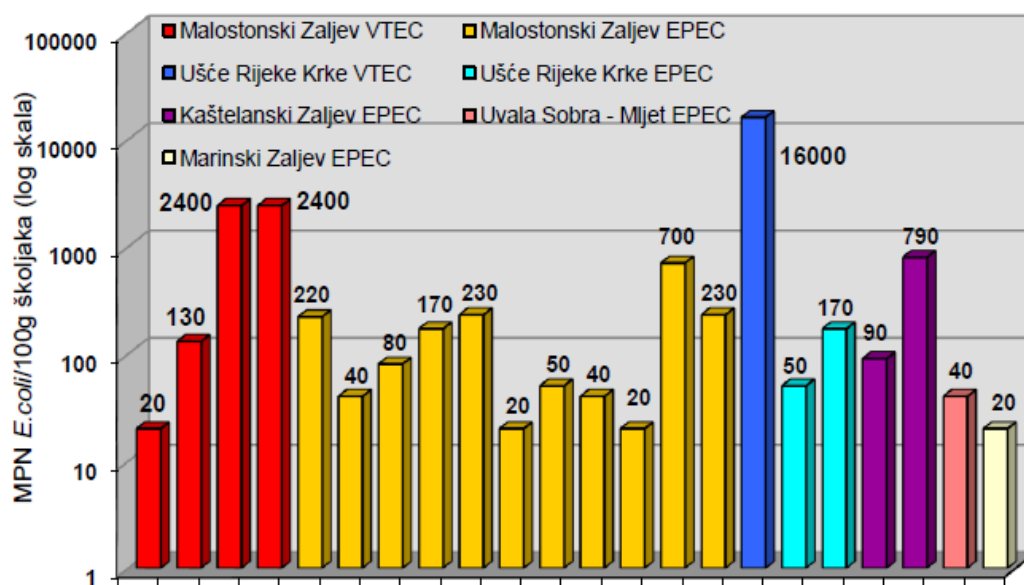
Razlike u prevalenciji uzoraka s utvrđenom VTEC i EPEC u ukupnom broju pretraženih uzoraka iz različitih proizvodnih područja dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana nisu statistički značajne ( $p=0,87$  i  $p=0,9$ ), a ni nalaz VTEC i EPEC u uzorcima s izoliranim kulturama *E. coli* iz različitih područja ( $p=0,87$  i  $p=0,78$ ). Rezultati su prikazani u tablici 23.

**Tablica 23.** Razlike u učestalosti nalaza sojeva VTEC/EPEC u školjkašima između proizvodnih područja

Proizvodno područje	Ukupno pretraženi uzorci					Izolirana <i>E. coli</i> (uzorci $s \geq 20$ MPN)				
	VTEC		EPEC		Ukupno	VTEC		EPEC		Ukupno
	neg	poz	neg	poz		neg	poz	neg	poz	
Kanal Sv. Ante u Šibeniku	33	0	33	0	33	29	0	29	0	29
	100	0	100	0	100	100	0	100	0	100
Kaštelanski zaljev	136	0	134	<b>2</b>	136	79	0	77	<b>2</b>	79
	100	0	98,53	<b>1,47</b>	100	100	0	97,47	<b>2,53</b>	100
Malostonski zaljev	494	<b>4</b>	487	<b>11</b>	498	279	<b>4</b>	272	<b>11</b>	283
	99,20	<b>0,80</b>	97,79	<b>2,21</b>	100	98,59	<b>1,41</b>	96,11	<b>3,89</b>	100
Marinski zaljev	17	0	16	<b>1</b>	17	10	0	9	<b>1</b>	10
	100	0	94,12	<b>5,88</b>	100	100	0	90,00	<b>10,00</b>	100
Modrić - Seline	17	0	17	0	17	4	0	4	0	4
	100	0	100	0	100	100	0	100	0	100
Novigradsko more	15	0	15	0	15	12	0	12	0	12
	100	0	100	0	100	100	0	100	0	100
Pašmanski kanal	8	0	8	0	8	7	0	7	0	7
	100	0	100	0	100	100	0	100	0	100
Pirovački zaljev	16	0	16	0	16	8	0	8	0	8
	100	0	100	0	100	100	0	100	0	100
Uvala Dinjiška-Pag	17	0	17	0	17	5	0	5	0	5
	100	0	100	0	100	100	0	100	0	100
Uvala Sobra - Mljet	18	0	17	<b>1</b>	18	11	0	10	<b>1</b>	11
	100	0	94,44	<b>5,56</b>	100	100	0	90,91	<b>9,09</b>	100
Uvala Stara Poveljana	15	0	15	0	15	6	0	6	0	6
	100	0	100	0	100	100	0	100	0	100
Ušće rijeke Krke	109	<b>1</b>	108	<b>2</b>	110	66	<b>1</b>	65	<b>2</b>	67
	99,09	<b>0,91</b>	98,18	<b>1,82</b>	100	98,51	<b>1,49</b>	97,01	<b>2,99</b>	100
Ukupno	895	<b>5</b>	883	<b>17</b>	900	516	<b>5</b>	504	<b>17</b>	521
	99,44	<b>0,56</b>	98,11	<b>1,89</b>	100	99,04	<b>0,96</b>	96,74	<b>3,26</b>	100

#### 5.4.10. Utjecaj MPN *E. coli*/100 g na pojavnost sojeva VTEC/EPEC u proizvodnim područjima dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana

Broj VTEC i EPEC u pozitivnim uzorcima školjkaša u odnosu na ukupan broj pretraženih i uzorke s izoliranom *E. coli* ( $\geq 20$  MPN *E. coli*/100g, dalje u tekstu MPN), potom na broj neodgovarajućih uzoraka ( $>230$  MPN) iz različitih proizvodnih područja s različitim vrijednostima MPN, prikazan je u grafikonu 14. Vrijednosti MPN u uzorcima pozitivnima na nalaz VTEC/EPEC prikazane su u grafikonu 15.



**Grafikon 15.** MPN *E. coli*/100g u uzorcima pozitivnima na nalaz VTEC/EPEC po proizvodnim područjima

Vrijednosti MPN *E. coli*/100g u školjkašima pozitivnima na VTEC u području Malostonskog zaljeva se kreću od 2400 do najniže brojive vrijednosti 20 MPN, a najveća vrijednost VTEC je određena u uzorku u području Ušća rijeke Krke i iznosi 16000 MPN.

Kod uzoraka pozitivnih na EPEC, kojih je najviše u Malostonskom zaljevu, raspon vrijednosti je od 20 - 700 MPN, dok su u ostalim područjima vrijednosti EPEC pozitivnih uzoraka od 20 - 790 MPN.

Broj pozitivnih nalaza VTEC/EPEC u uzorcima razvrstanim u razrede A, B, C i D po vrijednosti MPN *E. coli*/100g uzorka školjkaša po važećim pravilnicima RH, prikazani su u tablici 24. U područjima s više vrsta školjkaša prevalencija je izračunata iz zbroja nalaza svih vrsta u određenom razredu.

U Malostonskom zaljevu najveći broj pozitivnih nalaza VTEC u uzorcima je unutar vrijednosti za razred B (5,4% dagnje i prnjavice zajedno), a u razredu A bilo je 0,4% pozitivnih uzoraka. Prevalencija EPEC sojeva u uzorcima s manjim MPN vrijednostima razreda A je 2,2%, a u uzorcima iz razreda B 2,7%.

U Ušću rijeke Krke utvrđena je jedna VTEC od dva uzorka, unutar uzoraka iz razreda C (školjkaši samo za preradu), dok u ostalim školjkašima ovog područja VTEC nisu utvrđene.

U proizvodnom području Marinskog zaljeva i Uvali Sobra – otok Mljet svi su pretraženi uzorci iz razreda A pa su prevalencije EPEC školjkaša jednake prije utvrđenim prevalencijama ovih područja (5,9% i 5,6%).

U Kaštelanskom zaljevu utvrđeno je u prnjavicama u razredima A i B po redu 0,9% i 8% EPEC.

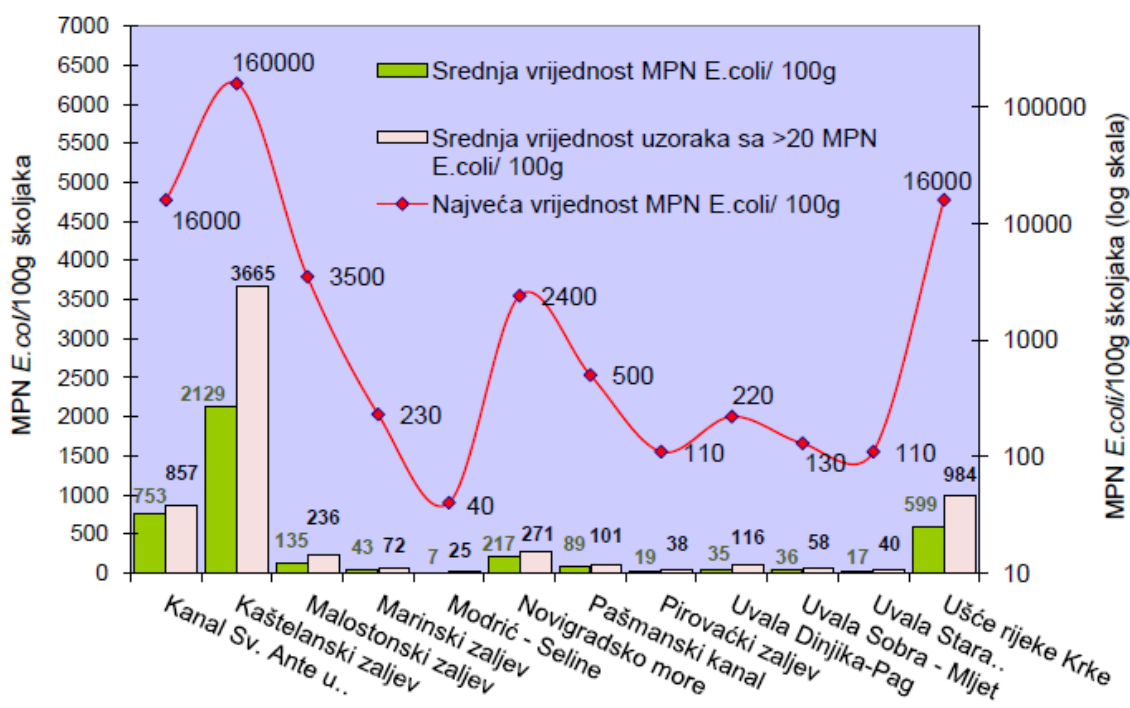
**Tablica 24.** Broj pozitivnih nalaza VTEC i EPEC u uzorcima školjkaša unutar granica razreda mikrobiološke kontaminacije za razvrstavanje proizvodnih područja

Razred/ MPN <i>E. coli</i> /100g		A <20-230		B >230-4600		C >4600-46000		D >46000	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Proizvodna područja		810	90,0	76	8,44	13	1,44	1	0,11
	VTEC	2	0,25	2	2,6	1	7,7	/	/
	EPEC	15	1,85	2	2,6	/	/	/	/
Malostonski zaljev		461	93,0	37	7,0	/	/	/	/
	VTEC	2	0,4	2	5,4	/	/	/	/
	EPEC	10	2,2	1	2,7	/	/	/	/
Ušće rijeke Krke		90	82,0	18	16,0	2	2,0	/	/
	VTEC	/	/	/	/	1	50,0	/	/
	EPEC	2	2,10	/	/	/	/	/	/
Kaštelanski zaljev		112	82,0	12	9,0	11	8,0	1	1,0
	VTEC	/	/	/	/	/	/	/	/
	EPEC	1	0,9	1	8,3	/	/	/	/
Uvala Sobra Mljet		18	100,0	/	/	/	/	/	/
	VTEC	/	/	/	/	/	/	/	/
	EPEC	1	5,6	/	/	/	/	/	/
Marinski zaljev		17	100,0	/	/	/	/	/	/
	VTEC	/	/	/	/	/	/	/	/
	EPEC	1	5,9	/	/	/	/	/	/



#### 5.4.11. Odnos vrijednosti MPN *E. coli* različitih proizvodnih područja dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana

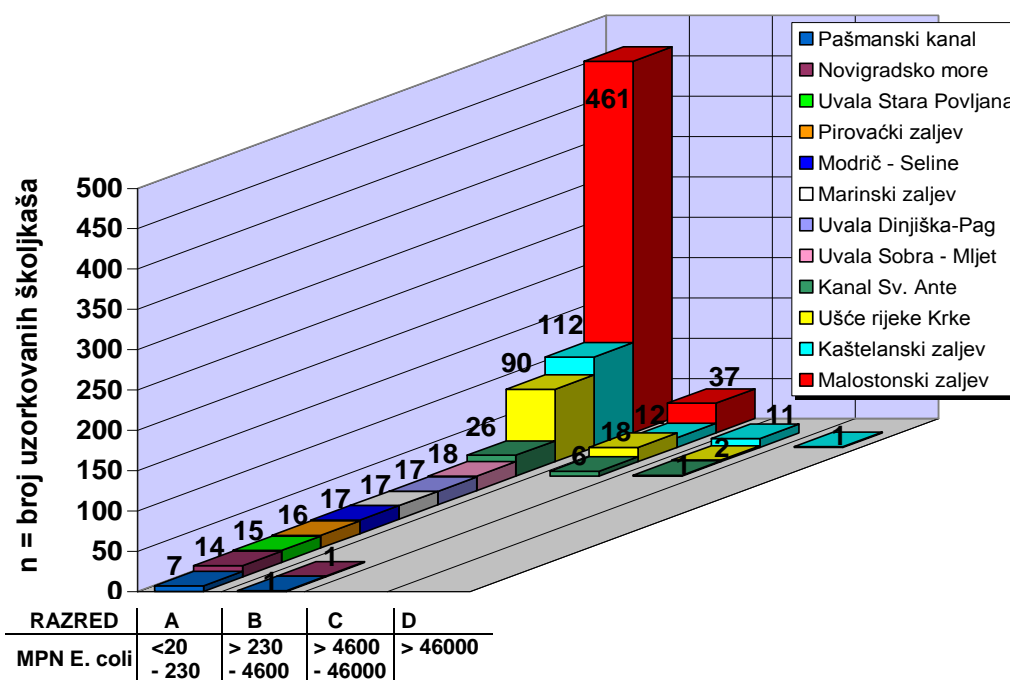
Odnos srednjih vrijednosti MPN *E. coli*/100g uzoraka (dalje u tekstu MPN) različitih proizvodnih područja prikazani su u grafikonu 16. Srednje vrijednosti su izračunate dvojakom. Za prvi izračun uzete su sve MPN vrijednosti uzorkovanih školjkaša u nekom području, tako da su vrijednosti <20 MPN (u kojima zapravo nisu uočene *E. coli*) zamijenjene brojem 0. Drugi izračun srednjih vrijednosti MPN je dobiven samo iz uzoraka s utvrđenim razinama *E. coli* (uzorci s  $\geq 20$  MPN). Najviše srednje vrijednosti bez obzira na način izračuna su u području Kaštelanskog zaljeva, kao i najviši maksimalni MPN. Slijede Kanal sv. Ante i Ušće rijeke Krke, ovisno o načinu izračuna. Maksimalne MPN vrijednosti preko >230 MPN, što je granica ispravnosti za stavljanje na tržište, imaju (redom od višeg prema manjem MPN-u) Malostonski zaljev, Novigradsko more i Pašmanski kanal. Na grafikonu 16 su prikazane razlike između proizvodnih područja s obzirom na broj uzoraka s prisutnom *E. coli* i nezadovoljavajuće vrijednosti MPN *E. coli*/100g.



**Grafikon 16.** Odnos srednjih i maksimalnih MPN *E. coli* /100g vrijednosti po proizvodnim područjima



U grafikonu 17 su uzorci proizvodnih područja po vrijednosti MPN raspodijeljeni u skupine A, B, C i D po intervalima vrijednosti mikrobiološke kontaminacije za razvrstavanje proizvodnih područja u razrede prema važećim propisima RH.



**Grafikon 17.** Odnos proizvodnih područja s obzirom na broj školjkaša razvrstanih u razrede

Najmanje uzoraka školjkaša s izoliranom *E. coli* utvrđeno je na lokaciji Modrič–Seline (4, 24%) i Uvala Dinjiška (5, 29%), dok je najveći broj uzoraka s izoliranom *E. coli* zapažen na lokaciji Kanal Sv. Ante u Šibeniku (29, 88%) i u Pašmanskom kanalu (7, 87,5%). Ove uočene razlike u broju uzoraka s utvrđenom *E. coli* između različitih lokacija statistički su značajne ( $p < 0,001$ ), a prikazane su u tablici 25.

U grafikonu 17 prikazani su podaci prema kojima su školjkaši razvrstani u razrede A, B, C i D. Razredi B, C i D obuhvaćaju neispravne uzorke koji ne udovoljavaju mikrobiološkim parametrima za plasiranje školjkaša na tržište. Ukupno je takvih uzorka bilo 90 ili 10% ( $n=900$ ). Najveći broj neispravnih uzoraka zapažen je na lokaciji Kanal Sv. Ante u Šibeniku (7 ili 21,21%) te Ušću rijeke Krke (20 ili 18,18%) i u Kaštelanskom zaljevu (26 ili 17,65%). Uočene razlike u broju neispravnih uzoraka između različitih lokacija su statistički značajne ( $p < 0,001$ ), a rezultati su prikazani u tablici 25.

**Tablica 25.** Razlike proizvodnih područja s obzirom na MPN *E. coli*/u 100g školjkaša

Proizvodno područje		<20	>20 uzorci s <i>E. coli</i>	<230	>230 *neispravni uzorci	Ukupno
Kanal Sv. Ante u Šibeniku	n	4	29	26	7	33
	%	12,12	87,88	78,79	21,21	100
Kaštelanski zaljev	n	57	79	112	24	136
	%	41,91	58,09	82,35	17,65	100
Malostonski zaljev	n	215	283	461	37	498
	%	43,17	56,83	92,57	7,43	100
Marinski zaljev	n	7	10	17	0	17
	%	41,18	58,82	100	0	100
Modrić - Seline	n	13	4	17	0	17
	%	76,47	23,53	100	0	100
Novigradsko more	n	3	12	14	1	15
	%	20,00	80,00	93,33	6,67	100
Pašmanski kanal	n	1	7	7	1	8
	%	12,50	87,50	100	12,5	100
Pirovački zaljev	n	8	8	16	0	16
	%	50,00	50,00	100	0	100
Uvala Dinjiška-Pag	n	12	5	17	0	17
	%	70,59	29,41	100	0	100
Uvala Sobra - Mljet	n	7	11	18	0	18
	%	38,89	61,11	100	0	100
Uvala Stara Poveljana	n	9	6	15	0	15
	%	60,00	40,00	100	0	100
Ušće rijeke Krke	n	43	67	90	20	110
	%	39,09	60,91	81,82	18,18	100
Ukupno	n	379	521	810	90	900
	%	42,11	57,89	90,00	10,00	100

\* uzorci neprihvatljivi za tržište prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu ( NN 74/08 )

#### 5.4.12. Prevalencija VTEC / EPEC uz MPN *E. coli* različitih vrsta školjaka u istom proizvodnom području

U dva proizvodna područja dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana, u Malostonskom i Kaštelanskom zaljevu u kojima se uzgaja i/ili izlovljava više vrsta školjkaša, u istraživanju su utvrđeni pozitivni VTEC i/ili EPEC uzorci. U Kaštelanskom zaljevu VTEC sojevi nisu utvrđeni, ali je iz prnjavica u 67% uzoraka izolirana *E. coli* u kojima su nađeni EPEC sojevi (2 ili 3,1%) što čini ukupno 2,1% nalaza EPEC u prnjavicama ovog područja. Nasuprot tome u 36% pretraženih kunjki izolirane su kulture *E. coli* u kojima nisu utvrđeni sojevi EPEC. Prnjavice Kaštelanskog zaljeva imaju najviše srednje vrijednosti i maksimalni MPN *E.*

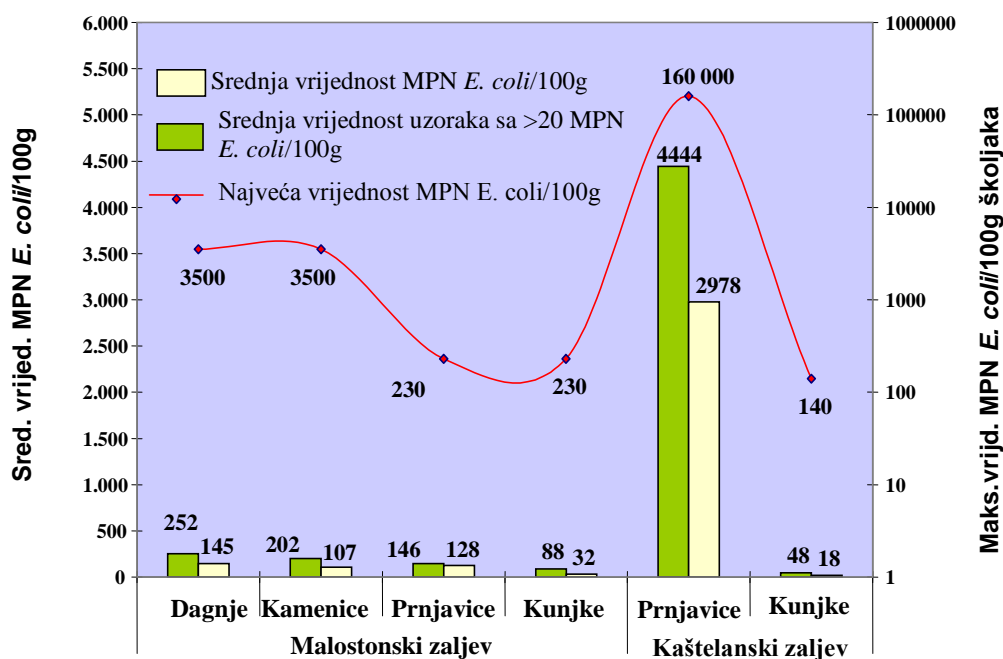
*coli*/100g (grafikon 18), što daje već prije opisane najviše srednje vrijednosti i maksimalni MPN *E. coli*/100g upravo u području Kaštelanskog zaljeva (grafikon 16).

**Tablica 26.** Udio nalaza VTEC/EPEC u više vrsta školjkaša u istom proizvodnom području

Proizvodno područje	Vrsta školjkaša	Ukupno a	<i>E. coli</i> b		VTEC			EPEC		
			n	%	n	a %	b %	n	a %	b %
<b>Kaštelanski zaljev</b>	prnjavice	97	65	67,0	0	0	0	2	2,1	3,1
	kunjke	39	14	36,0	0	0	0	0	0	0
<b>Malostonski zaljev</b>	dagnje	385	221	57,0	3	0,8	1,4	9	2,3	4,1
	kamenice	80	42	53,0	0	0	0	1	1,3	2,4
	prnjavice	16	14	88,0	1	6,3	7,1	1	6,3	7,1
	kunjke	17	6	35,0	0	0	0	0	0	0

a-ukupno pretraženi uzorci

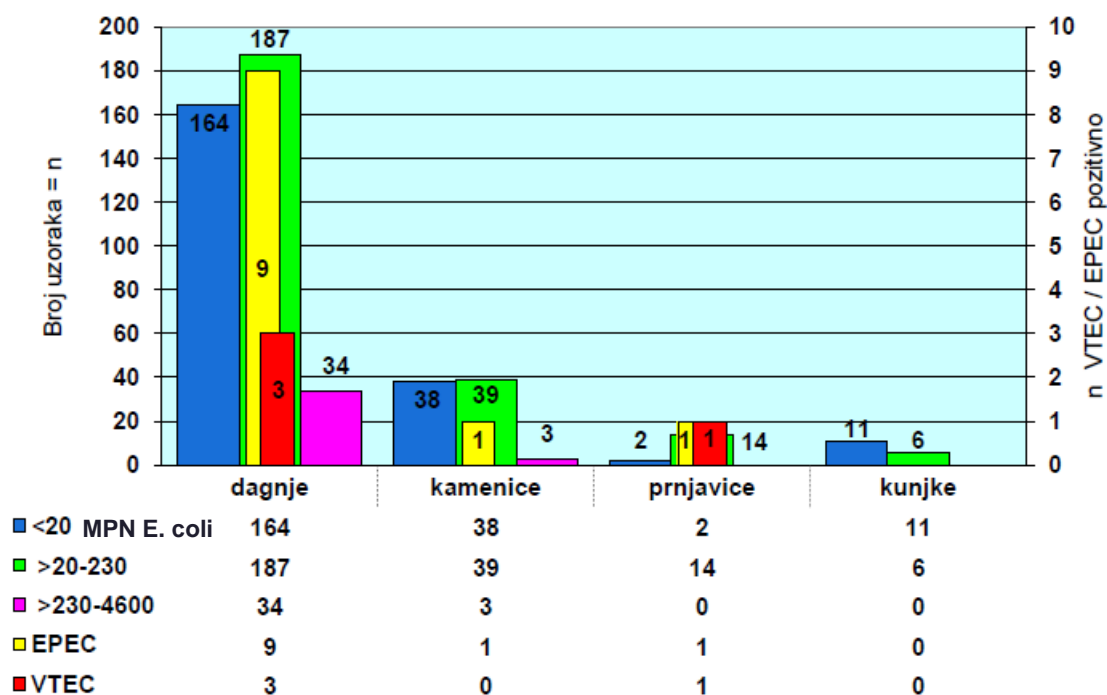
b-uzorci s pozitivnim nalazom *E. coli* =  $\geq 20$  MPN *E. coli*/100g



**Grafikon 18.** Odnos srednjih i maksimalnih vrijednosti MPN *E. coli*/100g u proizvodnim područjima s više vrsta školjkaša

U grafikonu 18 prikazane su srednje vrijednosti MPN za pojedina proizvodna područja izračunate iz svih vrijednosti uzoraka u kojima su vrijednosti MPN < 20 zamijenjene s 0, te iz srednjih vrijednosti MPN uzoraka s utvrđenim razinama *E. coli*  $\geq$  20 MPN. U Malostonskom zaljevu su zastupljene sve četiri pretraživane vrste školjkaša u Dalmaciji. Usporedbom srednjih vrijednosti MPN *E. coli*/100g za razliku od varijacija među vrstama u proizvodnim područjima cijele Dalmacije, u istom području, u ove četiri istraživane vrste školjkaša vrijednosti su slične (grafikon 18), a razlika između uočenih vrijednosti nije statistički značajna ( $p=0,4439$ ).

U grafikonu 19 prikazani su međusobni odnosi u broju pretraženih različitih vrsta školjkaša u Malostonskom zaljevu u odnosu na njihove MPN vrijednosti i broj VTEC/EPEC pozitivnih uzoraka. Uzorci razreda A prikazani su stupićima plave i zelene boje, a razreda B stupićima ružičaste boje.



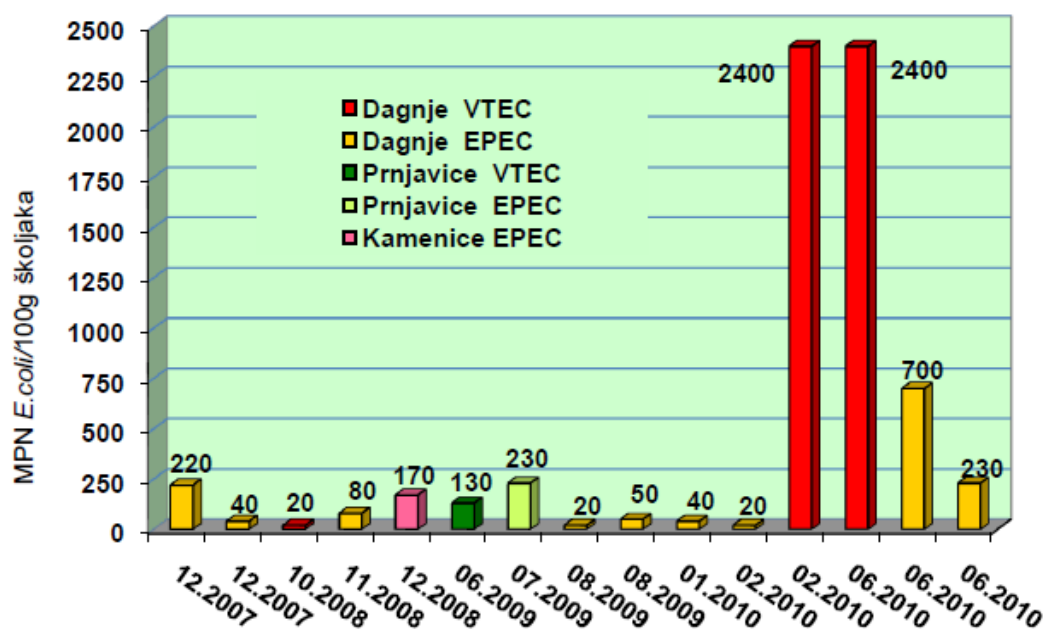
**Grafikon 19.** Broj pretraženih vrsta školjkaša Malostonskog zaljeva prema granicama razreda za razvrstavanje područja

Stupci (osim crvenih koji označavaju VTEC i žutih EPEC), skupno sačinjavaju ukupan broj pretraženih školjkaša po vrstama. U uzorcima kunjki nisu izolirani VTEC ni EPEC sojevi, dok je u kamenicama u 53% izoliranih kultura *E. coli* nađen jedan (2,4%) EPEC soj,

što daje prevalenciju od 1,3% EPEC u kamenicama ovog područja. U izoliranim kulturama iz dagnji utvrđeno je devet (4,1%) EPEC sojeva što je 2,3% u ukupno pretraženim dagnjama ovog područja (n=385).

VTEC sojevi u dagnjama Malostonskog zaljeva utvrđeni su u tri (1,4%) izolirane kulture *E. coli*, što daje prevalenciju od 0,8% u pretraženim dagnjama ovog područja u periodu istraživanja. U prnjavicama su iz 88% uzoraka izolirane kulture *E. coli* i u njima je utvrđen po jedan (7,1%) VTEC i EPEC soj, što je prevalencija od 6,3% VTEC i EPEC pozitivnih uzoraka u pretraženim prnjavicama ovog područja u periodu istraživanja (n=16).

Na grafikonu 20 su prikazane vrijednosti MPN *E. coli*/100 g VTEC i EPEC pozitivnih uzoraka po redu pojavljivanja u različitim vrstama školjkaša ovog područja.

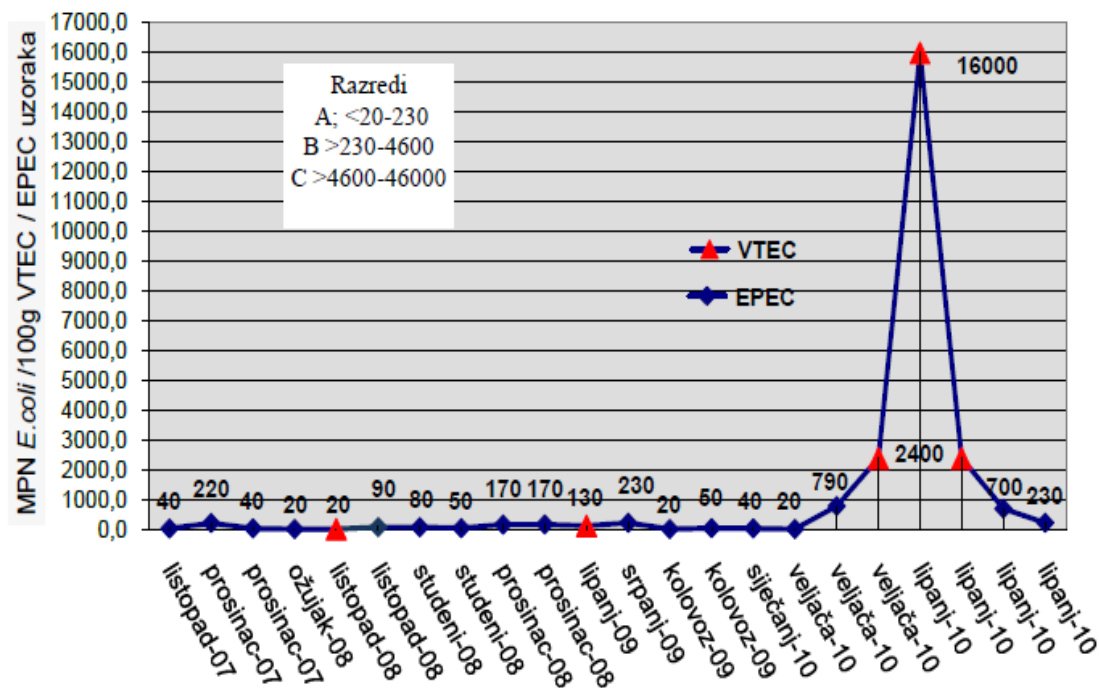


**Grafikon 20.** Pojavnost i odnos MPN *E. coli*/100g u uzorcima školjkaša s nalazom VTEC/EPEC iz Malostonskog zaljeva

#### 5.4.13. Povezanost MPN vrijednosti *E. coli* s pojavom VTEC i EPEC u školjkašima dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana

U grafikonu 21 je prikazana usporedba pojave VTEC i EPEC u uzorcima školjkaša tijekom istraživanja s vrijednostima MPN *E. coli*/100g. Čak 40% sojeva VTEC pripada uzorcima koji ulaze unutar granica za razred A (mikrobiološki ispravni uzorci za tržište), 40% pripada uzorcima razreda B koji se trebaju pročišćavati, a 20% sojeva pripada razredu C

(školjkaši samo za preradu ili ponovno polaganje). 12% EPEC kultura je izolirano iz uzoraka vrijednosti za razred B, a 88% za razred A.



**Grafikon 21.** Prikaz vrijednosti MPN *E. coli*/100g uzoraka školjkaša s nalazom VTEC i EPEC po redu pojavljivanja

VTEC i EPEC kulture su izolirane iz uzoraka školjkaša s različitim vrijednostima MPN *E. coli*/100g. Kada usporedimo srednje vrijednosti MPN *E. coli* VTEC ili EPEC pozitivnih uzoraka i uzoraka školjkaša bez VTEC ili EPEC, bez obzira na vrstu školjkaša i proizvodno područje, sveukupno u dalmatinskom dijelu istočne obale Jadrana opažene razlike između MPN *E. coli* uzoraka sa i bez VTEC/EPEC, statistički nisu značajne ( $p=0,07$  i  $p=0,39$ ). Rezultati su prikazani u tablici 27.

**Tablica 27.** Mogućnost utjecaja porasta MPN *E. coli*/100g na pojavnost VTEC i EPEC

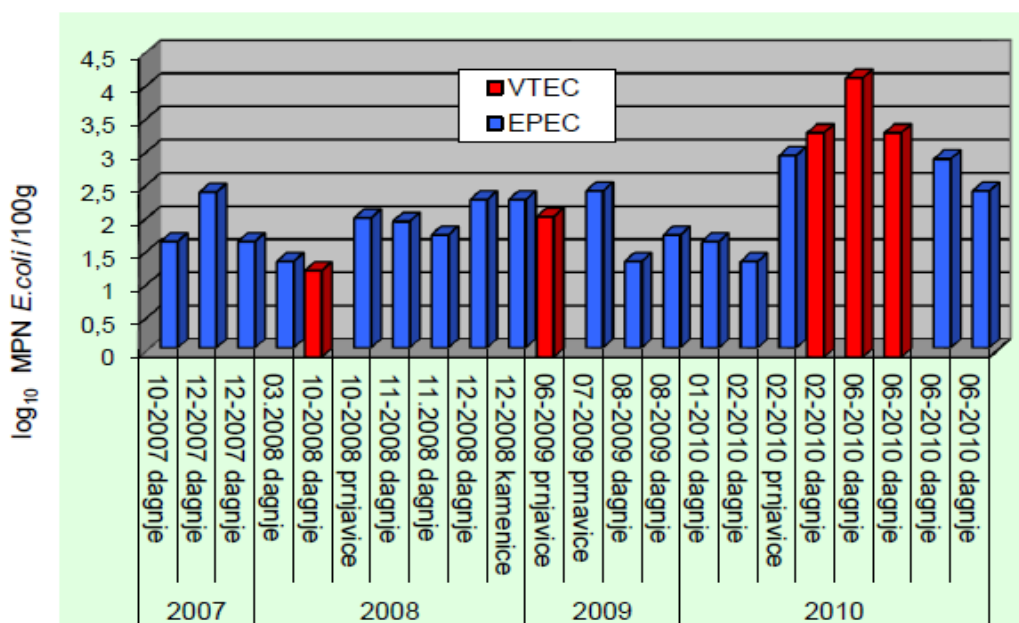
Pozitivni/negativni uzorci	Srednja vrijednost	Greška	[95% interval povjerljivosti]
VTEC+	4190	2997,9	-1699,6 - 10079,6
VTEC-	838,3	320,4	208,7 - 1467,9
EPEC+	174,1	55,4	65 - 283
EPEC-	894,0	329,4	246 - 1541

#### 5.4.14. Kronološke razlike u pojavnosti VTEC i EPEC

Tablica 28. Prikaz rezultata nalaza VTEC i EPEC prema godinama istraživanja

Godina		VTEC		EPEC		Ukupno
		neg	poz	neg	poz	
2007	n	79	0,0	76	3	79
	%	100,0	0,0	96,20	3,80	100,0
2008	n	177	1	172	6	178
	%	99,44	0,56	96,63	3,37	100,0
2009	n	185	1	183	3	186
	%	99,46	0,54	98,39	1,61	100,0
2010	n	75	3	73	5	78
	%	96,15	3,85	93,59	6,41	100,0
ukupno	n	516	5	504	17	521
	%	99,04	0,96	96,74	3,26	100,0

U tablici 28 navedene su godišnje razlike u nalazu VTEC i EPEC uzoraka kroz period istraživanja (9. mjesec 2007. godine. – 6. mjesec 2010. godine.). U 2007. godini od 79 izolata *E. coli* utvrđena su tri EPEC soja, a VTEC kultura nije utvrđena. 2008. godine od 178 kultura *E. coli*, utvrđeno je šest EPEC i jedna VTEC; 2009 godine od 186 kultura tri su potvrđene kao EPEC i jednakao VTEC. U 2010. godini utvrđeno je pet sojeva EPEC i tri od 78 VTEC kultura.



Grafikon 22. Godišnje razlike u pojavnosti pozitivnih nalaza VTEC i EPEC u uzorcima školjkaša

Pojavnost EPEC u izoliranim kulturama *E. coli* između različitih godina nisu statistički značajne ( $p=0,2$ ), za razliku od nalaza VTEC u istom periodu gdje su opažene razlike u pojavnosti VTEC između različitih godina statistički značajne ( $p=0,04$ ), što prikazano grafikonom 22.

Sezonske varijacije su navedene u tablici 29. Razmatrani su "zimski mjeseci" od studenog do travnja s temperaturama mora otprilike do 16 °C, te "ljetni mjeseci" od svibnja do listopada, poviše 16 °C, radi mogućeg utjecaja različitih temperatura mora na pojavu VTEC i EPEC. U ljetnim mjesecima 2008. i 2009. godine utvrđen je po jedan VTEC soj, a 2010. godine dva. Od zimskih mjesecima VTEC kultura je utvrđena samo 2010. godine. U ljetnim mjesecima 2007. i 2008. godine utvrđen je po jedan EPEC soj, 2009. godine tri, a 2010. godine dva. U zimskim mjesecima 2007. godini utvrđene su dvije, 2008. pet, a 2010. tri EPEC kulture. U zimskom periodu 2009. nije utvrđena ni jedna EPEC.

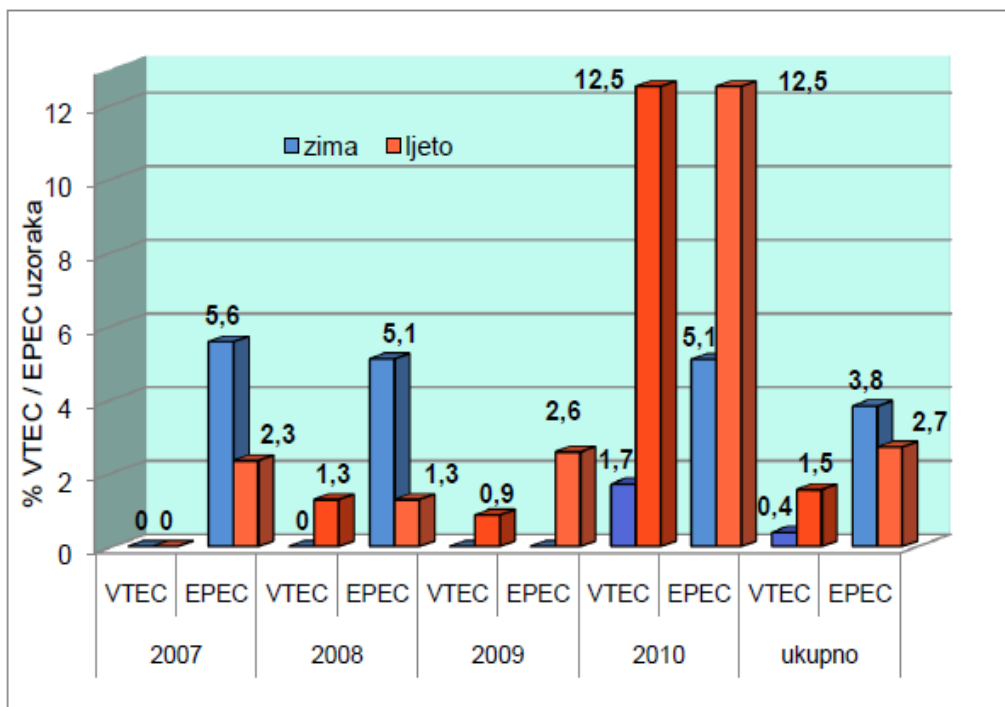
**Tablica 29.** Prikaz rezultata nalaza VTEC i EPEC prema ljetnoj i zimskoj sezoni

godina	ljetno					zima				
	VTEC		EPEC		ukupno	VTEC		EPEC		ukupno
	neg	poz	neg	poz		neg	poz	neg	poz	
2007	43	0	42	1	43	36	0	34	2	36
2008	78	1	78	1	79	98	0	93	5	98
2009	116	1	114	3	117	68	0	68	0	68
2010	14	2	14	2	16	58	1	56	3	59
Ukupno	255	4	252	7	259	261	1	252	10	262

U grafikonu 23 prikazana je pojavnost EPEC kroz četiri godine u izoliranim kulturama *E. coli* koja se kreće u pojedinim godinama od 1,3% do 12,5% u ljetnim, a od 0% do 5,6% u zimskim mjesecima istraživanja. VTEC kulture izolirane su kroz tri godine u rasponu od 0% do 12,5% u ljetnim mjesecima istraživanja, a u zimskom dijelu samo 2010. godine.

Sveukupno pojavnost EPEC u izoliranim kulturama *E. coli* je 2,7% u ljetnim i 3,8% u zimskim mjesecima, a pojavnost VTEC kultura je 1,5% u ljetnom dijelu istraživanja u odnosu na 0,4% u zimskom dijelu godine. Ta razlika u pojavnosti VTEC i EPEC pri višim i nižim temperaturama mora sveukupno u periodu istraživanja nije statistički značajna ( $p=0,17$  odnosno  $p=0,46$ ).





**Grafikon 23.** Godišnje razlike u pojavljivanju VTEC i EPEC pozitivnih uzoraka školjkaša uz ljetne i zimske temperature mora

## 6. RASPRAVA

Cilj našeg istraživanja je bio prvenstveno istražiti prisutnost verotoksigene *E. coli* (VTEC) u proizvodnim područjima školjkaša dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana. VTEC su skupina patogenih *E. coli* koje proizvode citotoksin na vero stanicama - verocitotoksin ili verotoksin (KONOWALCHUK i sur., 1977.). Svake godine se povećava broj neuobičajenih načina prijenosa VTEC, pa životinje, hrana ili okoliš koji prethodno nisu opisani kao mogući izvor infekcije s VTEC, trebaju biti razmatrani i testirani (CAPRIOLI i sur., 2005.). Zbog načina širenja *E. coli* u okoliš i biologije samih školjkaša, te zbog ozbiljnosti oboljenja koje VTEC izazivaju, od dijareje i hemoragičnog kolitisa do moguće fatalnog hemolitičkog uremičkog sindroma i trombotičko-trombocitopenične purpore (RILEY i sur., 1983., KARMALI i sur., 1983.; NEILD, 1994.) htjeli smo provjeriti eventualni nalaz ovih opasnih VTEC sojeva i serovara O157:H7 u školjkašima

VTEC se nalaze u crijevima zdravih životinja odakle se lako i obilno šire u zemlju i vodu (SWERDLOW i sur., 1992.; GYLES, 2007.; O'SULLIVAN i sur., 2008., KHANDAGHI i sur., 2010; ANON., 2010.c, 2010.f). Za razdoblja obilnih kiša mogu uzrokovati ispiranje bakterija i prodiranje u dublje slojeve tla, te otjecanje u vodene tokove (FENLON i sur., 2000. GARCIA-ALJARO i sur., 2005.). Kada patogeni mikroorganizmi zagade okoliš, zbog načina hranjenja školjkaša filtriranjem mora u kojem obitavaju i nakupljanjem tvari iz okoline u svom organizmu, školjkaši koncentriraju i te mikroorganizme u probavnoj žlijezdi. S obzirom na običaje konzumiranja školjkaša (sirovih ili samo na pari otvorenih), simptomi otrovanja školjkašima nakon konzumacije nisu neuobičajena pojava (POTASMAN i sur., 2002.).

U slučaju zagađenja mora učinak onečišćenja će se vidjeti duže vrijeme u školjkašima nego u moru (LEE i MURRAY, 2010.). Faktor koncentracije fekalnih koliforma (FC) između vode i školjkaša može varirati između 1 i 100 puta, s većom koncentracijom u školjkama (SIVRI i sur., 2010.). Dagnje u roku od 1,5 sata bioakumulacijom smanje 90% FC iz morske vode (SIVRI i sur., 2010.), pa su ŠOLIĆ i sur. (2010.) potvrdili brzo koncentriranje *E. coli* u dagnjama s  $1 \times 10^2$  i  $2 \times 10^3$  cfu/100 ml mora na prosječnih  $1 \times 10^4$  za sat vremena. Isto smo dokazali i u našem radu zagađenjem mora sa VTEC O157:H7 gdje je dokazana hiperkoncentracija VTEC u dagnjama za jedan sat sa 150 puta prosječnom većom koncentracijom u 100g školjkaša od početne koncentracije u 100 mL mora. U radu

GOURMELONA i sur. (2006.) potvrđen je nalaz *stx* gena PCR metodom u 1/2 uzoraka mora, a BENNANI i sur. (2011.) su ove gene utvrdili u 40% uzoraka morskog sedimenta.

U našem istraživanju pokusom umjetnog zagađenja mora s VTEC O157:H7 potvrdili smo mogućnost kontaminacije i preživljavanja VTEC u moru, kao i posljedično zagađenje školjkaša filtracijom onečišćenog mora. U našem radu određena je i najmanja količina (slika 24) od samo 1 CFU/100mL izbrojenih VTEC u moru (bazen 2) koja je bila dostatna za zagađenje školjkaša s 490 MPN VTEC O157:H7/100g (slika 27) u sat vremena. Također je potvrđena infiltracija ove bakterije u organe školjke do čak 9200 MPN *E. coli* O157:H7/100 g (slika 25) iz zagađenog mora s 38 CFU VTEC/100 mL, kroz samo sat vremena. Ova utvrđena akumulirana količina VTEC u uzorku živih školjkaša izražena kao 92 CFU/g, za koju je ovim pokusom dokazano da se može naći u moru, znatno je viša od nekih dokazanih infektivnih količina od <0,4 ili <0,3 CFU/g neke hrane (PATON i sur., 1996.; TUTTLE i sur., 1999.). Našim rezultatima iz ovog pokusa dokazana je mogućnost zagađenja i prijenosa VTEC u moru, uz sposobnost stvaranja verotoksina kroz čitav put prijenosa kroz različite medije i postupak izolacije bakterije. Time je dokazano da ova bakterija čitavo vrijeme zadržava sposobnost stvaranja toksina bez obzira na način i put širenja.

Postoji relativno malo radova o dokazu VTEC u školjkašima koje je teško uspoređivati radi različitog porijekla uzoraka, metoda pretrage ili samog ciljanog mikroorganizma. Nekoliko radova opisuje nalaz *E. coli* O157 (RAMPERSAD i sur., 1999.; MACRAE i sur., 2003., cit. GOURMELON i sur., 2006.) ili VTEC u školjkama na tržištu (SAMADPOUR i sur., 1994.; KUMAR i sur. 2001.).

Kao i u našem radu dokaz VTEC u školjkašima iz proizvodnih područja, opisali su DUPRAY i sur. (1999., cit ANON., 2003.), GOURMELON i sur. (2006.), te GUYON i sur. (2000.) koji je istraživao samo *E. coli* O157. U gore navedenim radovima potvrđen je nalaz VTEC, dok je u našem radu (po dosadašnjim saznanjima) ovo prvi dokaz nalaza VTEC iz proizvodnih područja školjkaša Jadrana. Nasuprot tome RIPABELLI i sur. (1999.) nisu izolirali ni jedan pozitivan VTEC soj. U Kanadi, LEVESQUE i sur. (2010.) nisu niti u školjkama iz područja pod utjecajem kanalizacijskih voda dokazali *E. coli* O157:H7 ni VTEC, dok su BENNANI i sur. (2011.) u školjkašima iz Maroka potvrdili nalaz VTEC.

Kako ne postoji jedinstvena ni propisana metoda, utvrđivanje VTEC se uglavnom zasniva na dva načina. Prvi način je upotreba prvo imunoloških, molekularnih ili drugih tehnika za presumptivnu identifikaciju VTEC na osnovi utvrđivanja prisutnosti toksina ili njihovih gena direktno u uzorcima u 24 sata radi brzog odbacivanja negativnih uzoraka ili

presumptivne identifikacije, a zatim slijedi eventualna naknadna izolacija VTEC sojeva iz pozitivnih uzoraka (PATON i PATON, 1998.b; MENG i sur., 2001.; BETTELHEIM i BEUTIN, 2003.; ANON., 2004.b; MONDAY i sur., 2007.; BAYLIS i sur., 2008.; FENG i WEAGANT, 2009.). Drugi način je kao i u slučaju našeg istraživanja primjereniji za one laboratorije koji nemaju adekvatnu opremu za presumptivnu identifikaciju, a to je upotreba klasičnih kulturnih metoda za izolaciju *E. coli* O157 i non-O157 *E. coli*. Postupak obuhvaća obogaćenje najmanje 25 g uzorka u bujonu uz tehniku naciepljivanja razrijeđenja ili iscrpljivanja obogaćenja ezom na agaru temeljenih na različitim supstratima radi izolacije i identifikacije svih *E. coli*. U tim izolatima *E. coli* se nekim drugim metodama dokazuju faktori virulentnosti (FENG i WEAGANT, 2009.). Ipak kako konvencionalne metode uzgoja *E. coli*, uz biokemijsku i serološku identifikaciju zahtijevaju intenzivni rad i vrijeme (što je i potvrđeno u našem radu) enzimatske metode s komercijalno dostupnim kitovima su jednostavnije, ali je potrebno postizanje bolje osjetljivosti (ANON., 2004.a.). Stoga smo dio uzoraka (29%) pretražili ELISA metodom s obogaćivanjem za povećanje osjetljivosti, prethodno provjerenom usporedbom sa zlatnim standardom, kulturnim metodama za utvrđivanje prisutnosti ili odsutnosti same bakterije (DEISINGH i THOMPSON, 2004.; BOHAYCHUK i sur., 2005.).

Završna potvrda VTEC sojeva zahtijeva dokaz proizvodnje ili sposobnosti proizvodnje Stx toksina. U našem radu su korištena oba principa. Neki VTEC sojevi proizvode samo Stx1, drugi Stx 2, a neki i oba toksina. (STROCKBINE i sur., 1986.). Za ispitivanje prisutnosti (proizvodnje) toksina korišten je imunoenzimski test - ELISA, dok se sposobnost proizvodnje Stx toksina provjeravala PCR metodom za utvrđivanje *Stx1* i *Stx2* gena koji kodiraju te verotoksine. PCR testom moguće je utvrditi i mnoge druge virulentne markere karakteristične za VTEC sojeve (PATON i PATON, 1998.a; FENG i MONDAY, 2000.). Najčešće traženi virulentni faktori uz *stx* gene su oni za koje se smatra da utječu na patogenezu VTEC (PATON i PATON, 1998.a; PATON i sur., 1999.; GYLES, 2007.) kao *hlyA* i *eae* geni koji kodiraju intimin i enterohemolizin (SCHMIDT i sur., 1995.; BAUER i WELCH, 1996.; DONNENBERG i sur., 1997.; PATON i PATON, 1998.b; EKLUND i sur., 2002.; TANEIKE i sur., 2002.; BEUTIN i sur., 2004.; BLANCO i sur., 2004.; ETHELBERG i sur., 2004.; ANON., 2007.a) pa su traženi i u ovom radu.

Kako je navedeno u istraživanjima dolje navedenih autora, dosadašnje primijenjene metode VTEC u školjkašima znatno se razlikuju, što je otežalo i izbor jedne metode najprimjerenije za naš rad.

RAMPERSAD i sur. (1999.) su u sirovim kamenicama i njihovim proizvodima, uzimali obriske i izolirali *E. coli* sojeve s mukoidnim, hemolitičkim kolonijama koje ne koriste sorbitol, a aglutinacijom ispitivali pripadnost soju *E. coli* O157. Prisutnost verocitotoksina nije ispitivana. GUYON i sur. (2000.) također su tražili izolacijom samo sojeve *E. coli* O157 uz određivanje razine fekalnog zagađenja uzoraka s naknadnim testiranjem na patogene *eae*, *hlyA*, i *stx* gene, kao i MACRAE i sur., (2005.) koji su istraživali utjecaj bujona na soj *E. coli* O157 i mogućnost izolacije imunomagnetskom separacijom.

Neki istraživači su obuhvatili i ostale VTEC sojeve, pa su SAMADPOUR i sur. (1994.) za detekciju VTEC primijenili DNA-hibridizaciju na različitim uzorcima prethodno obogaćene hrane. U Francuskoj DUPRAY i sur. (1999., cit ANON., 2003.b) obrađuju 36 analiziranih uzoraka školjkaša na *stx* gene u bujonskoj kulturi školjkaša, ali bez pokušaja izolacije VTEC sojeva iz pozitivnih uzoraka. KUMAR i sur., (2001, 2004.) su u obogaćenju uzoraka školjkaša u bujonu s 20 mg/l novobiocina koristili paralelno PCR metodu za identifikaciju *stx* pozitivnih uzoraka i klasičnu metodu za izolaciju sorbitol fermentirajućih i ne-fermentirajućih kolonija. Potvrđene *E. coli* su ponovo pretražili PCR postupkom, a kasnije pohranjene izolate ELISA testom, Vero-citotoksigenim testom i hibridizacijom. GOURMELON i sur. (2006.) su prvo PCR postupkom dokazivali prisutnost *stx* gena u uzorcima školjkaša, a zatim iz PCR pozitivnih uzoraka postupkom DNA hibridizacije izdvajali VTEC izolate. Pohranjeni izolati su tada do kraja identificirani, serotipizirani i opet genotipizirani PCR postupkom na ostale virulentne gene.

U našem radu je zbog nepostojanja univerzalne i preporučene metode za dokaz VTEC u školjkašima izabrana kombinacija tri metode i to, klasična izolacija *E. coli* O157 i non-O157 *E. coli* uz istovremeno dokazivanje prisutnosti toksina imunološkom ELISA metodom u uzorcima školjkaša, te naknadno utvrđivanje gena virulentnosti za VTEC u pohranjenim izolatima *E. coli* molekularnom PCR metodom. Nakon završetka našeg istraživanja, BENNANI i sur. su 2011. objavili sličan princip pretrage u kojem su utvrđene VTEC s tri izolata *E. coli* O157:H7.

Izolacija VTEC sojeva u našem istraživanju nije identična nijednoj gore opisanoj metodi u školjkama, ali se zasnivala na glavnim razlikama biokemijskih osobina *E. coli* O157 i non-O157 *E. coli*, fermentaciji sorbitola i aktivnosti  $\beta$ -glukuronidaze. *E. coli* O157 soj ne raste ili vrlo slabo raste na 44°C, uglavnom je sorbitol i  $\beta$ -glukuronidaza negativan, te  $\beta$ -galaktozidaza pozitivan (DOYLE i SCHOENI, 1984.; CHAPMAN, 1991.). Ostalih 95 - 97%

sojeva *E. coli* koristi aktivnost enzima  $\beta$ -glukuronidaze (FENG i HARTMAN, 1982.; HARTMAN, 1989.; MANAFI, 1996.).

U našem smo radu po prethodnim saznanjima autora (GOURMELON i sur., 2006.) zbog teškoća u izolaciji VTEC iz školjkaša primijenili kombinacije različitih tehnika otkrivanja VTEC. Izdvajanje VTEC je komplicirano jer se bakterije *E. coli* međusobno ne razlikuju, osim soja *E. coli* O157 po biokemijskom fenotipu (MENG i sur., 2001.), a uz to su dijagnostičke procedure razvijene prvenstveno za *E. coli* O157:H7 i nisu prilagođene različitim vrstama uzoraka kao što je feces, hrana ili klinički uzorci (ANON., 2004.b). Kako je izolacija različitih VTEC sojeva *E. coli* u hrani i vodi ograničena malom infektivnom dozom, malobrojne stanice u neselektivnim hranilištima lako preraste druga mikroflora, a VTEC su osjetljive i na komponente selektivnih bujona (FENG i sur., 2001.).

Za inače malu učestalost izolacije VTEC sojeva iz školjkaša postoji više mogućih razloga; mali broj ovih bakterija u obalnom moru, poteškoće u izolaciji iz školjkaša uz veliku pozadinsku mikrofloru, prisutnost živih, ali nekulturable VTEC zbog stresa utjecajem mora (GOURMELON i sur., 2006.). Također neki od medija mogu biti pogodni, dok drugi mogu inhibirati ili zaustaviti rast nekih non-O157 VTEC (BAYLIS i sur., 2003. cit. BAYLIS i sur., 2008.; BAYLIS, 2004. cit. BAYLIS i sur., 2008.). Dodatak novobiocina koji se inače koristi u bujonu za oživljavanje VTEC O157 može inhibirati rast nekih od ostalih VTEC sojeva (VIMONT, 2006.a).

Zbog gore navedenog, u našem radu za pretragu svih uzoraka školjkaša u periodu istraživanja, korištena je već prilagođena rutinska MPN metoda za izolaciju i brojanje  $\beta$ -glukuronidaza *E. coli*, ISO/TS 16649-3:2005 (ANON., 2005.b) kao već provjerena referentna metoda u monitoringu proizvodnih područja školjkaša, propisana Pravilnikom RH (ANON., 2007.f). DONOVAN i sur. (1998.) su ranije unaprijedili ovu metodu, te se za oživljavanje *E. coli* iz slanog morskog okoliša prije subkultivacije na selektivni agar primjenjuje neselektivni mineralno-modificirani-glutamatni bujon (MMBG). Identifikacija *E. coli* se temelji na prisutnosti 5-brom-4-klor-3-indol- $\beta$ -D-glukuronida u kromogenom agaru koji nakon hidrolize s  $\beta$ -glukuronidazom, oslobađa dobro vidljive komponente (RIPPEY i sur., 1987.; FRAMPTON i sur., 1993.). Kromogeni žučni tripton X-glukuronid agar (TBX) za izdvajanje  $\beta$ -glukuronidaza pozitivnih kolonija primijenjen u našem istraživanju, pogodan je za većinu VTEC (BAYLIS i sur., 2008.).

Za izolaciju *E. coli* O157:H7 upotrebljavaju se selektivne podloge s dodatkom antibiotika za inhibiciju prateće mikroflora i izdvajanja malog broja *E. coli* iz miješane

bakterijske populacije. Radi mogućeg toksičnog utjecaja antibiotika na oslabljene stanice, različiti autori preferiraju različite bujone (EDEL i KAMPELMACHER, 1973.; OKREND i ROSE, 1989.) jer je i za isti soj *E. coli* O157 prikladnost određenih bujona različita zbog različitih fizioloških stanja organizama u testu (DRYSDALE, 2004.). Uputa OIE (ANON., 2004.b.) navodi mogućnost uporabe različitih protokola za izolaciju *E. coli* O157:H7; BPW-VCC, mTSBNn, mECN, na 41-42 °C, uz različito vrijeme inkubacije (od 6 sati za uzorke mesa do 24 sata za vodu i mliječne proizvode).

U našem istraživanju kronološki su korištene tri klasične metode za izdvajanje  $\beta$ -glukuronidaza negativne VTEC O157:H7, u kojima je verifikacijom određena najprimjerenija varijanta tehnike izdvajanja *E. coli* O157:H7 na agaru izbora, te osjetljivost i uopće prikladnost za daljnju pretragu testnih uzoraka. Metode u radu su verificirane umjetnom kontaminacijom sa tri  $\beta$ -glukuronidaza pozitivna soja *E. coli* i  $\beta$ -glukuronidaza i sorbitol negativnom VTEC O157:H7.

Po metodi 1 za izdvajanje *E. coli* O157:H7 korišteno je umnažanje u svih *E. coli* u MMGM bujonu na 37°C koje je prilagođeno uzorcima školjkaša već u rutinskoj MPN metodi, a radi oživljavanja i umnažanja svih VTEC u bujonu bez žučnih soli i antibiotika koji bi mogli inhibirati oporavak (OGDEN i sur., 2001.; HEPBURN i sur., 2002.). Verifikacijom ovog postupka potvrđen je rast *E. coli* O157 iz kulture spojene iz 5 epruveta dvostrukog MMGB, s tehnikom iscrpljivanja na dvije ploče TBX agara kao najprimjerenijom (slika 11). Osjetljivost postupka je bila 0,5 CFU *E. coli* O157/g školjkaša uz konkurentnu mikrofloru od 0,7 CFU *E. coli* non O157:H7/g školjkaša. Ovakvim postupkom uz rutinsku MPN metodu pretrage školjkaša nije potrebna dodatna homogenizacija uzorka, a zadovoljen je ekonomski aspekt iskorištenja postojećih podloga bez uvođenja novih hranjivih medija. Ipak izolacija  $\beta$ -glukuronidaza negativnih kolonija na TBX agaru je zahtijevala dodatnu identifikaciju *E. coli* preko EMBA agara i dalje IMVC testom, što je dugotrajan i intenzivan laboratorijski postupak za veliki broj uzoraka. Stoga je metoda 1 korištena na samom početku istraživanja tijekom 2007. i početkom 2008. godine do primjene druge dvije metode.

U našoj drugoj klasičnoj metodi za izdvajanje  $\beta$ -glukuronidaza negativne VTEC O157:H72, metodi 2, nakon ciljanog oživljavanja svih *E. coli* u MMGM bujonu, slijedilo je selektivno umnažanje soja O157:H7 u mTSB sa novobiocinom inkubiranim na 41,5 °C. Bujon mTSB je korišten u mnogim istraživanjima kliničkih uzoraka, kao i hrane sa dodatkom novobiocina (SZABO i sur., 1990.; BOLTON i sur., 1995.; HARA-KUDO i sur., 1999.; HEPBURN i sur., 2002.; HUSSEIN i sur., 2008.; SLANEC i sur., 2009.) i uz optimalnu

temperaturu inkubacije ne veću od 42 °C (DOYLE I SCHOENI, 1984.; SCOTTERI i sur., 2000.; OGDEN i sur., 2001.). VIMONT i sur. (2006.b) navode da se u 39,3% istraživanja koristi TSB, a u 60% eksperimenata i novobiocin. U svakom slučaju mTSB (s različitom kombinacijom antibiotika) preporučen je u više standardnih procedura za utvrđivanje *E. coli* O157:H7 u hrani (ANON., 2001.; FENG i WEAGANT, 2002.; ANON., 2008.). S obzirom na istraživanja gore navedenih autora, mTSB sa novobiocinom je izabran i za umnažanje u našem radu. Iako su sojevi O157 znatno otporniji na novobiocin nego VTEC non O157:H7, kod male razine onečišćenja radi utjecaja na brzinu rasta, 6 sati umnažanja preporučenih u standardnim protokolima nije dostatno (VIMONT i sur., 2007.). Stoga je u našem istraživanju uvijek korištena inkubacija od 18 - 24 sata.

Premda je MacConkey agar sa sorbitolom uz dodatak telurita i cefiksima (CT-SMAC) u najraširoj upotrebi za izdvajanje *E. coli* O157, neki su sojevi osjetljivi na telurit (PATON i PATON, 1998.b) i sorbitol-fermenteri kao i ostale *E. coli*, pa se preporučuje korištenje kromogenih medija (DE BOER i HEUVELINK, 2000.). Time je omogućeno prepoznavanje *E. coli* O157 i drugih *E. coli* na istoj ploči agara (BAYLIS i sur., 2008.).

U našem istraživanju korišten je kromogeni selektivni O157:H7 ID agar uz CT-SMAC za usporedbu, u verifikaciji tehnika izolacije. Fertiliteti O157:H7 ID agara ekvivalentna je SMAC podlozi, a većina *E. coli* O157:H7 kolonija uočljivija je već nakon 20 sati inkubacije za razliku od SMAC agara (BETTELHEIM, 2005.). Osjetljivost određena u ostalim istraživanjima O157:H7 ID agara je bila 100% kod inkubacije 20 do 48 sati, a specifičnost 95% bez CT dodatka i 98% sa CT dodatkom (MARTIN i sur., 1999.; BETTELHEIM, 2005.; JORDAN i MAHER, 2006.).

Verifikacijom ove metode 2, subkultivacijom kulture tehnikom iscrpljivanja na samo jednoj ploči (slika 12) uz umjetnu kontaminaciju uzorka sa 0,5 CFU *E. coli* O157/g školjkaša i 0,7 CFU *E. coli* non O157:H7/g školjkaša, potvrđen je dostatan rast istovremeno pojedinačnih kolonija, na oba agara CT-SMAC i O157:H7 ID. Uočljivost *E. coli* O157:H7 kolonija na pločama O157:H7 ID agara je odlična bez obzira na prisutnost komenzalne mikroflore. Što se tiče CT-SMAC agara, kolonije *E. coli* O157:H7 oker boje na ploči su slabo uočljive među ostalom mikroflorom (slike 12, 13 i 17). Ovime su potvrđeni prijašnji postulati da se na O157:H7 ID agaru kolonije *E. coli* O157:H7 lako mogu razlikovati od non-O157:H7 kolonija, ali ne i na CT-SMAC agaru (MARTIN i sur., 1999.; BETTELHEIM, 2005.; JORDAN i MAHER, 2006.). U metodi 2, osim pogodnosti oživljavanja svih *E. coli* pa tako i *E. coli* O157:H7 prilagođeno uzorcima školjkaša, bez moguće inhibicije žučnih soli i



antibiotika, identično metodi 1, nije potrebna dodatna homogenizacija školjkaša, a umnažanje *E. coli* O157:H7 u drugom bujonu je ciljano uz utrošak samo 10 mL mTSB-N po uzorku za razliku od 225 mL propisano standardnim protokolima i metode 3. Ipak izolacija je duža 24 sata radi upotrebe dva bujona.

Treći način izdvajanja *E. coli* O157 u našem radu - metoda 3, je direktno umnažanje 25 g homogenata u 225 mL mTSB-N propisano po u više prije spomenutih protokola, ISO 16654:2001 (ANON., 2001.), BAM (FENG i WEAGANT, 2002.), HPA (ANON., 2008.). Provjerom ovog postupka potvrđen je rast *E. coli* O157:H7 iz 25 g umjetno kontaminiranog uzorka školjkaša iz sve tri razine zagađenja s najmanjom količinom od 0,25 CFU uz 4 puta veću količinu kompetitivne *E. coli* u gramu uzorka (slike 14-16).

Tehnika iscrpljivanja obogaćene kulture mTSBN na jednoj petrijevoj ploči agara dala je odličan rezultat rasta dostatnog broja pojedinačnih  $\beta$ -GLUC negativnih kolonija bez obzira radi li se o čistoj kulturi *E. coli* O157 ili o miješanim kulturama. Pogodnost i svrha ove metode je iskorištavanje obogaćene kulture *E. coli* u mTSBN bujonu istovremeno za dvije metode, izolaciju i identifikaciju VTEC *E. coli* O157 u uzorcima školjkaša na selektivnom agaru i dokaz prisutnosti verotoksina ELISA metodom. Ipak potrebna je dodatna homogenizacija 25 g školjkaša uz rutinsku MPN metodu pretrage školjkaša.

Bez obzira na metodu izdvajanja *E. coli* O157:H7, tehnika nalijevanja na selektivni agar od 0,05 do 0,1 mL obogaćene kulture ili njenih razrjeđenja (do  $10^{-3}$ ), uvijek je dala pregusti rast. To znači da bi trebala priprema najmanje još dva iduća razrjeđenja obogaćenog bujona što je prezahtjevno i nepotrebno s obzirom na dobre rezultate tehnika iscrpljivanja ezom.

Što se tiče CT-SMAC agara dobivene su pojedinačne kolonije *E. coli* O157:H7, ali vrlo slabo uočljive boje u ostaloj mikroflori. To stvara teškoće u očitavanju i zahtijeva potvrdu velikog broja kolonija za identifikaciju *E. coli* O157 uz puno veći utrošak vremena, što je sukladno istraživanjima više autora (VERNOZY-ROZAND i sur., 2004.; MARTIN i sur., 1999., BETTELHEIM, 2005., JORDAN i MAHER, 2006.). Dokazan je i visok postotak slučajeva i sojeva bakterija koje rastu na ovom agaru i ne fermentiraju sorbitol, pa su nalik na *E. coli* O157:H7 kolonije (MANAFI i KREMSMAIER, 2001.; FENG i WEAGANT, 2002.; MÜLLER i EHLERS, 2005.; POSSE i sur., 2008.). GOURMELON i sur. (2006.) su ustvrdili da i uz primjenu imunomagnetske separacije dio bakterija iz pozadinske mikroflora školjkaša (*Aeromonas* spp. i *Shewanella putrefaciens*) raste na CT-SMAC agaru kao *E. coli* O157:H7 i uz to daju lateks pozitivnu reakciju za ovaj soj. Nadalje, također postoje i sorbitol-pozitivni sojevi *E. coli* O157, te ih nije moguće detektirati na SMAC agaru (GUNZER i sur., 1992.,

BIELASZEWSKA i sur., 1996.). Takvi su sojevi otkriveni u Europi (GYLES, 2007., MELLMANN i sur., 2008.). Iz tih razloga CT-SMAC agar nismo u našem istraživanju smatrali pogodnim agarom za testiranje školjkaša.

U našem je istraživanju provjerena osjetljivost i primjenjivost kulturelnih metoda (metode 1, 2 i 3 s odabranom varijantom izdvajanja bakterije na agaru) za izolaciju  $\beta$ -glukuronidaza negativne VTEC O157:H7. U tu su svrhu homogenizirani uzorci školjkaša zagađeni s različitim razinama *E. coli* O157:H7, *E. coli* non-O157 uz prirodnu mikrofloru. U svim pokusima za verifikaciju metoda VTEC O157:H7 je izdvojena i pri zagađenju homogenata školjkaša s više od 200 puta većom razinom kompetitivne mikroflore od ciljanog VTEC mikroorganizma (slike 18 - 23). Tako je paralelno iz uzorka školjkaša bez *E. coli* i onih zagađenja s 5400 MPN *E. coli* non-O157/100g školjkaša koji su umjetno kontaminirani s 0,25 CFU/g do 45 CFU/g VTEC O157:H7 (tablica 12) pomoću klasičnih metoda dokaza  $\beta$ -GLUC(-), potvrđen rast VTEC O157:H7 i na najmanjoj razini zagađenja. Osjetljivost sve tri metode izražena granicom detekcije je 0,25 CFU/g, a u uzorku s prirodnim sadržajem *E. coli* non-O157 od 1100 MPN/100g u metodi 3 i nešto niža, 0,2 CFU/g školjkaša (tablica 13). Granica detekcije  $\beta$ -glukuronidaza pozitivne *E. coli* određena je u standardnoj MPN metodi te također iznosi 0,2 CFU izraženo u gramu. Ovim je potvrđena osjetljivost klasičnih metoda za izolaciju VTEC korištenih u našem istraživanju koja je potrebna za prepoznavanje moguće malih količina VTEC u školjkašima, a u skladu sa istraživanjima o vrlo malim infektivnim dozama od <1 CFU VTEC/g (WILLSHAW i sur., 1994.; PATON i sur., 1996., TUTTLE i sur., 1999.).

Za dokaz VTEC u školjkašima uz klasične mikrobiološke metode tijekom 2009. godine, putem nalaza verotoksina (Stx) u našem radu koristili smo ELISA metodu na kulturama u bujonu obogaćenim preko noći. Ovom metodom pretraženo je 258 uzoraka ili 29% pretraženih školjkaša od ukupno pretraženih uzoraka tijekom istraživanja. ELISA predstavlja odličnu alternativu kompliciranim i dugotrajnim klasičnim tehnikama izolacije i identifikacije kao i drugim metodama koje su van dosega većine rutinskih laboratorija, za direktnu detekciju verotoksina *E. coli* u hrani ili fecesu (MACKENZIE i sur., 1998.; RANDALL, 1997.; BETTELHEIM i BEUTIN, 2003.).

Toksin ELISA-test je imunoenzimski test koji se temelji se na vezanju specifičnih antitijela za verotoksine uz supstrat koji čini ovu reakciju vidljivom (FENG, 2001.) i ima sposobnost detekcije svih VTEC sojeva (ANON., 2004.b). Iako se ELISA koristi za detekciju izoliranih bakterijskih kolonija koje stvaraju verotoksine (BUECHER i sur., 2003.), VTEC su

uglavnom prisutne u malom broju pa je potrebno biranje mnogo kolonija, uz veliki utrošak mnogo testova i vremena (BETTELHEIM i BEUTIN, 2003.). Zato je u ovom istraživanju primijenjena ELISA metoda na uzorcima školjkaša, zbog ograničene osjetljivosti primjenom direktno u uzorcima (ANON., 2004.a) za povećanje osjetljivosti i specifičnosti izvođena u supernatantu kulture TSB sa 20mg/l novobiocina (mTSBN), inkubiranom na 41,5 °C kroz  $20 \pm 2$  sata. Upravo je za detekciju verotoksina od svih protokola za obogaćivanje, ovaj protokol koji preporuča mTSBN izabran kao najbolji medij i za rast i za proizvodnju verotoksina (ARBAULT i sur., 2000.; ANON., 2005.a). ROCHA i sur. (2007.) su istraživali proizvodnja shiga toksina i uspješnost detekcije ELISA metodom u osam različitih bujona i potvrdili da bakterija u stresnim uvjetima kao što su prisutnost žučnih soli i / ili prisutnost antibiotika, rezultira povećanom ekspresijom i sintezom čimbenika virulencije. Kod izolata uzgajanih u prisustvu antibiotika najmanje su varijabilnosti i više razine proizvodnje Stx u supernatantu, a proizvodnja Stx nezavisna je od bakterijskog rasta.

ELISA korištena u ovom radu (Generic Assays, 6006) je kvalitativni test za određivanje verotoksina Stx1 i Stx2 (bez njihova razlikovanja) primarno namijenjen za uzorke fecesa, čija je deklarirana specifičnost na obogaćenim kulturama 98,8%, (postotak od stvarno negativnih), a osjetljivost 84,6%. (postotak od stvarno pozitivnih). Većina kitova za ELISA test specifično je razvijena za detekciju verotoksina u kliničkim uzorcima (feces), ali se većina može koristiti za pretragu hrane (PONTELLO i sur., 2003.; CAPPS i sur. 2004.) ako se koristi prikladno obogaćenje i poštuje procedura za ekstrakciju toksina (BAYLIS i sur., 2003. cit. BAYLIS i sur., 2008.). Tijekom našeg istraživanja radi prilagodbe ELISA metode na uzorke školjkaša, metoda je verificirana na različitim razinama zagađenja sa sojevima VTEC O157:H7 na umjetno i prirodno kontaminiranim uzorcima uz istovremenu kontrolu podudarnosti detekcijom *E. coli* O157:H7, standardnom kulturelnom metodom i određivanjem granice detekcije s klasičnom metodom brojanja što je u skladu s istraživanjem BOHAYCHUKA i sur. (2005.).

Granica detekcije ELISA testa prema uputama proizvođača izražena kao količina verotoksina - Stx (<10 pg/jazici) nemjerljiva je u klasičnim mikrobiološkim laboratorijima, te je u našem radu utvrđena granica detekcije izražena kao CFU u 25g pretraženih školjkaša. Na umjetno kontaminiranim uzorcima dagnji ELISA metoda je provjerena sa sve tri razine zagađenja. Najveća razlika u odnosu VTEC O157:H7 naprama *E. coli* non-VTEC iznosi 0,25 CFU/g naprama 54 CFU/g. To je više od 200 puta veća razina kompetitivne mikroflore od ciljanog VTEC mikroorganizma, a kod koje je u supernatantima obogaćenih kultura

dobivenih umnažanjem u mTSBN uspješno dokazana prisutnost verotoksina. Nadalje, u našem istraživanju ova metoda je provjerena i na prirodno kontaminiranim uzorcima školjkaša s mikroflorom koja je prilagođena uzorku te stoga vitalnija i jače inhibitorna od ciljane umjetno dodane VTEC. Razlika veća od 50 puta između 11 CFU/g kompetitivne *E. coli* (preračunato iz MPN/100g) i najmanje umjetno dodane količine ciljanog mikroorganizma VTEC O157:H7 od 0,2 CFU/g, (tablica 13) također je pokazala zadovoljavajuću osjetljivost. Tako je u supernatantima obogaćenih kultura potvrđena prisutnost Stx iz *E. coli* O157:H7, nakon umnažanja 18 sati u mTSBN i kod najvećih razrjeđenja ciljane VTEC.

U ELISA testu osim korištenog protokola s umnažanjem za povećanje osjetljivosti, test je proveden i u supernatantima početne suspenzije uzorka u MRD za oživljavanje iz rutinske MPN metode, bez umnažanja i dodatka antibiotika. Sukladno rezultatima nekih autora (BAYLIS i sur., 2003. cit. BAYLIS i sur., 2008.; BAYLIS, 2004.; ANON., 2005.a) bez obzira na razinu zagađenja nije dobiven pozitivan rezultat na prisutnost Stx (tablica 12). Osim toga bez umnažanja je ispitana i ELISA metoda direktno na homogenatima neinkubiranih uzoraka u bujonu, ali s dodatkom antibiotika za poticanje stvaranja Stx (tablica 14). U oba slučaja bez obzira na to je li uzorak školjkaša sadržavao prirodnu kompetitivnu *E. coli*/100g školjkaša ili ne, detekcija Stx pokazala se moguća kod direktnog ELISA testa samo kod jako visoke kontaminacije ciljanim mikroorganizmom. Ta količina od  $2 \times 10^6$  CFU/g nije dovoljna granica detekcije za VTEC, a pogotovo *E. coli* O157:H7 radi malih infektivnih količina koje se mogu naći u hrani.

U našem istraživanju dodatno je utvrđena i stabilnost verotoksina (tablica 14) u centrifugiranim obogaćenim kulturama pohranjenima na temperaturi  $5 \pm 2$  °C najmanje 60 dana (dalje nije istraživano) što omogućava pohranu pripremljenih uzoraka te obradu odjednom, na jednoj ELISA pločici. Takav postupak donosi uštedu u vremenu, novcu, korištenje samo jedne pozitivne i negativne kontrole tj. iskorištenje više jažica.

Podudarnosti Stx ELISA metode s umnažanjem, u usporedbi s klasičnom metodom izolacije u našem istraživanju (tablica 16) je 100%, kao i u istraživanjima nekih autora (CAPPS i sur., 2004.; BOHAYCHUK i sur, 2005.) uz utvrđenu granicu detekcije VTEC izraženu kao 0,2 CFU/g školjkaša. To je dostatno za detekciju pretpostavljenih infektivnih doza navedenih od drugih autora (WILLSHAW i sur., 1994.; PATON i sur., 1996.; TUTTLE i sur., 1999.). Određivanjem postotka pozitivnih uzoraka u testu prema uzorcima koji uistinu sadrže patogene određena je osjetljivost metode, dok je specifičnost definirana omjerom uzoraka koji daju negativan odgovor u testu i uzorcima koji doista ne sadrže patogene.

Osjetljivost i specifičnost testa je procijenjena kako bi se osigurala njegova učinkovitost za otkrivanje određenog patogena u određenoj hrani (BOHAYCHUK i sur, 2005.). ELISA test ima visoku specifičnost, ali je osjetljivost nešto manja od Vero-cell testa i PCR metode (BETTELHEIM i BEUTIN, 2003.). Tako je nakon obogaćenja u bujonu utvrđena specifičnost verotoksin ELISA testa na kliničkim uzorcima i uzorcima hrane različitih proizvođača od 98% do 100%, a osjetljivost od 85% do 100% (MACKENZIE i sur., 1998.; BEUTIN i sur., 2007.; ATALLA 2000., CAPPS i sur., 2004.; BOHAYCHUK i sur., 2005.). ELISA metoda primijenjena u našem istraživanju na obogaćenim kulturama usporedbom sa standardnom kulturnom metodom detekcije VTEC O157:H7, pokazala je osjetljivost i specifičnost od 100% (uz istu podudarnost) te je ovime potvrđen pravilan izbor postupka dokaza verotoksina u prethodno obogaćenim kulturama školjkaša preko noći u mTSBN.

Krajnja potvrda uspješnog izdvajanja VTEC klasičnim metodama izabranima u našem radu i utvrđivanja verotoksina iz uzoraka školjkaša prilagođenom ELISA metodom bila je nalaz VTEC i njihovih toksina u živim školjkašima zagađenima prirodnim putem filtracijom onečišćenog mora. Iz dva bazena s morem onečišćenim različitim količinama VTEC O157:H7, izdvojene su VTEC i dokazani verotoksini u uzorku školjkaša s utvrđenom količinom MPN VTEC od 22 - 92 CFU/g, kao i u uzorku s utvrđenom mnogo manjom količinom od 2,3 - 4,8 CFU VTEC /g školjkaša (slike 25 – 27). ELISA metodom su dodatno potvrđeni verotoksini i u sojevima izoliranim iz školjkaša i iz mora, što može biti alternativni pristup korištenja ove ELISA metode za dokaz VTEC u izolatima *E. coli* izdvojenima klasičnim mikrobiološkim metodama.

U našem istraživanju ELISA testom je od 258 ukupno pretraženih uzoraka školjkaša, utvrđen jedan Stx pozitivan uzorak školjkaša (0,4%) i to prnjavice (tablica 18) iz kojega su izolirane i pohranjene  $\beta$ -glukuronidaza pozitivne *E. coli* O:55 serotipa, kasnije potvrđene u PCR postupku kao VTEC. Dokazana je podudarnost ELISA s PCR postupkom u ovom istraživanju iznosila 100%. U istraživanju primjene ELISA metode, KUMAR i sur. (2004.) su također dokazali da su rezultati bili u korelaciji s testom na Vero stanicama i *stx* PCR postupkom, ali se radilo o izolatima *E. coli* iz školjkaša, a ne o direktnom dokazu ELISA metodom u uzorku školjkaša. U našem radu podudarnost ELISA s PCR testom na izoliranim sojevima je bila 100% u sva četiri potvrđena pozitivna izolata *E. coli* u PCR postupku. U petoj PCR pozitivnoj kulturi (oznaka 120) kasnije su ponovljenom pretragom u pojedinačnim kolonijama utvrđeni samo *eae* geni dok je potvrđen gubitak *stx* gena, što znači da nije moglo doći do stvaranja verotoksina ni potvrde ELISA testom.

U našem je radu identifikacija VTEC utvrđivanjem gena *stx 1* i *stx 2* za kodiranje verotoksina Stx 1 i Stx 2 koji određuju *E. coli* kao VTEC te dodatnih markera virulentnosti *eae* i *hlyA* gena koji kodiraju intimin i enterohemolizin - EHEC *hlyA*, obavljena multipleks PCR metodom za istovremeno umnažanje nekoliko VTEC virulentnih gena. Radi dobre uočljivosti razlika u veličini dobivenog produkta parova baza, korištene su početnice navedene u tablici 10 po PATON i PATON (1998.a).

PCR postupak je primijenjen na pohranjenim kulturama *E. coli* (ukupno 1100 kultura) porijeklom iz 900 uzoraka školjkaša sakupljanima u periodu od 9. mjeseca 2007. do 6. mjeseca 2010. godine. Naime zbog prisutnosti slobodnih *stx*-bakteriofaga u moru, PCR pretragom utvrđeni *stx* geni direktno u uzorcima samih školjkaša, mogu osim iz VTEC, potjecati i od bakteriofaga. MUNIESA i JOFRE su 1998. godine utvrdili visoku razinu bakteriofaga sa *stx2* genima u otpadnim vodama, a *stx* geni su dokazani i u uzorcima otpadnih voda više europskih zemalja, te u riječnim tokovima (MUNIESA i JOFRE 2000.; DUMKE i sur., 2006.). GOURMELON i sur., (2006.) su u vezi podrijetla *stx* gena i VTEC sojeva u školjkama pretražili i utvrdili *stx* gene u 15 raznih uzoraka voda i mora koji imaju utjecaj na uzgajališta školjkaša, ali nijedan VTEC soj nisu izolirali.

GOURMELON i sur. (2006.) su također potvrdili prisutnost *stx*-PCR inhibitora u tkivu školjkaša u preliminarnim testovima. Zbog toga i prije navedenoga, u našem istraživanju PCR metodom su potvrđivane kulture *E. coli* iz uzoraka školjkaša koje su sakupljane tijekom 34 mjeseca istraživanja. Kulture porasle na pločama odabranih selektivnih agara u klasičnim metodama izolacije *E. coli*, pohranjivane su u agaru za konzerviranje kao pojedinačni izolirani i/ili potvrđeni sojevi *E. coli* ili skupne kulture kolonija *E. coli* istih morfoloških karakteristika sa selektivne podloge za njihovu identifikaciju. Ovakvom detekcijom ciljanih kultura izoliranih iz hrane PCR metodom postiže se iznimna osjetljivost koja je inače smanjena radi prisutnosti raznih inhibitora u uzorcima (FENG, 2001.).

Analiza PCR testom više odabranih („pikiranih“) kolonija (engl. multiple colony picks) je završni protokol za detekciju VTEC u različitim prehrambenim proizvodima (ANON., 2005.a). Više radova opisuje tehniku pretrage bakterijskih kolonija struganjem pune eze kulture ili više kolonija poraslih na ploči agara određenih morfoloških karakteristika, koje se zajednički pretraže tom metodom (pul). Potom se iz svakog tog PCR pozitivnog pula sa smjesom izoliranih kultura *E. coli* (ili bakterijskog rasta) kolonije ponovo analiziraju kako bi se dobili VTEC izolati (MORA i sur., 2007.; HEDICAN i sur. 2009.; SLANEC i sur., 2009.). Tako je i u ovom istraživanju zbog velikog broja pohranjenih *E. coli* kultura, nakon

revitalizacije na svježem krvnom agaru više kultura resuspendirano zajedno za prvu skupnu PCR pretragu (pul). Nakon identifikacije pula kao PCR pozitivnog, drugim PCR testom ponovo su pretraživane pojedinačne kulture pripadajućeg pozitivnog pula do identifikacije pozitivnog jedinstvenog uzorka školjkaša. Trećom PCR pretragom identificirane su i pojedinačne kolonije unutar uzorka za pohranu čistih izolata i daljnju serološku identifikaciju.

Verifikacijom PCR metode korištene u našem radu, provjeren je utjecaj pohrane kultura *E. coli*, priprema uzorka i spajanje različitih količina kultura u zajedničkom pulu, na uspjeh izdvajanja DNA i detekciju gena. Pri tome je upotrijebljena dvokratno semikvantitativna tehnika miješanja *stx* pozitivne VTEC O157:H7 (porijeklo IZS Teramo, Italija) i non-VTEC *E. coli* ATCC 8739; ATCC 25922 i ATCC 35218 u različitim omjerima. Bez obzira je li se radilo o čistoj kulturi ili pulu sa samo jednom kolonijom VTEC O157:H7 i sa znatno većom količinom drugih *E. coli*, uvijek je dobiven pozitivan PCR rezultat s istim parovima baza (slika 30). PCR metoda je nadalje uz svaki ciklus provjeravana kontrolama koje služe kao indikatori ispravne reakcije čija podudarna očitavanja garantiraju uspješnost postupka. Negativna kontrola je uzorak bez ciljanih gena (DNA čista voda), a za pozitivnu kontrolu je služila ekstrahirana DNA *E. coli* izolata porijeklom ljudi sa simptomima HUS-a (porijeklo NZJZ SDŽ) s utvrđenim *Stx 1*, *Stx 2*, *eae* i *hlyA* genima koji su traženi i u radu (oznaka 8 i 9, slika 30).

U skoro tri godine ovog istraživanja pretraženo je 900 uzoraka školjkaša iz svih 12 proizvodnih područja dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana sa zastupljenim svim vrstama školjkaša koje su obuhvaćene planovima monitoringa školjkaša (NN 49/07, NN 91/08, NN 31/09, NN 37/10). Od ukupnog broja pretraženih uzoraka u 521 uzorku (57,9%) je utvrđena *E. coli*, a u 5 izoliranih kultura utvrđena je PCR pretragom prisutnost *stx* gena (grafikon 3). Tako je utvrđen 1% pozitivnih uzoraka školjkaša na prisutnost *E. coli*, pa u ukupnom broju pretraženih školjkaša prevalencija VTEC iznosi 0,6%. Ovakva dva načina izražavanja prevalencije (grafikon 6) su posljedica primijenjene pretrage u izoliranim kulturama, pa gdje nije prisutna *E. coli* ne može biti ni verotoksigena *E. coli*, dok s druge strane prevalencija u ukupnom broju pretraženih školjkaša u periodu istraživanja pokazuje realnije mogućnost izlaganja ljudi VTEC.

Prevalencije u našem radu, kao i prevalencije iz radova različitih autora teško se mogu međusobno usporediti radi korištenja različitih principa uzorkovanja i velikih razlika izabranih protokola za izolaciju i/ili otkrivanje ovih patogena, čak i kada se radi o istoj hrani kao što naglašavaju i drugi autori (MORA i sur., 2007.).

U istraživanjima školjkaša, uzorci uzorkovani na tržištu čine zasebnu kategoriju u kojima su utvrđene prevalencije od 2% do 5% VTEC. Metode i ciljani organizmi su različiti. SAMADPOUR i sur. (1994.) su DNA hibridizacijom na obogaćenim uzorcima školjkaša utvrdili 5% (n=44) pozitivnih Stx 2 uzoraka bez uspješne izolacije pozitivnih kolonija. RAMPERSAD i sur. (1999.) su u sirovim kamenicama i njihovim proizvodima utvrdili 2% izoliranih *E. coli* serotipa O157, dok prisutnost verotoksina nije ispitivana. KUMAR i sur. (2001., 2004.) su u Indiji u 4,2% izolata *E. coli* izdvojena iz 48 uzoraka školjkaša utvrdili *stx* gene, a u 6,3% uzoraka i *hlyA* gene. Nijedan uzorak nije posjedovao gen za otkrivanje *E. coli* O157. Druga kategorija su školjkaši pretraženi neposredno nakon uzorkovanja iz proizvodnih područja prije plasmana na tržište, kao što su školjkaši istraživani u ovom radu. Prevalencije u ovim istraživanjima se pogotovo razlikuju s obzirom na primijenjene metode.

Tako su GUYON i sur. (2000.) izolirali jedan soj *E. coli* O157 u 150 uzoraka kamenica (0,7%) u kojem je kasnije utvrđena prisutnost *stx1* i *stx2c* gena, ali ne i *eae* ili *hlyA*. DUPRAY i sur. (1999., cit ANON., 2003.b) su u 19% bujonskih kultura od 36 uzoraka školjkaša utvrdili *stx* gene, bez namjere izolacije VTEC sojeva. GOURMELON i sur. (2006.) su prvo PCR postupkom iz obogaćenih uzoraka školjkaša dokazali prisutnost *stx* gena s prevalencijom od 27,8% (n =144), a zatim su iz PCR pozitivnih uzoraka izolirali pet izolata što na kraju iznosi prevalenciju od 3,5% izoliranih VTEC. U istom radu je paralelno u jednom uzorku izolirana *E. coli* O157, *eae* i *hlyA* pozitivna, ali *stx* negativna. BENNANI i sur. (2011.) su u 5 izolata *E. coli* od 82 uzorka školjkaša u Maroku utvrdili *stx1* i *stx2* gene (ne i *eae*), što je prevalencija od 6,1% VTEC.

Općenito, prevalencije u istraživanjima s primjenom PCR metode direktno u uzorcima za otkrivanje *stx* pozitivnih školjkaša su znatno veće (DUPRAY i sur., 1999., cit ANON., 2003.b; GOURMELON i sur., 2006.) od onih dobivenih primjenom metoda izolacije *E. coli* (GOURMELON i sur., 2006.; BENNANI i sur., 2011.). Uzrok ove razlike u prevalencijama su vjerojatno *stx* geni u uzorcima koji potječu i iz slobodnih *stx*-bakteriofaga u moru (MUNIESA i JOFRE 1998.; DUMKE i sur., 2006.) i/ili stvarno malog broja ovih bakterija u obalnom moru odnosno poteškoća u izolaciji i prisutnosti živih, ali nekulturable VTEC (GOURMELON i sur., 2006.). Bez obzira na način izražavanja prevalencije, ovim istraživanjem je dobiven prvi dokaz VTEC u školjkašima istočne obale Jadrana, a po našim saznanjima i u cijelom Jadranu. Našim nalazom u školjkašima uzorkovanim direktno iz proizvodnih područja također su potvrđena saznanja prijašnjih autora o kontaminaciji mora i



prijenosu VTEC iz okoliša (DUPRAY i sur., 1999.b; GOURMELON i sur., 2006.; BENNANI i sur., 2011.).

U našem istraživanju (slika 31) su u 16 uzoraka školjkaša u izoliranim kulturama *E. coli* utvrđeni *eae* geni bez *stx* gena, što je tipično za enteropatogene *E. coli* - EPEC. U još jednoj kulturi, utvrđen je samo *hlyA* gen koji kodira enterohemolizin karakterističan za enterohemoragične *E. coli* – EHEC. Kako je *hlyA* gen jedan od dodatnih markera virulencije i karakterističan za većinu EHEC, postoji mogućnost gubitka *stx* gena tijekom postupka precjepeljivanja (KARCH i sur., 1992.; SCHMIDT i sur., 1999.; FENG i sur., 2001.; BIELASZEWSKA i sur., 2007.). U radovima nekih autora ovakvi su sojevi *E. coli* na osnovi prisutnosti samo ovog gena svrstani u VTEC skupinu (KUMAR, 2001., 2004.; DHANASHREE i MALLYA, 2008.). Ipak kako je *hlyA* gen široko rasprostranjen u sojevima *E. coli* izoliranim iz okoliša (BOCZEK i sur., 2006.) i pošto u ovom istraživanju u *hlyA* pozitivnoj kulturi ipak nije dokazana prisutnost gena markera za VTEC, po uobičajenoj klasifikaciji patogenih *E. coli* (PATON i PATON 1998.b) i jednako kao GOURMELON i sur. (2006.) o VTEC u školjkašima, mi ovu kulturu nismo svrstali u VTEC za razliku od prije navedenih autora (KUMAR, 2001., 2004.; DHANASHREE i MALLYA, 2008.).

S druge strane, proizvodnju enterohemolizina su i u manjem broju EPEC dokazali još BEUTIN i sur. (1998.). Pošto se različiti patotipovi dijarogenih *E. coli* međusobno preklapaju u posjedovanju virulentnih faktora (DONNENBERG, 2002.), a gen za enterohemolizin nosi i do 27,7% atipičnih EPEC sojeva (BUGAREL i sur., 2011.) radi daljnje statističke obrade rezultata istraživanja skupine VTEC sojeva nasuprot ostalih patogenih *E. coli*, ovaj je soj pridružen EPEC. Ukupno je utvrđeno 17 (3,3%) EPEC u izolatima *E. coli*, što je prevalencija od 1,9% EPEC. Zajedno je utvrđeno 2,4% patogenih dijarogenih *E. coli* u školjkašima iz proizvodnih područja dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana (grafikon 6). Geni su utvrđeni i u svježim kulturama i u onim starim pohranjenima više od 2,5 godine na STOCK agaru (tablica 19).

Od 5 kultura *E. coli* identificiranih u našem radu kao VTEC, različite su kombinacije gena markera i dodatnih virulentnih gena pa 60% kultura nosi *stx1* gene, 40% nosi *stx2*, dok kulture s oba gena nisu utvrđene. Genotipovi *stx 1* i *stx2* su jednakomjerno zastupljeni u četiri izolata iz dagnji, dok je među prnjavicama dokazan samo jedan pozitivan genotip, *stx1* (grafikon 4). U istraživanju VTEC u školjkašima neki od autora (KUMAR i sur. 2001., 2004.; GOURMELON i sur. 2006.; BENNANI i sur, 2011.) su utvrdili da je zastupljenost gena *stx 1* i *stx2* raznolika, ali uz njih nije dokazana prisutnost dodatnog virulentnog faktora *eae* gena, za

koji se smatra da sudjeluje u sposobnosti VTEC da izazove jaču bolest (PATON i PATON, 1998.b; BLANCO i sur., 2004.; GYLES, 2007.). *Eae* sojevi VTEC non-O157 rijetko su bili izolirani i u drugim uzorcima hrane (BEUTIN i sur., 2007.; MORA i sur., 2007.).

Nasuprot tome, u našem istraživanju je u dvije od pet VTEC kultura utvrđena prisutnost *eae* dodatnih virulentnih gena, oba puta uz *stx1* gen, a u jednom od njih i uz *hlyA* gen, što čini genotip visoko patogenih tipičnih EHEC sojeva (NATARO i KEPER, 1998.). Sličan genotip je utvrđen u istraživanju kamenica u jedinom izoliranom soju, *E. coli* O157 i to sa *stx*, *eae* i *hlyA* genima (GUYON i sur., 2000.).

Ipak određeni broj VTEC izoliran iz pacijenata s HUS-om ne sadrži *eae* dokazujući da intimin nije uvijek ključan za virulentnost u ljudi (PATON i sur., 1999.; BLANCO i sur., 2004., BIELASZEWSKA i sur., 2006.; MELLMANN i sur., 2008.). Neke epidemiološke studije su pokazale da su VTEC sojevi koji proizvode Stx2, češće povezani s težim simptomima bolesti nego oni sa Stx1 ili čak oba tipa toksina (PATON i PATON, 1998.b). Naime utvrđeni su faktori rizika za razvoj krvavog proljeva kao *stx2* i *eae* geni u starije populacije, a za razvoj HUS-a su to *stx2* i *eae* geni, ali u dobnoj skupini djece mlađe od 7 godina (EKLUND i sur., 2001.; ETHELBERG i sur., 2004.). Međutim ako se uzme u obzir i utjecaj serotipa, u procjeni ozbiljnosti slučajeva nema statistički značajne razlike u pacijenata inficiranih s non-O157 VTEC u kojima su izolirani Stx2 ili samo Stx1 tipovi, za razliku od onih s VTEC O157 (HEDICAN i sur., 2009.). Smatra se da veza između Stx2 proizvodnje i sposobnosti VTEC soja da izazove HUS nije apsolutna, jer su i VTEC sojevi koji proizvode samo Stx1, sposobni izazvati bolest (PATON i PATON, 1998.b).

Najnoviju epidemiju s 3469 oboljelih od kojih 852 slučaja HUS-a, te 50 smrtnih slučajeva, u Njemačkoj je uzrokovao serotip O104: H4 s neobičnom kombinaciju patogenih obilježja. Ovaj izolat ima *stx2a* gen tipičan za VTEC i gen *aggR* tipičan za enteroagregativne *E. coli* (EAaggEC), a nema A/E sposobnost virulentnih VTEC sojeva (negativni PCR rezultati za *eae*) i *hlyA*. Ovo epidemija je potvrda da neobična kombinacija čimbenika virulencije VTEC može dati vrlo visok stupanj patogenosti (SCHEUTZ i sur., 2011.).

Ukoliko u ovom kontekstu sagledamo naše rezultate istraživanja, u školjkašima su utvrđene VTEC kulture s različitim kombinacijama gena, te moguće i različitih stupnjeva patogenosti (slika 31). Velika vjerojatnost da su ovi izolati sposobni izazvati bolest utvrđena je dokazom proizvodnje verotoksina ELISA metodom u četiri izolata pozitivna u PCR postupku. U VTEC kulturi iz uzorka oznake 120-1 u međuvremenu je precjepljivanjem radi dobivanja pojedinačnih izolata došlo do gubitka *stx* gena ili samih kolonija s tim genima i

time mogućnosti stvaranja verotoksina. Duljina pohrane sojeva nije utjecala na sposobnosti stvaranja verotoksina (tablica 19).

Uspjeh izolacije pojedinačnih PCR pozitivnih kolonija iz 22 PCR pozitivne kulture *E. coli* bio je u rasponu od 100% do samo 7%. To može ovisiti o samoj zastupljenosti VTEC (i EPEC) u uzorku, odnosno o broju, izboru kolonija i čistoći primarne kulture na selektivnoj podlozi. Tako su iz VTEC kultura u 4/5 uzoraka dobivene pojedinačne VTEC kolonije, dok iz spomenute kulture oznake 120-1 ponovljenim PCR testom u 30 pojedinačnih kolonija nisu utvrđeni *stx i hlyA* geni, a utvrđena je ponovo prisutnost *eae* gena. Ponovljeni multipleks PCR test na prethodno izdvojenoj i pohranjenoj DNA iz ove *E. coli* kulture je dao identičan rezultat kao i prvi put (slika 32). Također u tri od ukupno 17 EPEC kultura ponovljenim PCR testiranjem po pet kolonija iz pozitivne kulture nisu utvrđeni *eae* geni, a s obzirom da su VTEC bile primarni cilj, ovdje nije dalje pretraživan veći broj kolonija.

Inače, broj potrebnih kolonija iz primarne kulture za izolaciju pojedinačnih VTEC i određivanje serotipa varira od autora do autora, te se kreće uglavnom od 10 do 50 kolonija (PRADELL i sur., 2000.; MORA i sur., 2007.; VAN DUYNHOVEN i sur., 2008.). Zbog visoke razine konkurentnih mikroorganizama i ostalih sojeva *E. coli*, neki su autori pretraživali čak i 300 do 500 kolonija za potvrdu također s relativnim uspjehom (SLANEC i sur., 2009.; BAYLIS i sur., 2008.). Mogućnost propusta patogena u izolacijskom procesu je velika (SCHMIDT i sur., 1999.; KHAN i sur., 2002.) što je mogući prvi razlog neuspjeha izolacije čistog VTEC soja iz naše kulture spomenutog pozitivnog uzorka. Drugi mogući razlog neuspješne izolacije pojedinačnih VTEC kolonija u uzorku 120 može biti već i prije spomenuti gubitak virulentnih gena, što nije rijedak slučaj uslijed subkultivacija kod ovakvih metoda o čemu govore i ostali autori (KARCH i sur., 1992.; SCHMIDT i sur., 1999.; FENG i sur., 2001.; BIELASZEWSKA i sur., 2007.). Ako od pojedinačnih kolonija iz pozitivnog uzorka PCR metodom u ponovnoj PCR reakciji niti jedna od ispitivanih kolonija nije pozitivna, uzorak se karakterizira kao PCR pozitivni uzorak bez VTEC izolacije (MORA i sur., 2007.; HEDICAN i sur., 2009.).

Sve utvrđene VTEC kulture u istraživanju su kao većina non-O157:H7 *E. coli* sojeva,  $\beta$ -glukuronidaza pozitivne, sorbitol negativne, te uobičajenog biotipa I po IMViC reakcijama (tablica 18). Sve EPEC kulture su također  $\beta$ -glukuronidaza pozitivne, ali sorbitol fermentira 82% EPEC kultura. Zastupljenost  $\beta$ -glukuronidaza pozitivnih *E. coli* u ovom istraživanju je 100% među VTEC i EPEC sojevima, identično prethodno navedenim radovima o školjkašima. To je značajno iz perspektive mogućeg iskorištenja propisane metode za

monitoring školjkaša, ISO/TS 16664-3:2005 (ANON., 2005.b) u iskorištavanju poraslih kolonija  $\beta$ -glukuronidaza pozitivne *E. coli* na pločama TBX agara za otkrivanje VTEC i EPEC sojeva, jer će vjerojatno biti obuhvaćen visok postotak ovih sojeva.

Od 900 uzoraka pretraženih u našem radu, u 27 izolata potvrđenih kao *E. coli* s tipičnim morfološkim karakteristikama za O157:H7 serotip, nije utvrđena prisutnost traženih virulentnih gena niti su serotipizacijom izolati potvrđeni kao *E. coli* O157. Kako su sve VTEC i EPEC kulture morfološki i serološki aglutinacijom negativne na serotip O157:H7, to je zastupljenost non-O157:H7 serotipova VTEC u školjkašima dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana 100%. Također, VTEC O157:H7 nije utvrđena ni u školjkašima u prethodnim studijama (SAMADPOUR i sur., 1994.; KUMAR i sur., 2001., 2004.; MACRAE i sur., 2003., cit. GOURMELON i sur., 2006.; GOURMELON i sur., 2006.) osim u istraživanju GUYON i sur. (2000.) gdje je taj soj utvrđen u jednom od 150 uzoraka.

U našem radu serotipizacijom izolata s dostupnim O antiserumima u NZJZ SDŽ i HZJZ u Zagrebu, utvrđena su tri serotipa među pet VTEC kultura. U dvije kulture serotip O78, u dvije O55 i u jednoj kulturi O7 serotip. Od ostalih sojeva *E. coli* s dokazanim virulentnim genima, izolat sa samo *hlyA* genom je bio O rough, a od ostalih EPEC kultura aglutinabilno je bilo 5 od ukupno 17 izolata, te su utvrđeni serotipovi O103, O125, O126, O127, O128. Za VTEC serogrupe O7 i O55 koje su utvrđene i u ovom istraživanju navodi se da su izolirane i iz ljudi i iz hrane (ANON., 1999.d; WERBER i sur., 2008.). Unutar grupe O55 dosta serotipova je izolirano iz pacijenata sa simptomima HUS-a (ANON., 1999.d; BEUTIN i sur., 2004.; PERELLE i sur., 2004.; MELLMANN i sur., 2008.), a ova serogrupa je poznata kao uzrok sporadičnih epidemija u više zemalja Europe i SAD (JOHNSON i sur., 2006.; BROOKS i sur., 2005.). VTEC O55 serogrupa je utvrđena i u boćatom moru uz zadržavanje citotoksičnosti čitavo vrijeme preživljavanja (BOUKEF i sur., 2010.). BUGAREL i sur. (2011.) između ostalih sojeve *E. coli* unutar serogrupe O55 sa *stx* i *eae* genima navodi kao nove EHEC, a u ovom istraživanju karakteristike takvog potencijalno opasnog soja ima VTEC kultura oznake 39-3. Unutar serogrupe O7, GYLES (2007.) navodi sojeve kao uzročnike sporadičnih infekcija sa HUSom, dok su VTEC sojevi unutar serogrupe O78 zasada izolirani iz fecesa ljudi sa dijarejom (FRIEDRICH i sur., 2002.; TSAI i sur., 2006.) i krvavim proljevom (VAN DUYNHOVEN i sur., 2008.). Za serogrupe utvrđene u ovom radu, autori potvrđuju da su izolirane iz životinja i iz njihovih proizvoda (ARTHUR i sur., 2002.; PONTELLO i sur., 2003.; AIDAR-UGRINOVICH i sur., 2007.; SLANEC i sur., 2009.;

MANNA i sur., 2010.), dok iz rijetkih podataka o izoliranim VTEC serotipovima iz školjkaša ove serogrupe nisu utvrđene.

Važno je napomenuti da su među uspješno serotipiziranim EPEC u našem istraživanju utvrđene serogrupe koje se spominju i među najčešće izoliranim VTEC u epidemijama u Europi, O126 i O103 (MORA i sur., 2007.; EBLEN, 2008.; LATHROP i sur., 2009.; MELLMANN i sur., 2008.; BOLTON i sur., 2009.; McPHERSON i sur., 2009., ANON., 2010.e). U tom smislu postoji mogućnost gubitka *stx* gena tijekom izolacije i pohrane izolata *E. coli* iz školjkaša, te identifikacije ovih sojeva kao EPEC kultura (SCHMIDT i sur., 1999.; BIELASZEWSKA i sur., 2007.; BUGAREL i sur., 2011.).

Značaj EPEC sojeva osim što izazivaju dijareju u ljudi (MENG i sur., 2001.) ogleda se i u činjenici da su ovi sojevi i pogodni primatelji virulentnih gena, tj. mogući rezervoar za stvaranje novih EHEC sojeva (BUGAREL i sur., 2011.). Stx-fagi koji su pokazali visoku postojanost u vodenim sustavima mogu prenositi *stx* gene na druge *E. coli* što rezultira pojavom novih patogenih sojeva (MUNIESA i sur., 2006.; MELLMANN i sur., 2008.). Postojanost samih virulentnih gena u moru (MIYAGI i sur., 2001.) jednako je važno kao prisutnost mogućih nosioca gena, što je i u našem radu potvrđeno pokusom prijenosa VTEC iz laboratorija u more pa u školjke, gdje je VTEC O157:H7 čitavo vrijeme je zadržala *stx* gene i sposobnost stvaranja Stx.

U našem istraživanju od pet VTEC kultura četiri su utvrđene u dagnjama, a jedna u prnjavicama. U 17 uzoraka s EPEC zastupljene su tri od četiri pretraživane vrste školjkaša i to s najvećim udjelom 76% (13) dagnje, prnjavice 18% (3), te kamenice 6% samo sa jednim uzorkom (grafikon 7). Ovi odnosi su u skladu s udjelima pretraženih pojedinih vrsta školjkaša tijekom istraživanja i to redom dagnje, prnjavice, kamenice, kunjke sa 71,3%; 13,1%; 8,9% i 6,7% (tablica 17).

Iako je najveći broj VTEC (i EPEC) izoliran u dagnjama (grafikon 3) prevalencija VTEC u ukupnom broju pretraženih uzoraka (grafikon 8) je najveća u prnjavicama (0,9%) dok je u dagnji manja (0,6%). U kamenicama i kunjkama prevalencija je 0%. Što se tiče nalaza EPEC u prnjavica je prevalencija najveća (2,5%), zatim slijede dagnje (2,0%) pa kamenice (1,3%), a u kunjki je prevalencija 0%. Prevalencije VTEC u izoliranim kulturama *E. coli* u školjkašima očekivano su veće uz isti odnos. Od 71,2% uzoraka prnjavica s utvrđenom *E. coli* 1,2% je VTEC pozitivno, a u dagnji je to 1,1% od 57,9% uzoraka s izoliranom *E. coli*. Slično je i kod EPEC gdje je u dagnjama i prnjavicama utvrđeno 3,5% odnosno 3,6% u uzorcima s izoliranom *E. coli*, a u kamenicama od 52,5% izoliranih kultura

*E. coli* njih 2,6% je pripadalo EPEC. Iz izoliranih 38% kultura *E. coli* u uzorcima kunjki prevalencija EPEC je 0%. Ovako izražena prevalencija u broju izoliranih kultura *E. coli* ima značaj za određivanje potrebnog broja uzoraka za daljnja i/ili slična istraživanja školjkaša s metodama izolacije *E. coli* uz naknadnu karakterizaciju.

Nalaz VTEC i/ili EPEC u različitim vrsta školjkaša je u korelaciji s postotkom uzoraka s izoliranom *E. coli*, ali razlike mogu biti i posljedica izbora metode dokaza VTEC/EPEC u izolatima *E. coli*. U istraživanju GOURMELON i sur. (2006.) s više vrsta pretraženih školjkaša, *stx* geni su utvrđeni u svim istraživanim vrstama. Ipak kada su kamenice i kučice uzorkovane u istom mjestu i danu, *stx* geni su češće nađeni u kućicama nego u kamenicama. Kod metode izolacije međutim, izolirali su VTEC samo u kamenicama i dagnjama. Uzrok vrlo lako može biti u kombinaciji čimbenika kao što su razlike u fiziologiji, biologiji i staništu školjkaša.

Tako je u našem radu u područjima učestalog onečišćenja s *E. coli* gdje je u istom području istovremeno uzorkovano više vrsta školjkaša, dokazana velika razlika u učestalosti izolacije *E. coli* u prnjavicama i kunjkama (tablica 26). Pošto su izbjegnuti utjecaji različitih makrolokacija, uzrok ove razlike je najvjerojatnije taj što prnjavice žive ukopane u mulju (dulji opstanak *E. coli*) te je homogenizirani uzorak prnjavica sačinjavao puno više jedinki, o čemu govore i GOURMELON i sur. (2006.). Ako tome dodamo i potvrđenu spoznaju u našem radu da kunjke zbog građe imaju izrazito žilavu konzistenciju mišićja te je otežana homogenizacija uzorka, nije neobično da je najmanji udio utvrđenih uzoraka s *E. coli* u ovoj vrsti školjkaša i nijedan uzorak s dokazanom VTEC i EPEC.

Razlike u učestalosti nalaza *E. coli* između različitih vrsta školjkaša dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana, 71,2% (84/118) u prnjavica; 57,9% (372/642) u dagnji; 52,5% (42/80) kamenica i najmanje u kunjki 38,3% (23/60) statistički se razlikuju ( $p < 0,001$ ) (tablica 22). Stoga, kako je *E. coli* pokazatelj fekalnog zagađenja vjerojatno postoji i potencijalno veći rizik od ostalih prisutnih patogena u fekalijama za one konzumente koji uživaju određene vrste školjkaša. Međutim, bez obzira na utvrđene razlike učestalosti nalaza *E. coli* među vrstama, statistički opažene razlike u prevalenciji VTEC i EPEC između različitih vrsta školjkaša, bilo u kulturama izolirane *E. coli* (redom VTEC; EPEC;  $p=1$ ,  $p=0,8$ ), bilo u ukupnom broju pretraženih školjkaša ( $p=0,8$ ), u našem istraživanju nisu statistički značajne (tablica 21).

Odnos srednjih vrijednosti MPN *E. coli*/100g školjkaša (dalje MPN) različitih vrsta u našem istraživanju (grafikon 10) uključujući uzorke bez *E. coli*, gdje je vrijednost  $< 20$  MPN

zamijenjena s brojem 0, pokazuju da su najveće prosječne vrijednosti (2473 MPN) uočene u prnjavicama koje su i najčešće kontaminirane. Slijede dagnje s 237 MPN, kamenice s 106 MPN, te kunjke s najnižom srednjom vrijednosti od 21 MPN *E. coli*/100 g, koje su i inače rjeđe kontaminirane od ostalih promatranih vrsta. Njihove srednje vrijednosti uzoraka s  $\geq 20$  MPN i maksimalne vrijednosti su u jednakim odnosima, a najveća vrijednost je bila 160 000 MPN u prnjavicama (proizvodna zona koja je kasnije ukinuta za proizvodnju). Uočene razlike vrijednosti prosječnog MPN školjkaša (tablica 22) između različitih vrsta školjkaša statistički se razlikuju ( $p < 0,001$ ).

Također, najniža učestalost nezadovoljavajućih uzoraka školjkaša dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana po važećem pravilniku RH (ANON., 2008.c) za stavljanje školjkaša na tržište ( $>230$  MPN *E. coli* u 100 g školjkaša) je kod kunjki 0%, a najviša u prnjavica, 21%. Ove su opažene razlike u učestalosti nezadovoljavajućih nalaza između različitih vrsta školjkaša statistički značajne ( $p < 0,001$ ).

Vrijednosti MPN *E. coli* u 100 grama školjkaša VTEC pozitivnih uzoraka (grafikon 9) u dagnji se kreće od 16000 MPN do najniže brojive vrijednosti od 20 MPN, dok jedine VTEC pozitivne prnjavice imaju vrijednost od 130 MPN *E. coli*. Kod EPEC pozitivnih uzoraka dagnji raspon je od 700 MPN *E. coli* (samo 1/13) sve do 20 MPN *E. coli* gdje svih ostalih dvanaest uzoraka ima  $\leq 230$  MPN. U prnjavica je raspon od 90 - 790 MPN gdje dva od tri uzorka imaju manje  $\leq 230$  MPN, a u kamenica je samo jedna vrijednost, 170 MPN.

Što se tiče 12 proizvodnih područja istraženih u našem radu (grafikon 5) EPEC pozitivni uzorci nađeni su u skoro polovine područja (42%), VTEC su pronađene samo u dva proizvodna područja (17%). Četiri od pet (80%) sojeva VTEC je utvrđeno u Malostonskom zaljevu, a preostali uzorak s VTEC potječe iz područja Ušća rijeke Krke. Iz Malostonskog zaljeva također je i najveći postotak EPEC kultura 65% (11/17), dok je podjednaki broj EPEC pozitivnih uzoraka raspoređen na Ušće rijeke Krke i Kaštelanski zaljev; 12% (2/17), a po 6% (1/17) na Marinski zaljev i područje Uvala Sobra-Mljet (grafikon 11). Područje Malostonskog zaljeva je interesantno jer su u njemu zastupljene sve četiri vrste promatranih školjkaša u istraživanju (grafikon 19). VTEC je utvrđena u 0,8% dagnji i 6,3% prnjavica, EPEC u 2,3% dagnji, 6,3% prnjavica i 1,3% kamenica, dok u kunjkama nije bilo pozitivnih uzoraka (tablica 26). Pošto je najveći broj pretraženih uzoraka u ovom području, tu je i najveći broj uzoraka s izoliranom *E. coli*, pa je shodno tome očekivano najviše nađenih EPEC i VTEC pozitivnih uzoraka (grafikon 14). Međutim, ukupna prevalencija VTEC iz proizvodnog područja Malostonski zaljev je manja (4/498) i iznosi 0,8%, nego u području Ušća rijeke Krke gdje je

0,9%, sa samo jednim utvrđenim VTEC pozitivnim uzorkom od 110 pretraženih (grafikon 12). Isti su odnosi prevalencija VTEC u ova dva područja među uzorcima sa izoliranom *E. coli* gdje je u Malostonskom zaljevu iz 57% uzoraka dobivamo 1,4% kultura VTEC, a u Ušću rijeke Krke od 61% uzoraka s izoliranom *E. coli*, verotoksigeno je 1,5% (grafikon 13).

Prevalencije EPEC (grafikoni 12 i 13) su najveće u proizvodnim područjima dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana s najmanjim brojem EPEC pozitivnih uzoraka, pa je prevalencija od 2,2% u Malostonskom zaljevu s 11 uzoraka od 498 ukupno pretraženih manja od prevalencije u ukupnom broju pretraženih školjkaša Marinskog zaljeva (5,9%). Zbog malog broja pretraženih uzoraka slično je i u Uvali Sobra – otok Mljet gdje je utvrđena prevalencija od 5,6% EPEC u ukupno pretraženim uzorcima (n=18). Prevalencije EPEC u uzorcima sa izoliranom *E. coli* su u istim odnosima, ali nešto veće. Iako se raspon prevalencija u našem istraživanju na različitim lokacijama kreće od 0% do 1,5% kod VTEC, te sve do 10% kod EPEC (tablica 23), razlika u pojavnosti VTEC i EPEC u izoliranim kulturama *E. coli* ( $p=0,87$  i  $p=0,78$ ), kao i pojavnost VTEC i EPEC u ukupno pretraženim uzorcima između dvanaest različitih proizvodnih područja dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana nije statistički značajna ( $p=0,87$  i  $p=0,9$ ).

Nalaz VTEC u više odvojenih područja uzgoja ili izlova školjkaša iz našeg rada podudara se sa nalazima GOURMELONA i sur. (2006.) i BENNANI i sur. (2011.). Nalaz istih serotipova (serotipovi O55 i O78 u Malostonskom zaljevu) u istom proizvodnom području u različito vrijeme (tablica 18 i 19) također se slažu sa nalazom GOURMELONA i sur. (2006.) što je moguće posljedica perzistiranja istih izvora zagađenja za vrijeme istraživanja.

Mogućnost nalaza uzoraka sa *stx* genima ili VTEC u svakom slučaju ovisi o fekalnom zagađenju sa *E. coli*, aktivnostima i vremenskim prilikama uzvodno od proizvodnog područja školjkaša (GOURMELON i sur.; 2006., LEE i MURRAY, 2010.).

Ekološke prilike u Malostonskom zaljevu, kako je opisano u Planu praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša (NN 49/07) najviše ovise o utjecajima s kopna, a manje s otvorenog mora. Zaljev je pod utjecajem rijeke Neretve (koja između ostalog teče kroz ruralna područja susjedne Bosne i Hercegovine) pogotovo za vrijeme većeg riječnog vodostaja i jačih zapadnih vjetrova. U zaljevu je slijevanje organske tvari s kopna putem oborinskih voda, a osobito vrulja, značajno. U našem radu je u ovom području utvrđeno najviše pozitivnih uzoraka, 80% VTEC i 65% EPEC od ukupno pronađenih pozitivnih uzoraka.



Drugo područje u kojem je utvrđen preostali uzorak sa VTEC je Ušće rijeke Krke, također pod utjecajem rijeke, ali je točka uzorkovanja VTEC pozitivnog uzorka unutar ovog proizvodnog područja u Planu praćenja (NN 49/07) namjerno određena kao najistočnija, najbliža točka gradu Šibeniku radi mogućnosti pojačanog onečišćenja. Tu su školjkaši dodatno pod utjecajem urbanih otpadnih voda, pogotovo za puhanja učestalog sjeveroistočnog vjetra, ali i onog jugoistočnog smjera. Stoga nije neobično da su u našem radu i najveće vrijednosti MPN *E. coli* u 100 g školjkaša (16 000 MPN *E. coli*) u kojima je i izolirana VTEC, nađene upravo u proizvodnom području Ušća rijeke Krke koje je i drugo po redu područje po visini prosječne MPN *E. coli*/100 g školjkaša. Ostale VTEC kulture sa znatno manjim vrijednostima MPN *E. coli*/100g su utvrđene u Malostonskom zaljevu, dva uzorka sa vrijednosti 2400 MPN i dva uzorka sa vrijednosti 20 i 130 MPN *E. coli*/100g školjkaša, što je u skladu s prije opisanim položajem i karakteristikama ovog područja. Kod EPEC pozitivnih uzoraka vrijednosti su raznolike i variraju od 20 - 790 (grafikon 15).

Ako se vrijednosti MPN *E. coli* uzoraka pozitivnih na VTEC usporede s vrijednostima MPN *E. coli*/100g školjkaša koje određuju granice intervala za razvrstavanje proizvodnih područja u odgovarajući mikrobiološki razred; A (<20 - ≤230); B (>230 - ≤4600) i C (≥4600 - 46000), Pravilnika o mikrobiološkom razvrstavanju i postupku u slučaju onečišćenja živih školjkaša (ANON., 2009.b), u svakom pojedinom području možemo utvrditi učestalost VTEC/EPEC uzoraka unutar razreda iz kojih se žive školjke plasiraju na tržište (tablica 24). Tako možemo razmotriti rizik pojavljivanja uzoraka s VTEC/EPEC na tržištu. Subjekti u poslovanju s hranom smiju propisano pravilnicima RH sakupljati/izlovljavati žive školjkaše namijenjene izravnoj prehrani ljudi samo iz onih područja koje nadležno tijelo razvrstavaju u razred A (ANON., 2007.e; 2007.f; 2011.c). U našem istraživanju u Malostonskom zaljevu od 7% uzoraka školjkaša iz razreda B, rizik za plasman VTEC/EPEC do krajnjeg potrošača jednak je prevalenciji od 5,4% utvrđenih VTEC i 2,7% EPEC. Kako ovi uzorci trebaju proći postupak pročišćavanja od *E. coli* u centrima za pročišćavanje, rizik za infekciju ljudi može biti smanjen, ali ne i poništen jer se i na kraju postupka pročišćavanja određena dopuštena količina *E. coli* može zadržati u školjkama.

Ipak, najveći značaj imaju uzorci školjkaša razreda A u kojima je prevalencija VTEC znatno manja, ali ovom razredu pripada 93% školjkaša u području Malostonskog zaljevu. Stoga postoji mogućnost da od uzoraka koji se direktno plasiraju na tržište bez ikakvih ograničenja, njih 0,4% sadrži VTEC a 2,2% EPEC. U Ušću rijeke Krke moguće je manji značaj VTEC uzoraka iako je VTEC utvrđena u jednom od dva uzorka školjkaša unutar

vrijednosti razreda C. To je stoga jer je u ovom razredu utvrđeno samo 2% školjkaša, a pošto u Hrvatskoj nisu određena područja ponovnog polaganja, predviđeni su samo za preradu. U ostalim razredima ovog područja VTEC nisu utvrđene, a EPEC uzorci su činili 2,1% unutar 82% uzoraka razreda A. U proizvodnom području Marinskog zaljeva i Uvali Sobra – otok Mljet svi su pretraženi uzorci iz razreda A, pa su prevalencije EPEC školjkaša koje se mogu plasirati direktno na tržište jednake prije utvrđenim prevalencijama EPEC u pretraženim uzorcima (5,9% i 5,6%). U Kaštelanskom zaljevu je od 82% školjkaša razreda A utvrđeno 0,9% EPEC, dok je od 9% školjkaša razreda B u čak 8,3% uzoraka izolirana EPEC.

Izračunate prevalencije u našem istraživanju prema razredima za razvrstavanje, a time i rizik od kontaminacije s VTEC predstavljaju prosječne okvirne vrijednosti. Naime, zbog veličine nekog proizvodnog područja u istom području ima više zona koje se u istom trenutku zasebno klasificiraju, a razvrstavanje u neki razred nije trajno, već po važećem pravilniku o mikrobiološkom razvrstavanju pojedino područje / zona može prelaziti iz razreda u razred (ANON., 2009.b). Stoga je stvarni rizik plasiranja uzoraka školjkaša s VTEC/EPEC na tržište ovisno o nalazu visine vrijednosti MPN *E. coli* u nekom području teško odrediti. Slično istraživanju GUYONA i sur. (2000.) u našem istraživanju tri su pozitivna VTEC uzorka u trenutku uzorkovanja potjecala iz zona razvrstanih u razred A, odakle su se školjkaši do dospjeća nalaza o MPN *E. coli*/100g mogli plasirati na tržište bez ograničenja, a školjkaši s utvrđenim  $\leq 230$  MPN i dalje, jer su zadovoljavali kriterije važećih propisa (grafikon 21). Za razliku od GOURMELONA i sur. (2006.) koji su utvrdili da je rizik od infekcije ljudi VTEC s pozitivnim uzorcima u njihovom istraživanju ograničen jer potječu iz razreda B odakle se školjkaši pročišćavaju od *E. coli* cijelih 48 sati, u našem istraživanju rizik ostaje velik jer većina školjkaša iz dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana potječe iz područja za direktan plasman na tržište (grafikon 17).

U našem radu iako je vidljivo da broj uzoraka VTEC/EPEC raspoređenih po razredima A do C s obzirom na visinu MPN vrijednosti između različitih područja variraju, kada proizvodna područja Dalmacije promotrimo kao cjelinu (tablica 24), prevalencija VTEC i EPEC raste s visinom mikrobiološke kontaminacije školjkaša unutar pojedinog razreda. Udio VTEC u školjkašima po MPN vrijednosti raste od razreda A (0,25%), preko razreda B (2,6%), te čak 7,1% u razredu C (udio EPEC u razredu A je 1,85% i u razredu B 2,6%), što je slično istraživanju GOURMELONA i sur. (2006.) koji su u visoko kontaminiranim uzorcima s *E. coli* utvrdili najveći udio uzoraka sa *stx* genima. Međutim kao i u našem istraživanju, isti autori su utvrdili i znatan dio VTEC u uzorcima niske kontaminacije odakle su i izolirali 2/5

VTEC (<230 MPN *E. coli*/100g). Pretpostavljamo da same prevalencije između razreda za razvrstavanje proizvodnih područja školjkaša, u našem istraživanju, ne moraju biti dobar pokazatelj razlika zagađenosti s VTEC/EPEC, jer mogu biti i posljedica velike razlike u broju uzorkovanih školjkaša između razreda (810 uzoraka u razredu A, a samo 13 u razredu C).

Jednako kao što su zaključili GOURMELON i sur. (2006.) da pojava VTEC nije u vezi s ukupnim brojem *E. coli* kao pokazateljem fekalne kontaminacije, i u našem se istraživanju opažene razlike MPN *E. coli*/100g između uzoraka s izoliranom VTEC ili EPEC i uzoraka bez VTEC ili EPEC (tablica 27) statistički ne razlikuju ( $p=0,07$  i  $p=0,39$ ). Znači, sveukupno u školjkašima dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana povećanje visine MPN *E. coli*/100g nije u korelaciji s nalazom enteropatogenih i verotoksigenih *E. coli*.

S obzirom na visinu zagađenja s *E. coli* i nezadovoljavajuće rezultate za plasman na tržište (>230 MPN *E. coli*/100g školjkaša), te odnos vrijednosti MPN *E. coli*/100g školjkaša različitih proizvodnih područja (grafikon 18), rezultati našeg istraživanja pokazuju da je najveća vrijednost od 160 000 MPN *E. coli* i srednja vrijednost od 2129 MPN *E. coli* najviša u području Kaštelanskog zaljeva, zbog udjela visokih vrijednosti uzoraka prnjavica. Slijedi Kanal sv. Ante i Ušće rijeke Krke s najvećim brojem od 16 000 MPN *E. coli* i srednjim vrijednostima od 753 i 599 MPN *E. coli*. Sljedeća tri područja su također imala uzorke s vrijednostima >230 MPN *E. coli* koje su nezadovoljavajuće za plasman na tržišti to Malostonski zaljev 3500 MPN, Novigradsko more 2400 MPN i Pašmanski kanal 500 MPN *E. coli*, ali su im srednje vrijednosti svih uzoraka u području manje od navedene granice. Ako se promotri grafikon 17 s rasporedom broja uzoraka po razredima razine mikrobne kontaminacije, može se zaključiti da je pojava uzoraka iznad 230 MPN *E. coli* u posljednja dva navedena područja bila sporadična. Učestaliji broj nezadovoljavajućih uzoraka zapažen je na lokaciji Kanal Sv. Ante u Šibeniku (21%), Ušću rijeke Krke (18,2%) i slično Kaštelanskom zaljevu (17,6%), te Malostonskom zaljevu (7,4%). Pojavnost vrijednosti još višeg fekalnog zagađenja iznad 4600 MPN *E. coli*, bila je sporadična u Kanalu Sv. Ante u Šibeniku i Ušću rijeke Krke za razliku od područja Kaštelanskog zaljeva gdje se to desilo 12 puta u periodu istraživanja.

Za razliku od rada RAMPERSAD i sur. (1999.) gdje je u proizvodima svježih školjkaša utvrđena razlika između vrsta uzoraka, ali ne i između područja, u našem istraživanju su uočene razlike u prevalenciji *E. coli* između dvanaest proizvodnih područja dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana statistički značajne ( $p<0,001$ ). Također su značajne razlike u

frekvenciji pojavljivanja nezadovoljavajućih uzoraka za ljudsku konzumaciju između tih područja,  $p < 0,001$  (tablica 25). Iako prisutnost komenzalne *E. coli* u školjkašima iz proizvodnih područja ukazuje na kontaminaciju voda i potencijalnu opasnost od sadržaja bakterija štetnih za ljude (MACRAE i sur., 2005.), u našem istraživanju u određenom proizvodnom području prevalencija uzoraka s izoliranom *E. coli* i nezadovoljavajućih uzoraka za plasman na tržište nije u korelaciji s pojavnosti VTEC i EPEC. Tako nalaz školjkaša s VTEC/EPEC nije zapažen u svim proizvodnim područjima s najvećim prevalencijama ovakvih uzoraka (Kanal Sv. Ante u Šibeniku i Kaštelanskom zaljevu, grafikon 14).

U jedinom proizvodnom području, Malostonskom zaljevu, gdje se uzgajaju i izlovljavaju sve četiri vrste školjkaša, u našem istraživanju iz srednjih vrijednosti MPN *E. coli*/100g uzoraka školjkaša prikazanih grafikonom 18 vidljivo je da su srednje vrijednosti MPN *E. coli*/ različitih vrsta školjkaša u istom području slične. Za razliku od drugih proizvodnih područja dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana, razlika između uočenih vrijednosti različitih vrsta školjkaša unutar područja nije statistički značajna ( $p=0,4439$ ), pa možemo zaključiti da je na vrijednost MPN *E. coli* u 100g školjkaša veći utjecaj proizvodnog područja nego vrste.

Kada promotrimo godišnje varijacije u nalazu VTEC/EPEC u uzorcima školjkaša u periodu našeg istraživanja, iako pojavnost EPEC pozitivnih uzoraka školjkaša u izoliranim kulturama *E. coli* godišnje varira od 1,6% do 6,4% godišnje, te razlike u pojavnosti takvih uzoraka između različitih godina nisu statistički značajne ( $p=0,2$ ). U istom periodu, u skoro tri godine istraživanja nalaz VTEC iz uzoraka školjkaša s izoliranom *E. coli* kretao se od 0% do 3,85% godišnje i te su razlike u pojavnosti VTEC između različitih godina značajne statistički ( $p=0,04$ ), (tablica 28 i grafikon 22). Jedan od mogućih razloga je izbor metode pretrage koja se primjenjivala na održanim kulturama na agaru za konzerviranje od 2007. godine pa dalje, a u 2010. godini kulture se nisu pohranjivale duži period, već su slane na PCR pretragu odmah. Ipak 40% (2/5) utvrđenih VTEC kultura su do trenutka identifikacije bile stare 12 i 20 mjeseci. S druge strane, među EPEC kulturama razlika u godišnjoj prevalenciji nije značajna, pa je mogući razlog ove varijacije ipak novi izvor VTEC kontaminacije 2010. godine. To je i u korelaciji s iznenadno znatno većom razinom onečišćenja tih uzoraka s *E. coli* nego inače na istim točkama uzorkovanja (grafikon 21).

Sezonska pojavnost EPEC u izoliranim kulturama *E. coli* je 2,7% u ljetnim mjesecima (temperatura mora  $>16$  °C) i 3,8% u zimskim mjesecima (temperatura mora  $<16$  °C) dok je pojavnost VTEC kultura 1,5% u ljetnim mjesecima istraživanja, odnosno 0,4% u zimskom

dijelu godine (grafikon 23). Vidljivo je da je godišnja pojava VTEC vezana za toplije temperature mora, dok je učestalost EPEC promjenjiva ovisno o godini. Iako se pojedinačne godišnje varijacije kreću u maksimalnom rasponu od 1,7% do 12,5%, između zimskog i ljetnog perioda, sezonski utjecaj temperatura mora na pojavu VTEC ( $p=0,17$ ) i EPEC ( $p=0,46$ ) nije statistički značajan, što se slaže s istraživanjem GOURMELONA i sur., (2006.) koji su također uočeli pozitivne rezultate u svim sezonama.

## 7. ZAKLJUČCI

Rezultati istraživanja dokaza verotoksigene bakterije *E. coli* u školjkašima pokazali su sljedeće:

1. Po prvi puta je u školjkašima istočne obale Jadrana, a prema dostupnim saznanjima u cijelom Jadranskom moru, dokazana prisutnost verotoksigene *E. coli* (VTEC). Ovim je potvrđena teza o mogućem širenju VTEC iz okoliša u more i nalazu u školjkašima proizvodnih područja školjkaša Hrvatske. Ujedno je dokazana i prisutnost enteropatogene *E. coli* (EPEC). PCR pretragom gena markera za VTEC u izoliranim kulturama *E. coli* iz pet uzoraka školjkaša utvrđena je prisutnost *stx* gena, što iznosi 1% pozitivnih uzoraka s *E. coli* i prevalenciju VTEC od 0,6% u ukupnom broju od 900 pretraženih uzoraka školjkaša. U 3,3% izoliranih sojeva *E. coli* utvrđene su EPEC što je prevalencija od 1,9% u odnosu na ukupni broj školjkaša.

2. Pokusom prijenosa VTEC u školjkaše putem prirodne filtracije onečišćenog mora, dokazano je da se VTEC O157:H7 koncentrirala u školjkašima i očuvala sposobnost stvaranja verotoksina (Stx). Izdvajanjem *E. coli* O157:H7 i detekcijom verotoksina u pokusu potvrđena je primjenjivost izabranih metoda na uzorke školjkaša

3. Verifikacijom sve tri klasične metode za izdvajanje  $\beta$ -glukuronidaza negativne VTEC O157:H7 (metode 1, 2 i 3) s odabranom varijantom iscrpljivanja bakterije na pločama agara, potvrđena je dobra osjetljivost izražena granicom detekcije od 0,2 CFU/g. Istovremenom upotrebom ovih i propisane ISO/TS 16649-3:2005 metode, za izolaciju i brojanje  $\beta$ -glukuronidaza pozitivne *E. coli* iz školjkaša, mogu se izdvojiti mogući VTEC sojevi, različitih karakteristika rasta u kojima se i nakon pohrane na duže vrijeme mogu dokazati VTEC markeri, ELISA ili PCR metodom. Metoda 3 s direktnim umnažanjem u mTSBN i izdvajanjem tehnikom iscrpljivanja na jednoj ploči O157:H7 ID agara, preporučena je metoda izdvajanja  $\beta$ -glukuronidaza negativne VTEC. Pogodnost ove metode je jednostavna primjena, pouzdanost i korištavanje obogaćene kulture *E. coli* u mTSBN za izolaciju i identifikaciju VTEC *E. coli* O157 u uzorcima školjkaša na selektivnom agaru i dokaz prisutnosti verotoksina ELISA metodom, svih VTEC.

4. ELISA testom je od 258 pretraženih školjkaša iz redovnog plana praćenja školjkaša utvrđen jedan uzorak sa Stx, i to prnjavice iz kojih su izdvojene bakterije *E. coli* kasnije u PCR postupku potvrđene kao VTEC.

3. U školjkašima su utvrđene VTEC kulture s različitim kombinacijama gena i moguće različitih stupnjeva patogenosti. U dagnjama je utvrđena prisutnost dodatnih virulentnih gena, a u jednoj je kulturi utvrđen *stx1 + eae + hlyA* genotip karakterističan za enterohemoragične EHEC - visoko patogene VTEC sojeve. Serotipizacijom VTEC kultura utvrđeni su serotipovi, O7, O55, ,O78. Od EPEC utvrđeni su serotipovi O103, O125, O126, O127, O128, a jedan soj *E. coli* (s *hlyA* genom) je O rough. Zastupljenost  $\beta$ -glukuronidaza pozitivnih *E. coli* u ovom istraživanju je 100% među VTEC i EPEC sojevima te nije utvrđen niti jedan serotip *E. coli* O157:H7.

4. VTEC su izolirane u dagnjama (0,6%) i u prnjavicama (0,9%), dok u kamenicama i kunjama nisu utvrđene. EPEC su utvrđene u dagnjama (2,5%), prnjavicama (2,0%) i kamenicama (1,3%). U kunjama nisu utvrđene ni VTEC ni EPEC.

5. Bakterija *E. coli* je utvrđena u oko 60% uzoraka školjkaša, a opažene razlike u nalazu *E. coli* između različitih vrsta školjkaša Dalmacije statistički su značajne. Najveće prosječne vrijednosti MPN *E. coli*/100g su uočene u prnjavica, slijede dagnje, kamenice i kunjke s najnižom prosječnom vrijednosti na granici detekcije od 20 MPN *E. coli*/100g. Najviša učestalost nezadovoljavajućih uzoraka za tržište (> 230 MPN *E. coli*/100g) je u prnjavica, slijede dagnje, pa kamenice, a opažene su razlike u nezadovoljavajućim nalazima između različitih vrsta školjkaša statistički značajne.

6. VTEC su pronađene samo u dva od dvanaest proizvodnih područja (Malostonski zaljev - 0,8%, Ušće rijeke Krke - 0,9%), dok su EPEC pozitivni uzorci nađeni u Marinskom zaljevu (5,9%) Uvali Sobra – otok Mljet (5,6%), Malostonskom zaljevu (2,2%), Ušću rijeke Krke (1,8%) i Kaštelanskom zaljevu (1,5%).

7. Srednja vrijednost MPN *E. coli*/100g školjkaša u proizvodnim područjima najviša je u Kaštelanskom zaljevu, slijedi Kanal sv. Ante, te Ušće rijeke Krke. Najučestaliji broj nezadovoljavajućih uzoraka zapažen je u proizvodnom području Kanala Sv. Ante u Šibeniku

slijedi Ušće rijeke Krke, Kaštelanski zaljev i Malostonski zaljev, a sporadično se nezadovoljavajući uzorci za tržište pojavljuju u školjkašima Pašmanskog kanala i Novigradskom moru. Uočene razlike u nalazu *E. coli* između dvanaest proizvodnih područja Dalmacije statistički su značajne kao i razlike u frekvenciji pojavljivanja nezadovoljavajućih nalaza. Na visinu vrijednosti MPN *E. coli*/100g školjkaša značajniji je utjecaj proizvodnog područja nego vrste.

**8.** Vrijednosti MPN *E. coli*/100g školjkaša dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana bez obzira na vrstu i proizvodno područje, nije u korelaciji s nalazom enteropatogenih i verotoksigenih *E. coli*. VTEC i EPEC su utvrđene i u uzorcima s najmanjom brojivom količinom *E. coli*. Tri uzorka koja su sadržavala VTEC potjecala su iz zona razvrstanih u razred A odakle su školjkaši plasirani na tržište bez ograničenja u trenutku uzorkovanja. U razred A je razvrstana većina proizvodnih područja dalmatinskog dijela istočne obale Jadrana (90%) pa rizik od plasmana školjkaša koji moguće sadrže VTEC i EPEC namijenjenih izravnoj prehrani ljudi ostaje velik.

**9.** Iako se sezonske varijacije unutar pojedinih godina između zimskih i ljetnih temperatura mora kreću u rasponu od 1,7% do 12,5%, sezonski utjecaj toplijeg i hladnijeg dijela godine na pojavu VTEC i EPEC nije statistički značajan. U periodu od 9. mjeseca 2007. do 6. mjeseca 2010. godine za razliku od pojavnosti EPEC u pojedinim godinama istog perioda, pojava VTEC od 0% 2007. godine do 3,9% 2010. godine je statistički značajna. Kako se radi o tri uzorka od kojeg su dva u istom području postoji mogućnost da se radi o perzistirajućem izvoru VTEC.



## 8. POPIS LITERATURE

ACHESON, D. W., R. MOORE, S. DE-BREUCKER, L. LINCICOME, M. JACEWICZ, E. SKUTELSKY, G. T. KEUSCH (1996): Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture. *Infect. Immun.* 64, 3294–3300.

AIDAR-UGRINOVICH, L., J. BLANCO, M. BLANCO, J. E. BLANCO, L. LEOMIL, G. DAHBI, A. MORA, D. L. ONUMA, W. D. SILVEIRA, A. F. PESTANA DE CASTRO (2007): Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 297-306.

ANONIMNO (1993): Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers-Western United States, 1992-1993, CDC, *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 42 (14) 258-263.

ANONIMNO (1995a): Report on Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*, HMSO, London, United Kingdom, Advisory Committee On The Microbiological Safety Of Food - ACMSF, 1-148.

ANONIMNO (1995b): Outbreak of acute gastroenteritis attributable to *Escherichia coli* serotype O104:H21-Helena, Montana 1994, CDC, *Morb. Mortal. Weekly Rep.* 44 (27) 501–503.

ANONIMNO (1996): Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice, CDC, *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 45 (44) 975

ANONIMNO (1998): *Bacteriological Analytical Manual*, 8th Edition, Revision A Chapter 4, 4.20-4.26

ANONIMNO (1999a): ISO 6887-3:1999, *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products*. ISO, Geneva, Switzerland

ANONIMNO (1999b): UK Publicly-funded research relating to verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), Report to the Microbiological Safety of Food Funders Group (MSFFG 2004 VTEC report) Updated March, 2000

ANONIMNO (1999c): *Escherichia coli* O157. Detection in food and feeding stuffs, no 164. Nordic committee on food analysis, NMLK

ANONIMNO (1999d): Zoonotic non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO scientific working group meeting, Berlin, Germany, 23-26 June 1998. <http://www.who.int/emc-documents/zoonoses/whocsraph988c.html>

ANONIMNO (2001): ISO 16654:2001, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection of *Escherichia coli* O157. ISO, Geneva, Switzerland

ANONIMNO (2003a): ISO 6887-1:2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. ISO, Geneva, Switzerland

ANONIMNO (2003b) Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). AFFSA, France, 1-177

ANONIMNO (2004a): UK Publicly Funded Research Relating to Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) Update, September 2004, Report to the Microbiological Safety of Food Funders Group (MSFFG)

ANONIMNO (2004b): Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5th Verocytotoxigenic *Escherichia coli*, Chapter 2.10.13, OIE

ANONIMNO (2005a): Review of food standards agency B11 verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) research programme, Project summary B09007, Development and validate methods to detect and characterise verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in foods. , Food Standards Agency - FSA, 43-47.

ANONIMNO (2005b): ISO/TS 16649-3:2005, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide. ISO, Geneva, Switzerland

ANONIMNO (2007a): Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from EFSA on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. *EFSA journal*, 579, 1-61

ANONIMNO (2007b): Enter-net annual report 2005 – surveillance of enteric pathogens in Europe and beyond. Enter-net surveillance hub, HPA, Centre for Infections, Colindale, London.

ANONIMNO (2007c): ISO 7218:2007, Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations. ISO, Geneva, Switzerland

ANONIMNO (2007d): Pravilnik o higijeni hrane (NN 99/2007, NN 27/2008).

ANONIMNO (2007e): Pravilnik o higijeni hrane životinjskog podrijetla (NN 99/2007).

ANONIMNO (2007f): Pravilnik o službenim kontrolama hrane životinjskog podrijetla (NN 99/2007).

ANONIMNO (2008a): National Standard Methods - Food, Detection of *Escherichia coli* O157 by automated immunomagnetic bead separation – F17, HPA, UK

ANONIMNO (2008b). Preliminary FoodNet data on the incidence of Infection with pathogens transmitted commonly through food- 10 states, 2007. CDC, Morb Mortal Wkly Rep., 57 (14) 366-370.

ANONIMNO (2008c): Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/08).

ANONIMNO (2009a): Outbreak surveillance data, CDC, [http://www.cdc.gov/foodborne\\_outbreaks/outbreak\\_data.htm](http://www.cdc.gov/foodborne_outbreaks/outbreak_data.htm).

ANONIMNO (2009b): Pravilnik o mikrobiološkom razvrstavanju i postupku u slučaju onečišćenja živih školjkaša (NN 118/09).

ANONIMNO (2010a): Multistate Outbreak of Human *E. coli* O145 Infections Linked to Shredded Romaine Lettuce from a Single Processing Facility, CDC, [http://www.cdc.gov/ecoli/2010/ecoli\\_o145/index.html](http://www.cdc.gov/ecoli/2010/ecoli_o145/index.html)

ANONIMNO (2010b): Reports of Selected *E. coli* outbreak investigations, CDC, <http://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>

ANONIMNO (2010c): *Escherichia coli* O157:H7, General Information, Frequently Asked Questions, CDC, [http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/ecoli\\_o157h7.html](http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/ecoli_o157h7.html)

ANONIMNO (2010d): Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2010, ECDC, Stockholm, 1-181.

ANONIMNO (2010e): The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008, EFSA *journal*, 8 (1):1496. 1-368.

ANONIMNO (2010f): UK Publicly Funded Research Relating to Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). Update May 2010 Report to the Microbiological Safety of Food Funders Group (MSFFG)

ANONIMNO (2010g): Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - 10 States, 2009, CDC, Morbid. Mortal. Weekly Rep.,59 (14), 418-422

ANONIMNO (2011a): The european union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009; EFSA Journal 2011; 9(3): 2090, 378 pp.

ANONIMNO (2011b): Report: Final presentation and evaluation of epidemiological findings in the EHEC O104:H4 outbreak, Robert Koch Institute. Berlin, Germany, 1-43

ANONIMNO (2011c): Pravilnik o izmjenama pravilnika o higijeni hrane životinjskog podrijetla, NN 45/11

APPELTANS, W., P BOUCHET, G.A.BOXSHALL, K.FAUCHALD, D.P. GORDON, B.W.HOEKSEMA, G.C.B. POORE, R.W.M. VAN SOEST, S STÖHR., T.C WALTER., M.J. COSTELLO (2011): World Register of Marine Species (WoRMS). Dostupno na: <http://www.marinespecies.org> on 2011-06-19

ARBAULT, P., V. BUECHER, S. POUMEROL, M. L. SORIN (2000): Study of an ELISA method for the detection of *E. coli* O157 in food. Prog. Biotechnol. 17, 359-368.

ARTHUR T. M., G. A. BARKOCY-GALLAGHER, M. RIVERA-BETANCOURT, M. KOOHMARAIE (2002): Prevalence and Characterization of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* on Carcasses in Commercial Beef Cattle Processing Plants. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4847–4852.

ASPAN, A., E. ERIKSSON (2010): Verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 from Swedish cattle; isolates from prevalence studies versus strains linked to human infections--a retrospective study. Vet. Res. 29, 6-7.

ATALLA, H. N., R. JOHNSON, S. MCEWEN, R. W. USBORNE, C. L. GYLES (2000): Use of a Shiga toxin (Stx)-enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot for detection and isolation of Stx-producing *Escherichia coli* from naturally contaminated beef. J. Food. Prot. 63, 1167–1172.

BAKER, D. R., R. A. MOXLEY, D. H. FRANCIS (1997): Variation in virulence in the gnotobiotic pig model of O157:H7 *Escherichia coli* strains of bovine and human origin. Adv Exp Med Biol. 412, 53–58. U: PATON, J. C., A. W. PATON (1998.b): Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin. Microbiol. Rev. 11, 450-479.

BARKOCY-GALLAGHER, G.A, T. M. ARTHUR, M. RIVERA-BETANCOURT, X. NOU, S. D. SHACKELFORD, T. L WHEELER, M. KOOHMARAIE (2003): Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157:H7 and non-O157 serotypes, and Salmonella in commercial beef processing plants. J. Food. Prot. 66, 1978–1986.

BAUER, M. E. , R. A. WELCH (1996): Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect. Immun. 64,167–175.

BAYLIS, C. L., A. J. ROBINSON, R. P. BETTS (2003): Growth and detection times of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in a range of enrichment media. Poster presentation (P186), VTEC 2003, 5th International symposium on Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections, Edinburgh International Conference Centre, Scotland, In: BAYLIS C., H.SMITH, E.BOLTON, S. O'BRIEN (2008): Project No. B11010, Review of past and current research on verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in relation to public health protection, FSA Report No: MB/REP/106304

BAYLIS, C. L. (2004). Heterogeneity of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and methods for their detection in food. PhD Thesis. School of Biosciences. Birmingham, University of Birmingham, In: BAYLIS C., H.SMITH, E.BOLTON, S. O'BRIEN (2008): Project No. B11010, Review of past and current research on verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in relation to public health protection, FSA Report No: MB/REP/106304

BAYLIS C., H.SMITH, E.BOLTON, S. O'BRIEN (2008): Project No. B11010, review of past and current research on verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in relation to public health protection, Section 3: VTEC Methodology, FSA - Report No: MB/REP/106304

- BENNANI M., S. BADRI, T. BAIBAI, N. OUBRIM, M. HASSAR, N. COHEN, H. AMAROUCH (2011): First detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in shellfish and coastal environments of Morocco. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165(1), 290-299.
- BERGEY'S (2005) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd Ed., Vol. 2: The *Proteobacteria*, Part B, The *Gammaproteobacteria*. Urednici: D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. R. Staley, G.M. Garrity, Springer, New York, 607-625
- BESSER, R. E., S. M. LETT, J. T. WEBER (1993): An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA.* 269, 2217 – 2220.
- BEUTIN, L., M. A. MONTENEGRO, I. ORSKOV, F. ORSKOV, J. PRADA, S. ZIMMERMANN, R. STEPHAN (1989): Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2559–2564.
- BEUTIN, L. (1999): *E. coli* O157 and other types of verocytotoxigenic *E. coli* isolated from humans, animals and food in Germany. In: *Escherichia coli* O157 in Farm Animals. (Stewart, C. S., H. J. Flint, Eds.), CABI Publishing, Wallingford, UK, pp 121-146.
- BEUTIN, L, G. KRAUSE, S. ZIMMERMANN, S. KAULFUSS, K. GLEIER (2004): Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1099-1108.
- BEUTIN, L., H. STEINRÜCK, G. KRAUSE, K. STEEGE, S. HABY, G. HULTSCH, B. APPEL (2007): Comparative evaluation of the Ridascreen® Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. *J. Appl. Microbiol.* 102, 630–639.
- BETTELHEIM, K. (1998): Reliability of CHROMagar O157 for the detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 but not EHEC belonging to other serogroups. *J. Appl. Microbiol.* 85, 425–428.
- BETTELHEIM, K., L. BEUTIN (2003): Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). *J. Appl. Microbiol.* 95, 205–217.

BETTELHEIM, K. (2005): Reliability of O157:H7 ID agar (O157 H7 ID-F) for the detection and isolation of verocytotoxigenic strains of *Escherichia coli* belonging to serogroup O157. J. Appl. Microbiol. 99, 408-410.

BIELASZEWSKA, M., J. JANDA, K. BLAHOVA, H. KARCH, M. A. KARMALI, M. A. PRESTON, R. KHAKHRIA, O. NYC (1997): Isolation of sorbitol-fermenting (SF) verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H2 in the Czech Republic. Abstract, V9/I. 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections, Baltimore, USA. Lois Joy Galler Foundation for Hemolytic Uremic Syndrome Inc., Melville, New York

BIELASZEWSKA M., R. PRAGER, R. KOCK, A. MELLMANN, W. ZHANG, H. TSCHAPE, P.I. TARR, H. KARCH (2007): Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. Appl. Environ. Microbiol.,73, 3144 - 3150

BIELASZEWSKA, M., F. STOEWEL, A. FRUTH, W. ZHANG, R. PRAGER, J. BROCKMEYER, A. MELLMAN, H. KARCH, A. W. FRIEDRICH (2009): Shiga toxin, cytolethal distending toxin, and hemolysin repertoires in clinical *Escherichia coli* O91 isolates. J. Clin. Microbiol. 47, 2061–2066.

BLACKBURN, C. W., J. D. MCCARTHY (2000): Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157:H7 in foods. Int. J. Food Microbiol. 55, 285-290.

BLANCO J. E., M. BLANCO, M. P. ALONSO, A. MORA, G. DAHBI, M. A. COIRA, J. BLANCO (2004): Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. J. Clin. Microbiol. 42, 311-319.

BOCZEK, L. A., JOHNSON, C. H., RICE, E. W. AND KINKLE, B. K. (2006), The widespread occurrence of the enterohemolysin gene *ehlyA* among environmental strains of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 254, 281–284.

BOHAYCHUK, V. M., G. E. GENSLER, R. K. KING, J. T. WU, L. M. MCMULLEN (2005): Evaluation of detection methods for screening meat and poultry products for the presence of foodborne pathogens. J. Food Prot. 68, 2637-2647.

BOLTON, E. J., L. CROZIER, J. K. WILLIAMSON (1995): New technical approaches to *Escherichia coli* O157. Optimisation of methods for the isolation of *Escherichia coli* O157 from beef burgers. PHLs Microbiol. Dig. 12, 67–71.

BOLTON, F. J. (1999): Detection of EHEC in foods and water: bacteriological and immunological techniques. Acta Clin Belg. 54-1,35.

BOLTON, D. J., G. DUFFY, C. J. O'NEILL, C. L. BAYLIS, R. TOZZOLI, S. MORABITO, Y. WASTESON, S. LOFDAHL (2009): Epidemiology and Transmission of Pathogenic *Escherichia coli*. CO-ORDINATION ACTION FOOD-CT-2006-036256, Pathogenic *Escherichia coli* Network , 1-22.

BONNET, R., B. SOUWEINE, G. GAUTHIER, C. RICH, V. LIVRELLI, J. SIROT, B. JOLY, C. FORESTIER (1998): Non-O157:H7 Stx2-Producing *Escherichia coli* Strains Associated with Sporadic Cases of Hemolytic-Uremic Syndrome in Adults. J. Clin. Microbiol. 36, 1777–1780.

BOUKEF, I., M. EL BOUR, N. AL GALLAS, O. EL BAHRI, S. MEJRI, R. MRAOUNA, R. BEN AISSA, A. BOUDABOUS, P. GOT, M.TROUSSELLIER (2010): Survival of *Escherichia coli* strains in Mediterranean brackish water in the Bizerte lagoon in northern Tunisia. Water. Environ. Res. 82(11),2249-57.

BOYD, B. i C. A. LINGWOOD (1989): Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. Nephron. 51, 207–210., U: PATON, J. C., A. W. PATON (1998.b): Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin. Microbiol. Rev. 11, 450-479.

BROOKS, J. T., E. G. SOWERS, J. G. WELLS, K. D. GREENE, P. M. GRIFFIN, R. M. HOEKSTRA, N. A. STROCKBINE (2005): Non-O157 Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Infections in the United States, 1983–2002. J. Infect. Dis. 192, 1422-1429.

BUGAREL, M., P. FACH, L. BEUTIN, A. Martin (2011): Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: A basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. BMC Microbiol.11, 142. doi:10.1186/1471-2180-11-142



BUECHER, V., M. L. SORIN., B. CRISTAU, P. ARBAULT (2003): Validation of a new ELISA – Based method for detection of VTEC in food, IAPH 90th Annual Meeting 2003, New Orleans, Louisiana, USA Transia Plate Verotoxins NOT COM 1021A 12/03 [http://www.iul-instruments.de/pdf/verotoxin\\_transia.pdf](http://www.iul-instruments.de/pdf/verotoxin_transia.pdf)

BÜRK, C., I. G. B. BRAUMILLER, H. BECKER, E. MÄRTLBAUER (2002): Nuclease fluorescence assay for the detection of verotoxin genes in raw milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 35,153–156.

CAPPS, K. L., E. M. MCLAUGHLIN, A. W. MURRAY, C. F. ALDUS, G. M. WYATT, M. V. PECK, A. VAN AMERONGEN, R. M. ARIENS, J. H. WICHERS., C. L. BAYLIS, D. R. WAREING, F. J. BOLTON (2004): Validation of three rapid screening methods for detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* in foods: interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 87, 68-77.

CAPRIOLI, A, S. MORABITO, H. BRUGERE, E. OSWALD (2005), Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* 36, 289-311.

CATARAME, T. M. G., K. A. O'HANLON, G. DUFFY, J. J. SHERIDAN, I. S. BLAIR, D. A. MCDOWELL (2003): Optimization of enrichment and plating procedures for the recovery of *Escherichia coli* O111 and O26 from minced beef. *J. Appl. Microbiol.* 95, 949–957.

COOMBES, B. K., M. E. WICKHAM, M. MASCARENHAS, S. GRUENHEID, B. B. FINLAY, M. A. KARMALI (2008): Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2153-2160.

CHAPMAN, P. A, C. A. SIDDON, P. M. ZADIK , L. JEWES (1991): An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O 157. *J. Med. Microbiol.* 35, 107-110.

CHAPMAN, P. A., M. ELLIN, R. ASHTON, W. SHAFIQUE (2001): Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 68, 11-20.

CHROMID O157:H7 AGAR (O157 H7 ID-F) 09784 F-en-2007/09, dostupno na: <http://www.biomerieux-usa.com/upload/chromID-E-Coli-Testing-Technical-Shee-3.pdf>

COMO-SEBETTI, K., K. S. REAGAN, S. ALAIRE, K. PARROTT, C. M. SIMONDS, S. HRABOWY, B. RITTER, W. HALL, J. ALTAMIRANO, R. MARTIN, F. DOWNES, G. JENNINGS, R. BARRIE, M. F. DORMAN, N. KEON, M. KUCAB, A. AL SHAB, B. ROBINSON-DUNN, S. DIETRICH, L. MOSHUR, L. REESE, J. SMITH, K. WILCOX, J. TILDEN, G. WOJTALA, J. D. PARK, M. WINNETT, L. PETRILACK, L. VASQUEZ, S. JENKINS, E. BARRETT, M. LINN, D. WOOLARD, R. HACKLER, H. MARTIN, D. MCWILLIAMS, B. ROUSE, S. WILLIS, J. RULLAN, G. MILLER, JR., S. HENDERSON, J. PEARSON, J. BEERS, R. DAVIS, D. SAUNDERS (1997): Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating alfalfa sprouts- Michigan and Virginia, June-July 1997. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 46, 741-744.

CUI, S., C. M. SCHROEDER, D. Y. ZHANG, J. MENG (2003): Rapid sample preparation method for PCR-based detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *J. Appl. Microbiol.* 95, 129–134.

DE BOER, E., A. E. HEUVELINK (2000): Methods for the detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* 29,133-143.

DEISINGH, A. M. THOMPSON (2004): Strategies for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *J. Appl. Microbiol.* 96, 419–429.

DHANASHREE B., P.S. MALLYA (2008): Detection of shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in diarrhoeagenic stool & meat samples in Mangalore, India. *Indian J. Med. Res.* 128, 271-277.

DELIĆ, V. (1997): Genetičko inženjerstvo u biotehnologiji (Osnove manipulacije genima). Interna skripta. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

DONNENBERG, M. S., J. B. KAPER, B. B. FINLAY (1997): Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol.* 5, 109-114.

DONNENBERG, M. S. (2002). *Escherichia coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen.* Academic Press, San Diego, pp xxi-xxv, I.

DONOVAN, T. J., S. GALLACHER, N. J. ANDREWS, M. H. GREENWOOD, J. GRAHAM, J. E. RUSSELL, D. ROBERTS, R. LEE (1998): Modification of the standard method used in the United Kingdom for counting *Escherichia coli* in live bivalve mollusks. *Communicable disease and public health*, 1(3),188-196.

DOYLE, M. P., J. L. SCHOENI (1984): Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 855– 856.

DOYLE, M. P., J. L. SCHOENI (1987): Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2394–2396.

DRYSDALE, M., M. MACRAE, N. STRACHAN, T. REID, I. OGDEN, (2004): The detection of non-O157 *E. coli* in food by immunomagnetic separation. *J. Appl. Microbiol.* 97, 220–224.

DUPRAY, I., M. P. CAPRAIS, A. DERRIEN, P. MONFORT, A. CONVENANT, J. PENOT, P. D. FACH, F. S. PERELLE, J. GROUT, M. FEDERIGHI, F. JUGIAU, F. RAMA (1999): Flux bactériens et qualité sanitaire des coquillages en baie de Fresnaye. In: *Pollutions diffuses: du bassin versant au littoral*. IFREMER (ed.) Ploufragan, Saint Briec - France, pp. 169-178. U: ANON. (2003.b) Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). AFFSA, France, 1-177

DYTOC, M. T., A. ISMAILI, D. J. PHILPOTT, R. SONI, L. BRUNTON, J. P. M. SHERMAN (1994): Distinct binding properties of eaeA-negative verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of serotype O113:H21. *Infect. Immun.* 62, 3494–3505.

EBLEN R. D. (2008): Public health importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (non-O157 STEC) in the US food supply. FSIS / USDA. Dostupno na: [http://www.fsis.usda.gov/PDF/STEC\\_101207.pdf](http://www.fsis.usda.gov/PDF/STEC_101207.pdf)

EDEL, W., E. H. KAMPELMACHER (1973): Comparative studies on the isolation of "sublethally injured" salmonellae in nine European laboratories. *Bull. World Health Organ.* 48, 167-174.

EIJKMAN, C. (1904): Die garungsprobe bei 46 als hilfsmittel bei der trinkwasseruntersuchung. *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. I. Orig.* 37:742., In: FENG P., S. D. WEAGANT, (2002): *Diarrheagenic Escherichia coli*, ch. 4a, Revised: 2002-September, U: *Bacteriological Analytical Manual* (online), U.S. Food Drug Administration - FDA/BAM, dostupno na <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4a.html>. Pristupano: 8.7.2006.

EKLUND, M., F. SCHEUTZ, A. SIITONEN (2001): Clinical isolates of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2829–2834.

EKLUND, M., LEINO, K. A. SIITONEN (2002): Clinical *Escherichia coli* strains carrying stx genes: stx variants and stx-positive virulence profiles. J. Clin. Microbiol. 40, 4585-4593.

ERICKSON, M. C., M. P. DOYLE (2007): Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Food Prot. 70, 2426-2449.

ESPIE, E., V. VAILLANT, P. MARIANI-KURKDJIAN, F. GRIMONT, R. MARTIN-SCHALLER, H. DE VALK, C. VERNOZY-ROZAND (2006): *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. Epidemiol. Infect. 134, 143–146.

ETHELBERG, S., K. E. OLSEN, F. SCHEUTZ, C. JENSEN, P. SCHIELLERUP, J. ENBERG, A. M. PETERSEN, B. OLESEN, P. GERNER-SMIDT, K. MOLBAK (2004): Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark. Emerg. Infect. Dis. 10, 842-847.

EWING, W.H. (1986): The genus *Escherichia*. In: Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. (Edwards, P. R., W. H. Ewing, Eds.). Elsevier Science Publishing, New York. pp.93–134.

FEGAN, N., P. DESMARCHELIER (2002): Comparison between human and animal isolates of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 from Australia. Epidemiol. Infect., 128, pp 357-362.

FENG, P., P. A. HARTMAN (1982): Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 43, 1320-1329.

FENG, P., K. A. LAMPEL (1994): Genetic Analysis of *uidA* Expression in Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* Serotype O157:H7. Microbiology 140, 2101-2107.

FENG, P., S. R. MONDAY (2000): Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. Mol. Cell. Probes. 14, 333-337.

FENG, P. (2001): Development and impact of rapid methods for detection of foodborne Pathogens. In: Food microbiology. Fundamentals and Frontiers, 2nd Ed. (Doyle, M.P., L. R. Beuchat, T. J. Monzville, Eds.). ASM Press, Washington, D.C., 775-797.

FENG, P, M. DEY, A. ABE, T. TAKEDA (2001): Isogenic strain of *Escherichia coli* O157:H7 that has lost both Shiga toxin 1 and 2 genes. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8, 711-717.

FENG, P., S. D. WEAGANT (2002): Diarrheagenic *Escherichia coli*, ch. 4a, Revised: 2002-September, U: Bacteriological Analytical Manual (online), U.S. Food Drug Administration - FDA/BAM, dostupno na <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4a.html>. Pristupano: 8.7.2006.

FENG P., S. D. WEAGANT (2009): Diarrheagenic *Escherichia coli*, ch. 4a, Revised July 2009, U: Bacteriological Analytical Manual (online), U.S. Food Drug Administration - FDA/BAM, dostupno na: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4a.html>.

FENLON D.R., I. D OGDEN., A. VINTEN, I. SVOBODA (2000): The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land, Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. 29, 149–156.

FRAMPTON, E. W., L. RESTAINO (1993): Methods for *Escherichia coli* identification in food, water and clinical samples based on betaglucuronidase detection. J. Appl. Bacteriol. 74, 223-233.

FRIESEMA, I., G. SIGMUNSDOTTIR, K. VAN DER ZWALUW, A. HEUVELINK, B. SCHIMMER, C. DE JAGER, B. RUMP, H. BRIEM, H. HARDARDOTTIR, A. ATLADOTTIR, E. GUDMUNSDOTTIR, W. VAN PELT (2008): An international outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection due to lettuce, September – October 2007. Euro Surveill. 13(50) 1-6.

FRASER, M. E., M. FUJINAGA, M. M. CHERNEY, A. R. MELTON-CELSA, E. M. TWIDDY, A. D. O'BRIEN, M. N. JAMES (2004) Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. J. Biol. Chem. 279: 27511-27517.

FRATAMICO, P. M., R. L. BUCHANAN, P. H. COOKE (1993): Virulence of an *Escherichia coli* O157:H7 sorbitol-positive mutant. Applied and Environmental Microbiology 59: 4245-4245.

FRIEDRICH, A. W., M. BIELASZEWSKA, W. ZHANG, M. PULZ, T. KUCZIUS, A. AMMON, H.KARCH (2002): *Escherichia coli* harboring shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. Jour. Infect. Dis. 185: 74-84.

GARCIA-ALJARO, C., M. MUNIESA, J. E. BLANCO, M. BLANCO, J. BLANCO, J. JOFRE, A. R. BLANCH (2005): Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments, FEMS Microbiol. Lett. 246, 55–65.

GENERIC ASSAY (2008): Verotoxin Antigen, ref. 6006, instruction manual.

GILL, A., C. O. GILL (2010): Non-O157 verotoxigenic *Escherichia coli* and beef: A Canadian perspective. *Can. J. Vet. Res.* 74, 161–169.

GOURMELON, M., M. P. MONTET, S. LOZACH, C. LE MENNEC, M. POMMEPUY, L. BEUTIN, C. VERNOZY-ROZAND (2006): First isolation of Shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas in France. *J. Appl. Microbiol.* 100, 85–97.

GUN, H., A. YILMAZ, S. TURKER, A. TANLASI, H. YILMAZ (2001): Preliminary studies on the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from abattoir samples in Turkey. *Arch. Lebensmittelhyg.* 52, 31-33.

GUYON, R., F. DOREY, J. F. COLLOBERT, J. FORET, C. GOUBERT, V. MARIAU, J. P. MALAS: (2000): Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in shellfish (*Crassostrea gigas*). *Sci. Aliments.* 20, 457-465.

GRIFFIN, P. M., R. V. TAUXE (1991): The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 13, 60-98.

GUNZER, F., H. BOHM, H. RUSSMANN, M. BITZAN, S. ALEKSIC, H. KARCH (1992): Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1807–1810.

GYLES C. L. (2007): Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J. Anim. Sci.* 85, 45-62.

HARA-KUDO, Y., Y. ONOUE, H. KONUMA, H. NAKAGAWA, S. KUMAGAI (1999): Comparison of enrichment procedures for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef and radish sprouts. *Int. J. Food Microbiol.* 50 (3), 211-214.

HARA-KUDO, Y., H. KONUMA, H. NAKAGAWA, S. KUMAGAI (2000): *Escherichia coli* O26 detection from foods using an enrichment procedure and an immunomagnetic separation method. *Lett. appl. microbiol.* 30, 151–154.

HART, J., G. SMITH (2009): Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 outbreak in Wrexham, North Wales, *Euro Surveill.* 14 (32). Dostupno na: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19300>

HARTMAN, P. A. (1989): The MUG (glucuronidase) test for *Escherichia coli* in food and water. In: Rapid methods and automation in microbiology and immunology. (Balows, A., R. C. Tilton, A. Turano, Eds.). Brixia Academic Press, Brixia, Italy, pp 290-308.

HAYES, P. S., K. BLOM, P. FENG, J. LEWIS, N. A. STROCKBINE, B. SWAMINATHAN (1995): Isolation and characterization of a  $\beta$ -D-glucuronidase-producing strain of *Escherichia coli* O157:H7 in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 33, 3347-3348.

HEDICAN, E. B., C. MEDUS, J. M. BESSER, B. A. JUNI, B. KOZIOL, C. TAYLOR, K. E. SMITH (2009): Characteristics of O157 versus non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Minnesota, 2000-2006. *Clin. Infect. Dis.* 49, 358-364.

HEPBURN, N., M. MACRAE, M. JOHNSTON, J. MOONEY, I. OGDEN (2002): Optimizing enrichment conditions for the isolation of *Escherichia coli* O157 in soils by immunomagnetic separation. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 365-369.

HICKS, S., G. FRANKEL, J. B. KAPER, G. DOUGAN, A. D. PHILLIPS. (1998): Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. *Infect. Immun.* 66, 1570-1578.

HURLEY, B. P., C. M. THORPE, D. W. ACHESON. (2001): Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infect. Immun.* 69, 6148-6155.

HUSSEIN, H. S., L. M. BOLLINGER (2005): Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. *J. Food Prot.* 68, 2224-2241.

HUSSEIN, H. S. (2007): Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef and their products. *J. Anim. Sci.* 85, 63-72.

HUSSEIN, H. S., L. M. BOLLINGER, M. R. HALL, (2008): Growth and Enrichment Medium for Detection and Isolation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Cattle Feces. *J. Food Prot.* 71, 927-933.

HUSSEIN, S. H., L. M. BOLLINGER (2008): Influence of Selective Media on Successful Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Food, Fecal, and Environmental Samples. *Foodborne Pathog. Dis.* 5, 227-244.

- IMAMOVIC, L., E. BALLESTÉ, J. JOFRE, M. MUNIESA (2010): Quantification of Shiga toxin-converting bacteriophages in wastewater and in fecal samples by real-time quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 5693-5701.
- JINNEMAN, K. C., K. J. YOSHITOMI, S. D. WEAGANT (2003): Multiplex Real-Time PCR Method to Identify Shiga Toxins, stx1 and stx2 and *E. coli* O157:H7 Serogroup. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6327-6333.
- JOHNSON K. E., C. M. THORPE, C. L. SEARS (2006): The emerging clinical importance of non-O157 shiga toxin -producing *Escherichia coli*. *Clini.Infect. Dis.*, 43, 1587-1595.
- JORDAN, K. N, M. M.MAHER (2006): Sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 by conventional plating techniques. *J. Food Prot.* 69, 689-692.
- KAPER, J. B., S. ELLIOTT, V. SPERANDIO, N. T. PERNA, G. F. MAYHEW, F. R. BLATTNER (1998): Attaching and effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement. In: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. (Kaper, J. B., A. D. O'Brien, Eds.). American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp 163-182.
- KARCH, H., T. MEYER, H. RUSSMANN, J. HEESEMAN (1992): Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infect. Immun.*, 60, 3464 - 3467.
- KARMALI, M. A., B. T. STEELE, M. PETRIC, C. LIM (1983): Sporadic cases of hemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Lancet*, 19, 619-620.
- KARMALI, M. A. (1989): Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 15–38.
- KARMALI, M. A., M. MASCARENHAS, S. SHEN, K. ZIEBELL, S. JOHNSON, R. REID-SMITH, J. ISAAC-RENTON, C. CLARK, K. RAHN, J. B. KAPER (2003): Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4930–4940.



KHAN, A., S. YAMASAKI, T. SATO, T. RAMAMURTHY, A. PAL, S. DATTA, N. R. CHOWDHURY, S. C. DAS, A. SIKDAR, T. TSUKAMOTO, S. K. BHATTACHARYA, Y. TAKEDA, G. B. NAIR (2002): Prevalence and genetic profiling of virulence determinants of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, beef, and humans, Calcutta, India. *Emerging Infectious Diseases* 8: 54-62.

KLEANTHOUS, H., H. R. SMITH, S. M. SCOTLAND, R. J. GROSS, B. ROWE, C. M. TAYLOR, D. V. MILFORD (1990): Haemolytic uraemic syndromes in the British Isles, 1985–8: association with Verocytotoxin producing *Escherichia coli*. 2. Microbiological aspects. *Arch. Dis. Child.* 65,722–727.

KOHAN, D., P. STRICKLETT, D. SCHMID, A. HUGHES (1997): Possible cytokine-mediated autocrine and paracrine regulation of SLT-I cytotoxicity in human glomerular and tubular cells, abstr. V56/V, p. 81. In: 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections. Lois Joy Galler Foundation for Hemolytic Uremic Syndrome Inc., Melville, N.Y., U: PATON, J. C., A. W. PATON (1998.): Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 450-479.

KONOWALCHUK, J., J. I. SPEIRS, S. STAVRIC (1977): Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18, 775 – 779.

KRAIGHER, A., K. SEME, A. KRT-LAH, I. S. FISHER (2005): Fatal case of HUS after VTEC *E. coli* O145 infection in Slovenia highlights importance of testing for this rare strain. *Euro Surveill.* 10 (37). dostupno na <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2792>

KUDVA, I. T., K. BLANCH, C. J. HOVDE (1998): Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 Survival in Ovine or Bovine Manure and Manure Slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3166–3174.

KUMAR H. S, S. K. OTTA, I. KARUNASAGAR (2001): Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. *Lett. appl. microbiol.* 33, 334-338.

KUMAR H. S. INDRANI KARUNASAGAR I. KARUNASAGAR T. TEIZOU ,K. SHIMA, S. YAMASAKI (2004): Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from seafood and beef. *FEMS Microbiol. Lett.* 233, 173–178.

KHANDAGHI, J.V. RAZAVILAR, A. BARZGARI (2010): Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from manure fertilized farms and raw vegetables grown on it, in Tabriz city in Iran. Afr. J. Microbiol. Res. 4, 891-895.

LATHROP, S., K. EDGE, J. BARETA (2009): Shiga Toxin–producing *Escherichia coli*, New Mexico, USA, 2004–2007. Emerg. Infect. Dis. 15, 1289–1291.

LAW, D., A. A. HAMOUR, D. W. ACHESON, H. PANIGRAHI, L. A. GANGULI, D. W. DENNING (1994): Diagnosis of infections with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* by use of enzyme-linked immunosorbent assays for Shiga-like toxins on cultured stool samples. J. Med. Microbiol. 40, 241–245.

LAW, D. (2000): Review Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. J. Appl. Microbiol. 88, 729-745.

LEE, G. Y., H. I. JANG, I. G. HWANG, M. S. RHEE (2009): Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. Int. J. Food Microbiol. 134, 196-200.

LEE, R., L. MURRAY (2010): Components of microbiological monitoring programmes, ch. 6. In: Safe Management of Shellfish and Harvest Waters. (Rees G., K. Pond, D. Kay, J. Bartram, J. Santo Domingo, Eds.). WHO, IWA Publishing, London, UK. pp 91-108

LÉVESQUE, B., C. BARTHE, B. R. DIXON, L. J. PARRINGTON, D. MARTIN, B. DOIDGE, J.F. PROULX, D.MURPHY (2010): Microbiological quality of blue mussels (*Mytilus edulis*) in Nunavik, Quebec: a pilot study Can. J. Microbiol. 56, 968–977.

LEVINE, M. M., J.G. XU, J. B. KAPER, H. LIOR, V. PRADO, B. TALL, J. NATARO, H. KARCH, I. K. WACHSMUTH (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, U: KARMALI, M. (1989.): Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 2, 15–38

LIGHTON, L., A. MELLANBY, S. O'BRIEN, H. SMITH (2000): Outbreaks of VTEC O157 infection linked to consumption of unpasteurised milk. Euro Surveill. 4 (23), dostupno na: [http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx? ArticleId =1590](http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=1590)

LINDGREN, S. W., A. R. MELTON, AND A. D. O'BRIEN (1993): Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 clinical isolates in an orally infected mouse model. *Infect. Immun.* 61, 3832–3842.

LINDGREN, S. W., J. E. SAMUEL, C. K. SCHMITT, A. D. O'BRIEN (1994): The specific activities of Shiga-like toxin type II (SLT-II) and SLT-II-related toxins of enterohemorrhagic *Escherichia coli* differ when measured by Vero cell cytotoxicity but not by mouse lethality. *Infect. Immun.* 62, 623–631.

LINGWOOD, C. A. (1996): Role of verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends Microbiol.* 4:147–153. U: PATON, J. C., A. W. PATON (1998.): Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 450-479.

LOUISE, C. B. i T. G. OBRIG (1995): Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J. Infect. Dis.* 172, 1397–1401.

MACKENZIE, A. M., P. LEBEL, E. ORRBINE, P. C. ROWE, L. HYDE, F. CHAN, W. JOHNSON, P. N. MCLAIN (1998): Sensitivities and specificities of premier *E. coli* O157 and premier EHEC enzyme immunoassays for diagnosis of infection with verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli*. The SYNSORB Pk Study investigators. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1608-1611.

MACRAE, M., N. J. C. STRACHAN, M. JACKLIN, I. D. OGDEN (2003): Methods to isolate and incidence of *Escherichia coli* O157 in UK Shellfish. In: 5th International Symposium on Shiga toxin - producing *E. coli* infections, VTEC 2003, Edinburgh, June 8th-11th 2003, poster presentation. U: GOURMELON, M., M. P. MONTET, S. LOZACH, C. LE MENNEC, M. POMMEPUY, L. BEUTIN , C. VERNZOY-ROZAND (2006): First isolation of Shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas in France. *J. Appl. Microbiol.* 100, 85–97.

MACRAE, M, C. HAMILTON, N. J. STRACHAN, S. WRIGHT, I. D. OGDEN (2005): The detection of *Cryptosporidium parvum* and *Escherichia coli* O157 in UK bivalve shellfish. *J. Microbiol. Meth.* 60, 395-401.

MAINIL, J. G., G. DAUBE (2005): Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *J. Appl. Microbiol.* 98, 1332-1344.

- MANAFI, M. (1996.): Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests. *Int. J. Food Microbiol.* 31, 45-58.
- MANAFI, M., B. KREMSMAIER,(2001): Comparative evaluation of different chromogenic/fluorogenic media for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Int J Food Microbiol.* 71,257-262.
- MANNA, S., C. MANNA, K. BATABYAL, B. DAS, D. GOLDER, S. CHATTOPADHYAY, B. BISWAS (2010): Serogroup distribution and virulence characteristics of sorbitol-negative *Escherichia coli* from food and cattle stool. *J. Appl. Microbiol.* 108, 658–665.
- MARCH, S. B., S. RATNAM (1986): Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* 23, 869–872.
- MARTIN C., P. COLIN, N. FANJAT, S. GILBERT, S. ORENGA (1999): Evaluation of O157:H7 ID, a new chromogenic medium for isolation and detection of *Escherichia coli* O157: H7, Enteric pathogens. *Clin. Microbiol. Infec.* 5, S3, 266–267.
- McPHERSON, M., K. LALOR, B. COMBS, J. RAUPACH, R. STAFFORD, M. D. KIRK (2009): Serogroup-Specific Risk Factors for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infection in Australia. *Clin. Infect. Dis.* 49, 249-256.
- MEAD, P. S., L. SLUTSKER, V. DIETZ, L. F. MCCAIG, J. S. BRESEE, C. SHAPIRO, P. M. GRIFFIN, R. V. TAUXE (1999): Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 607–625.
- MEHLMAN, I. J. (1984): Coliform, fecal coliforms, *E. coli* and enteropathogenic *E. coli*. In: *Compendium of methods for microbiological examination of foods*, 2nd. (Speck, M. L., Eds.). American Public Health Association. Washington, D.C., pp 265-285.
- MELLMANN, A., M. BIELASZEWSKA, R. KÖCK, A. W. FRIEDRICH, A. FRUTH, B. MIDDENDORF, D. HARMSSEN, M. A. SCHMIDT, H. KARCH (2008): Analysis of Collection of Hemolytic Uremic Syndrome–associated Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1287–1290.

MELTON-CELSA, A. R., S. C. DARNELL, AND A. D. O'BRIEN (1996): Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect. Immun.* 64:1569–1576.

MENG, J., M. P. DOYLE, S. ZHAO (2001): Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, In: Food microbiology. Fundamentals and Frontiers, 2nd Ed. (Doyle, M.P., L. R. Beuchat, T. J. Monzville, Eds.). ASM Press, Washington, D.C., 775-797.

MENRATH, A., L. H. WIELER, K. HEIDEMANN, T. SEMMLER, A. FRUTH, N. KEMPER, (2010): Shiga toxin producing *Escherichia coli*: identification of non-O157:H7-Super-Shedding cows and related risk factors. *Gut. Pathog.* 2,7.

MICHINO, H., K. ARAKI, S. MINAMI, S. TAKAYA, N. SAKAI, M. MIYAZAKI, A. ONO, H. YANAGAWA (1999): Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am. J. Epidemiol.* 150, 787-796.

MIKO, A., K. PRIES, S. HABY, K. STEEGE, N. ALBRECHT, G. KRAUSE, L. BEUTIN (2009): Assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from wildlife meat as potential pathogens for humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6462-6470.

MIYAGI K, K. OMURA, A. OGAWA, M. HANAFUSA, Y. NAKANO, S. MORIMATSU i K. SANO (2001). Survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in marine water and frequent detection of the Shiga toxin gene in marine water samples from an estuary port. *Epidemiol. Infect.* 126, pp 129-133

MIYAMOTO, Y., M. IIMURA, J. B. KAPER, A. G. TORRES, M. F. KAGNOFF (2006): Role of Shiga toxin versus H7 flagellin in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* signalling of human colon epithelium in vivo. *Cell. Microbiol.* 8, 869–879.

MONDAY, S. R., A. BEISAW, P. C. H. FENG (2007): Identification of Shiga toxigenic *Escherichia coli* seropathotypes A and B by multiplex PCR. *Mol. Cell. Probe.* 21, 308-311.

MORA, A. , M. BLANCO, J. E. BLANCO, G. DAHBI, C. LÓPEZ, P. JUSTEL, M. PILAR ALONSO, A. ECHEITA, M. ISABEL BERNÁRDEZ, E. A. GONZÁLEZ, J. BLANCO (2007): Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003 BMC Microbiol. 7, 1-9.

MUHLDORFER, I., J. HACKER, G. T. KEUSCH, D. W. ACHESON, H. TSCHAPE, A. V. KANE, A. RITTER, T. OLSCHLAGER, A. DONOHUE-ROLFE (1996.): Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*. Infect. Immun. 64, 95– 502.

MÜLLER, E. E., M. M. EHLERS (2005), Biolog identification of non-sorbitol fermenting bacteria isolated on *E. coli* O157 selective CT-SMAC agar. Water SA, 31, 247-252.

MUNIESA, M., J. JOFRE, C. GARCIA-ALJARO, A. R. BLANCH (2006): Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the environment. Environ. Sci. Technol., 40,7141-7149.

MUNIESA M, J. JOFRE (2000): Occurrence of phages infecting *Escherichia coli* O157:H7 carrying the *Stx2* gene in sewage from different countries. FEMS Microbiol. Lett., 183,197–200.

MUNIESA M, J. JOFRE (1998): Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the Shiga toxin 2 gene. Appl Environ Microbiol., 64, 2443–2448.

NATARO, J. P., J. B. KAPER (1998): Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microb. Revs. 11, 142-201.

NAUGLE, A. L., K. G. HOLT, P. LEVINE, R. ECKEL (2005): Food safety and inspection service regulatory testing program for *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef. J. Food Prot. 68, 462-468.

NEILD, G. H. (1994): Haemolytic uremic syndrome in practice. Lancet. 343, 398 – 401.

NEILL, M. A., P. I. TARR, D. N. TAYLOR, A. F. TROFA (1994): *Escherichia coli*. U: Foodborne Disease Handbook. Urednici:Hui, Y. H., J. R. Gorham, K. D. Murell, D. O. Cliver. Marcel Decker, Inc. New York. 169-213.

NEWTON, H. J., J. SLOAN, D. M. BULACH, T. SEEMANN, C. C. ALLISON, M. TAUSCHEK, R. M. ROBINS-BROWNE, J. C. PATON, T. S. WHITTAM, A. W. PATON, E. L. HARTLAND (2009): Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains negative for locus of enterocyte effacement. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 372-380.

NOVICKI, T. J., J. A. DALY, S. L. MOTTICE, K. C. CARROLL (2000): Comparison of Sorbitol MacConkey Agar and a Two-Step Method Which Utilizes Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Toxin Testing and a Chromogenic Agar To Detect and Isolate Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 547-551.

O'BRIEN, A. D., G. D. LAVECK, M. R. THOMPSON, S. B. FORMAL (1982): Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 146, 763-769.

O'BRIEN, A. D., G. D. LAVECK (1983): Purification and characterization of a Shigella dysenteriae 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 40, 675-683.

OGDEN I. D., A. J. WATT (1991): An evaluation of fluorogenic and chromogenic assays for the direct enumeration of *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 13, 212-215.

OGDEN I. D., G. C. BROWN, S. GALLACHER, P. H. GARTHWAITE, M. GENNARI, M. P. GONZALEZ, L. B. JORGENSEN, B. T. LUNESTAD, M. MACRAE, M. C. NUNES, A. C. PETERSEN, J. T. ROSNES, J. VLIEGENTHART (1998): An interlaboratory study to find an alternative to the MPN technique for enumerating *Escherichia coli* in shellfish. *Int. J. Food Mikrobiol.* 40, 57-64.

OGDEN I. D., N. F. HEPBURN, M. MACRAE (2001): The optimization of isolation media used in immunomagnetic separation methods for the detection of *Escherichia coli* O157 in foods. *J. Appl. Microbiol.* 91, 373.

OKREND, A. J. G., B. E. ROSE (1989): Isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 from meat. Revision 3, Laboratory communication no. 38. Washington, D.C., FSIS, Microbiology Division, U.S. Department of Agriculture.

OKREND, A. J. G., B. E. ROSE, C. P. LATUADA (1990): Use of 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-b-D-glucuronide in MacConkey sorbitol agar to aid in the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. *J. Food Prot.* 53, 941-943.

O'SULLIVAN M. B., P. GARVEY, M. O'RIORDAN, H. COUGHLAN, P. MCKEOWN, A. BRENNAN, E. MCNAMARA (2008): Increase in VTEC cases in the south of Ireland: link to private wells?. *Euro Surveill.* 13, 1-2.

PAO, S., D. PATEL, A. KALANTARI, J.P. TRITSCHLER, S. WILDEUS, B. L. SAYRE (2005): Detection of Salmonella strains and *Escherichia coli* O157:H7 in feces of small ruminants and their isolation with various media. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2158-2161.

PATON, A. W., R. RATCLIFF, R. M. DOYLE, J. SEYMOUR-MURRAY, D. DAVOS, J. A. LANSER, J. C. PATON (1996): Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1622–1627.

PATON, A. W., J. C. PATON (1998a): Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 598–602.

PATON, J. C., A. W. PATON (1998b): Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 450-479.

PATON, A. W., M. C. WOODROW, R. M. DOYLE, J. A. LANSER, J. C. PATON (1999): Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3357–3361.

PAVIĆ S., E. CETINIĆ (2000): Lubenica kao vehikulum obiteljske epidemije s *Escherichia coli* O111 – slučaj koji opominje. *Infektološki glasnik*, 20, 153 – 156.

PIERARD, D., L. MUYLDERMANS, L. MORIAU, D. STEVENS, S. LAUWERS (1998): Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3317–3322.

PIERSON, M. D., L. M. SMOOT (2001): Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. In: *Food microbiology. Fundamentals and Frontiers*, 2nd Ed. (Doyle, M.P., L. R. Beuchat, T. J. Monzville, Eds.), ASM Press, Washington, D.C., pp 71-87

POLLARD, D. R., W. M. JOHNSON, H. LIOR, S. D. TYLER, K. R. ROZEE (1990): Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28, 540–545.



PONTELLO, M., C. BERSANI, S. COLMEGNA, C. CANTONI (2003): Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in foodstuffs of animal origin. Eur. J. Epidemiol., 18, 157-160.

POTASMAN, I., A. PAZ, M. ODEH (2002): Infectious Outbreaks Associated with Bivalve Shellfish Consumption: A Worldwide Perspective. Clin. Infect. Dis. 35, 921-928.

PRADEL, N., V. LIVRELLI, C. DE CHAMPS, J. B. PALCOUX, A. REYNAUD, F. SCHEUTZ, J. SIROT, B. JOLY, C. FORESTIER (2000): Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. J. Clin. Microbiol. 38, 1023-1031.

RANDALL, L .P., C.WRAY, I. M. MCLAREN (1997): Studies on the development and use of a monoclonal sandwich ELISA for the detection of verotoxic *Escherichia coli* in animal faeces. Vet. Rec.140, 112-115.

READ, S. C., C. L. GYLES, R. C. CLARKE, H. LIOR, S. MCEWEN (1990): Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork, and chicken in southwestern Ontario. Epidemiol. Infect. 105, 11–20.

RESTAINO, L. (1996): Accentuate the positive. Food Quality, Nov. / Dec. 68-70.

RESTAINO, L., E. W. FRAMPTON, K. N. TURNER, D. R. K. ALLISON. (1999): A chromogenic plating medium for isolating *Escherichia coli* O157:H7 from beef. Lett. appl. microbiol.. 29, 26-30.

REY, J., S. SÁNCHEZ, J. E. BLANCO, J. HERMOSO DE MENDOZA, M. HERMOSO DE MENDOZA, A. GARCÍA, C. GIL, N. TEJERO, R. RUBIO, J. M. ALONSO (2006): Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. Int. J. Food Microbiol. 107, 212-217.

RICHARDSON, S. E., M. A. KARMALI, L. E. BECKER, C. R. SMITH (1988.) The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. Hum. Pathol. 19: 1102–1108, U: PATON, J. C., A. W. PATON (1998b): Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin. Microbiol. Rev. 11, 450-479.

RICHARDSON, S. E., T. A. ROTMAN, V. JAY, C. R. SMITH, L. E. BECKER, M. PETRIC, N. F. OLIVIERI, M. A. KARMALI (1992): Experimental verocytotoxemia in rabbits. *Infect. Immun.* 60, 4154–4167.

RILEY, L.W., R. S. REMIS, S. D. HELGERSON, H. B. MCGEE, J. G. WELLS, B. R. DAVID, R. J. HERBERT, E. S. OLCOTT, L. M. JOHNSON, N. T. HARGRETT, P. A. BLAKE, M. L. COHEN (1983): Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308, 681-685.

RIPABELLI, G., M. L. SAMMARCO, G.M. GRASSO, I. FANELLI, A. CAPRIOLI, I. LUZZI (1999): Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy, *Int. J. Food Microbiol.* , 49, 43-48.

RIPPEY, S. R., L. A. CHANDLER, W. D. WATKINS (1987): Fluorometric method for enumeration of *Escherichia coli* in molluscan shellfish. *Journal of Food Protection.* 50, 685-690.

ROBINSON, L. A., R. M. HURLEY, C. LINGWOOD, D. G. MATSELL (1995.): *Escherichia coli* verotoxin binding to human paediatric glomerular mesangial cells. *Pediatr. Nephrol.* 9:700–704., U: PATON, J. C., A. W. PATON (1998b): Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 450-479.

ROCHA, L. B., R. M. F. PIAZZA (2007): Production of Shiga toxin by Shiga toxin-expressing *Escherichia coli* (STEC) in broth media: from divergence to definition. *Lett. appl. microbiol.* 45, 411–417.

ROZEN, Y., S. BELKIN (2001): Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbio. Rev.* 25, 513–529.

SAMADPOUR, M., J.E. ONGERTH, J. LISTON, N. TRAN, D. NGUYEN, T.S. WHITTAM, R.A. WILSON, P.I. TARR. (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.

SAMADPOUR, M, M. V. BARBOUR, T. NGUYEN, T. M. CAO, F. BUCK, G. A. DEPAVIA, E. MAZENGIA, P. YANG, D. ALFI, M. LOPES, J. D. STOPFORTH (2006): Incidence of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157, Salmonella and *Listeria monocytogenes* in retail fresh ground beef, sprouts, and mushrooms. *J Food Prot.* 69, 441-443.

SANDVIG, K., M. RYD, O. GARRED, E. SCHWEDA, P. K. HOLM, B. VAN DEURS (1994): Retrograde transport from the Golgi complex to the ER of both Shiga toxin and the nontoxic Shiga B-fragment is regulated by butyric acid and cAMP. *J. Cell Biol.* 126, 53–64.

SANDVIG, K., B. VAN DEURS (1996): Endocytosis, intracellular transport and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol. Rev.* 76, 949–966.

SAXENA, S. A., A. D. O'BRIEN, E. J. ACKERMAN (1989): Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28S RNA when microinjected into *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 264:596–601., U: PATON, J. C., A. W. PATON (1998.b): Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 450-479.

SCHMIDT, H., L. BEUTIN, H. KARCH (1995): Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* 63,1055–1061.

SCHMIDT, H., J. SCHEEF, H. I. HUPPERTZ, M. FROSCH, H. KARCH (1999): *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H– Strains That Do Not Produce Shiga Toxin: Phenotypic and Genetic Characterization of Isolates Associated with Diarrhea and Hemolytic-Uremic Syndrome. *J Clin Microbiol.*, 37(11), 3491–3496.

SCHMIDT, M. A. (2010): LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cellular Microbiology*, 12, 1544–1552.

SCHMITT C. K, M. L. MCKEE, A. D. O'BRIEN (1991.): Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H–strain E32511. *Infect. Immun.* 59,1065–1073.

SCHEUTZ, F., T. CHEASTY, D. WOODWARD, H. R. SMITH (2004): Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. *APMIS*, 112, 569–584.

SCHEUTZ F., L. BEUTIN, D. PIÉÉRARD, H. KARCH, R. TOZZOLI, A. CAPRIOLI, A. D. O'BRIEN, A. R. MELTON-CELSA, L. D. TEEL, N. STROCKBINE (2009): Nomenclature of Verocytotoxins: a review, a proposal, and a protocol for typing vtx genes. 4th Annual CRLs, October 2009, dostupno na <http://www.iss.it/binary/vtec/cont/8.pdf>

SCHEUTZ, F., E. M. NIELSEN, J. FRIMODT-MØLLER, N. BOISEN, S. MORABITO, R. TOZZOLI, J. P. NATARO, A. CAPRIOLI (2011): Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011 Euro Surveill. 16 (24) Dostupno na: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19889>

SCOTTER, S., ALDRIDGE, M. CAPPS, K. (2000): Validation of a method for the detection of *E. coli* O157:H7 in foods. Food Control 11, 85–95.

SHIPMAN, A. R., S. E. JONES, G. SMITH, B. STEWART, N. MCCARTHY (2009): A case of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from a private barbecue in South East England. Euro. Surveill. 14 (29), dostupno na <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19273>

SIVRI N., I. OKUMUS, S. UYSAL (2010): The availability of *Mytilus galloprovincialis* for monitoring enteric bacteria, International journal of electronics, mechanical and mechatronics engineering, 1, 49-55.

SLANEC, T., A. FRUTH, K. CREUZBURG, H. SCHMIDT (2009): Molecular Analysis of Virulence Profiles and Shiga Toxin Genes in Food-Borne Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 75, 6187–6197.

ŠOLIĆ, M., N. KRSTULOVIĆ, S. JOZIĆ, D. CURAĆ (1999): The rates of concentration of faecal coliforms in shellfish under different environmental conditions. Environ. Int. 25, 991–1000.

ŠOLIĆ, M., S. JOZIĆ, N. KRSTULOVIĆ (2010): Interactive effects of temperature and salinity on the rate of concentration of *Escherichia coli* in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and oysters (*Ostrea edulis*). Fresen. Environ. Bull. 19, 1634-1639.

STROCKBINE, N. A., L. R. M. MARQUES, J. W. NEWLAND, H. W. SMITH, R. K. HOLMES, A. D. O'BRIEN (1986): Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. Infect. Immun. 53, 135–140.

STROCKBINE, N.A., J. G. WELLS, C. A. BOPP, T. J. BARRETT (1998): Overview of detection and subtyping methods. In: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga-Toxin-Producing *E. coli* Strains. (Kaper, J. B., A. D. O'Brien, Eds.) American Society for Microbiology, Washington D.C., pp. 331-355.

SWERDLOW, D. L., B. A. WOODRUFF, R. C. BRADY, P. M. GRIFFIN, S. TIPPEN, H. D. DONNELL, JR., E. GELDREICH, B. J. PAYNE, A. NEYER, J. G. WELLS, K. D. GREENE, M. BRIGHT, N. BEAN, AND P. A. BLAKE. (1992): A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann. Intern. Med.* 117, 812-819.

SZABO, R. E., E. TODD, J. MACKENZIE, L. PARRINGTON, A. ARMSTRONG, (1990): Increased sensitivity of the rapid grid membrane filter enzyme-labeled antibody procedure for *Escherichia coli* O157 detection in foods and bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3546-3549.

TANEIKE, I., H. M. ZHANG, N. WAKISAKA-SAITO, T. YAMAMOTO (2002): Enterohemolysin operon of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: A virulence function of inflammatory cytokine production from human monocytes. *FEBS Lett.* 524, 219-224.

TAORMINA, P. J., M. ROCELLE, S. CLAVERO, L. R. BEUCHAT (1998): Comparison of selective agar media and enrichment broths for recovering heat-stressed *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. *Food Microbiol.* 15, 631-638.

TASHIRO, H., S. MIURA, I. KUROSE, D. FUKUMURA, H. SUZUKI, M. SUEMATSU, M. YOSHIOKA, M. TSUCHIYA, A. KAI, Y. KUDOH (1994.): Verotoxin induces hemorrhagic lesions in rat small intestine. Temporal alteration of vasoactive substances. *Dig. Dis. Sci.* 39:1230-1238., U: PATON, J. C., A. W. PATON (1998b): Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 450-479.

TOBE, T., T. HAYASHI, C. G. HAN, G. K. SCHOOLNIK, E. OHTSUBO, C. SASAKAWA. (1999): Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor. *Infect. Immun.* 67, 5455-5462.

TRKOV, M., I. BERCE, D. DOVEČAR, E. GRILC, M. BUJKO, A. KRAIGHER (2008): Detection of some virulence related genes of diarrheagenic *E. coli* strains. *Zdrav. Var.* 47, 81-88.

TUTTLE, J., T. GOMEZ, M. P. DOYLE, J. G. WELLS, T. ZHAO, R. V. TAUXE, P. M. GRIFFIN (1999): Lessons from a large state outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and widespread contamination of hamburger patties. *Epidem. Infect.* 122, 185-192.

TSAI T.Y., W.J. LEE, Y.J. HUANG, K.L. CHEN, T.M. PAN. (2006): Detection of viable enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 using the combination of immunomagnetic separation with the reverse transcription multiplex TaqMan PCR system in food and stool samples. *J Food Prot.* 69, 2320-2328.

VAN DUYNHOVEN, Y. T. H. P., I. H. M. FRIESEMA, T. SCHUURMAN, A. ROOVERS, A. A. VAN ZWET, L. J. M. SABBE, W. K. VAN DER ZWALUW, D. W. NOTERMANS, B. MULDER, E. J. VAN HANNEN, F. G. C. HEILMANN, A. BUITING, R. JANSEN, A. M. D. KOOISTRA-SMID (2008): Prevalence, characterisation and clinical profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in The Netherlands. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 437-445.

VERNOZY-ROZAND, C., M. P. MONTET, Y. BERTIN, F. TRABLY, J. P. GIRARDEAU, C. MARTIN, V. LIVRELLI, L. BEUTIN (2004): Serotyping, stx2 subtyping, and characterization of the locus of enterocyte effacement island of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 strains isolated from the environment in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2556-2559.

VERNOZY-ROZAND, C., M. P. MONTET, M. BERARDIN, C. BAVAI, L. BEUTIN (2005): Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from raw milk cheeses in France. *Lett Appl. Microbiol.* 41, 235-241

VIMONT, A., C. VERNZOZY-ROZAND, M. P. MONTET, C. LAZIZZERA, C. BAVAI, M. L. DELIGNETTE-MULLER (2006a): Modeling and Predicting the Simultaneous Growth of *Escherichia coli* O157:H7 and Ground Beef Background Microflora for Various Enrichment Protocols. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 261-268.

VIMONT, A., C. VERNZOZY-ROZAND, M. L. DELIGNETTE-MULLER (2006b): Isolation of *E. coli* O157:H7 and non-O157 STEC in different matrices: review of the most commonly used enrichment protocols. *Lett Appl. Microbiol.* 42, 102-108.

VIMONT, A., M. L. DELIGNETTE-MULLER, C. VERNZOZY-ROZAND (2007): Supplementation of enrichment broths by novobiocin for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food: a controversial use. *Lett Appl. Microbiol.*, 44, 326-331.

- WADOLKOWSKI, E. A., L. M. SUNG, J. A. BURRIS, J. E. SAMUEL, A. D. O'BRIEN. (1990): Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce Shiga-like toxin type II. *Infect. Immun.* 58, 3959–3965.
- WEBSTER, D., J. COWDEN, M. LOCKING (2007): An outbreak of *Escherichia coli* O157 in Aberdeen, Scotland, September 2007. *Euro Surveill.*, 12 (39)
- WEINSTEIN, D. L., R. K. HOLMES, A. D. O'BRIEN (1988): Effects of iron and temperature on Shiga-like toxin I production by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 56, 106–111.
- WERBER, D., L. BEUTIN, R. PICHNER, K. STARK, A. FRUTH (2008): Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Serogroups in Food and Patients, Germany. *Emerg Infect Dis.* 14, 1803–1806.
- WEST, P. A., M. R COLEMAN (1986): A tentative national reference procedure for isolation and enumeration of *Escherichia coli* from bivalve molluscan shellfish by most probably number method. *J. Appl. Bacteriol.* 61, 505-516.
- WILLSHAW, G. A., J. THIRLWELL, A. P. JONES, S. PARRY, R. L. SALMON, M. HICKEY (1994): Verocytotoxin-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.
- XIA X., J. MENG, P. F. MCDERMOTT, S. AYERS, K. BLICKENSTAFF, T. TRAN, J. ABBOTT, J. ZHENG, S. ZHAO (2010): Presence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E. coli* strains in retail meats. *Appl Environ Microbiol.* 76 (6) 1709–1717.
- ZADIK, D. M., P. A. CHAPMAN, C. A. Siddons (1993): Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Journal of Medical Microbiology* 39, 153–158.
- ZWEIFEL, C., N. GIEZENDANNER, S. CORTI, G. KRAUSE, L. BEUTIN, J. DANUSER, R. STEPHAN (2010): Characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from Swiss raw milk cheese within a 3-year monitoring program. *J. Food Prot.* 73, 88-91.

### Prilog 1. Popis kratica

<b>A/E</b>	<i>Attachment and effacing (lesions)</i> Sposobnost priljubljanja VTEC sa "brisanjem", uništavanjem enterocita
<b>AEEC</b>	Attaching and effacing <i>E. Coli</i> Prihvatajuća <i>E. coli</i>
<b><i>α</i>-HlyA</b>	<i>alpha-hemolysin</i> Hemolizin (alfa)
<b>AOAC</b>	Association of Analytical Communities
<b>BAM</b>	Bacteriological analytical manual
<b>BCIG</b>	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide</i> 5-brom-4-klor-3-indol-β-D-glukuronid (kromogeni supstrat)
<b>BPW</b>	<i>Buffered peptone water</i> Puferirana peptonska voda
<b>CFU</b>	<i>Colony forming unit</i> Broj bakterija izračunat iz broja kolonija koje se formiraju u/na hranjivoj podlozi
<b>CUT-OFF</b>	<i>Cut - off limit</i> granične vrijednosti rezultata testiranja
<b>DAEC</b>	<i>Diffuse-Adhering E. Coli</i> Difuzno adherentna <i>E. coli</i>
<b><i>eaeA, eae</i></b>	Gen koji kodira intimin
<b>EAEC/ EaggEC</b>	<i>Enteraggative E. Coli</i> Enteroagregativna <i>E. coli</i> (),
<b>EAF</b>	<i>EPEC adherence factor</i> Protein za priljubljanje EPEC
<b>EC</b>	<i>Endothelial Cell</i> Stanice endotela
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority
<b>EHEC</b>	<i>EnteroHemorrhagic E. Coli</i> Enterohemoragična <i>E. coli</i>



<b>EHEC-HlyA</b>	<i>Enterohemolysin</i> Enterohemolizin
<b>EIEC</b>	<i>Enteroinvasive E. Coli</i> Enteroinvazivna <i>E. coli</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assays</i> Imunoenzimski test
<b>EMBA</b>	<i>Eosin Methylen Blue Agar</i> Eozin metilen plavi agar
<b>EPEC</b>	<i>Enteropathogenic E. Coli</i> Enteropatogena <i>E. coli</i>
<i>esc, sep</i>	geni koji kodiraju T3SS
<i>esp</i>	geni koji kodiraju sekrecijske proteine tip III
<b>ETEC</b>	<i>Enterotoxigenic E. Coli</i> Enterotoksigena <i>E. coli</i> .
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>Gb3</b>	<i>Globotriaosylceramide 3</i> glikolipidni receptor na ciljanim stanicama domaćina
<b>Gb4</b>	<i>Globotetraosylceramide 4</i> glikolipidni receptor na ciljanim stanicama domaćina
<b>GUD</b>	<i>Beta-D-glucuronidase</i> Enzim β-D-glukuronidaza
<b>HC</b>	<i>Hemorrhagic Colitis</i> Hemoragični kolitis
<i>hlyA, EHEC-HlyA</i>	gen koji kodira enterohemolizin
<b>HPA</b>	Health protection agency
<b>HRP</b>	<i>HorseRadish Peroxidase</i> Enzim peroksidaza porijeklom iz biljke Hren
<b>HUS</b>	<i>Hemolytic Uremic Syndrome</i> Hemolitički uremički sindroma
<b>IL-1β</b>	<i>InterLeukin1β</i> Vrsta citokina
<b>IMS</b>	<i>Immunomagnetic Separation</i> imunomagnetska separacija
<b>ISO</b>	International organization for standardization
<b>LD50</b>	<i>Lethal Dose 50</i> letalna doza otrova kod koje 50% otrovanih životinja ugine

<b>LEE</b>	<i>Locus Enterocyte Effacement</i> “lokus za brisanje enterocita” ili „otok patogenosti”, mjesto na kromosomu sa specifičnim virulentnim genima
<b>LPS</b>	<i>LipoPolySaccharide</i> lipopolisaharidi
<b>mEC / mEC-N</b>	<i>Modified Escherichia Coli broth</i> <i>E. coli</i> bujon sa smanjenom količinom žučnih soli/ <i>E. coli</i> bujon sa novobiocinom
<b>MMGB</b>	<i>Minerals Modified Glutamate Broth</i> Mineralno-modificirani-glutamatni bujon
<b>MPN</b>	<i>Most Probable Number</i> Najvjerojatniji broj (bakterija)
<b>mTSB/ mTSBN</b>	<i>Modified Tryptone Soya broth/ Modified Tryptone Soya broth-Novobiocin</i> Modificirani tripton soja bujon / modificirani tripton soja bujona sa novobiocinom
<b>NMKL</b>	Nordic committee on food analysis
<b>non-O157</b>	Kraća oznaka verotoksigenih <i>E. coli</i> serotipa različitog od <i>E. coli</i> O157:H7
<b>O157</b>	Kraća oznaka serotipa <i>E. coli</i> O157:H7
<b>O157:H7 ID/</b>	O157:H7 ID AGAR – kromogeni agar za identifikaciju <i>E. coli</i>
<b>O157:H7 ID - F</b>	O157:H7
<b>OMP</b>	<i>Outer Membrane Protein</i> Protein vanjske membrane (npr. intimin)
<b>OMP</b>	<i>Outer Membrane Protein</i> Protein vanjske membrane
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> lančana reakcija polimerazom
<b>PMN</b>	<i>PolyMorphonuclear Leukocyte</i> Polimorfonuklearni leukocit
<b>RNA</b>	<i>RiboNucleic Acid</i> Ribonukleinska kiselina
<b>RPLA</b>	<i>Reverse Passive Latex Agglutination</i> obrnuta pasivna lateks aglutinacija
<b>rRNA</b>	<i>Ribosomal RiboNucleic Acid</i> Ribosomska ribonukleinska kiselina

<b>rtPCR</b>	<i>real time PCR</i> Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu
<b>SLT II probe</b>	<i>Shiga-like toksin II probe</i> Segment DNA za dokaz <i>stx2</i> gena tehnikom DNA-hibridizacije
<b>SLTEC</b>	<i>Shiga-Like Toksin producing E. Coli</i> (sinonim za VTEC)
<b>SMAC / CT-SMAC</b>	<i>Sorbitol MacConkey Agar /with Cefixime and Tellurite</i> Sorbitol-MacConkey Agar /sa cefiksimom i teluritom
<b>β-GAL</b>	<i>β-galactosidase</i> Enzim β-galaktozidaza
<b>β-GAL+</b>	β-galaktozidaza pozitivni sojevi koji imaju sposobnost razlaganja β-galaktozida
<b>β-GLUC</b>	<i>Beta-glucuronidase</i> Enzim β-glukuronidaza
<b>β-GLUC-</b>	Oznaka za β-glukuronidaza negativne sojeve <i>E. coli</i> koji ne mogu koristiti β-glukuronid
<b>β-GLUC+</b>	Oznaka za β-glukuronidaza pozitivne sojeve <i>E. coli</i> koji imaju sposobnost razlaganja β-glukuronida
<b>STEC</b>	<i>Shiga Toksin producing E. Coli</i> (sinonim za VTEC)
<b>Stx</b>	<i>Shiga toxin</i> Shiga toksin (toksini jednake strukture i aktivnosti koje proizvodi <i>Shigella dysenteriae</i> tip 1). Uvriježeni naziv i oznaka za verotoksin.
<b>Stx 1, Stx 2</b>	Geni koji kodiraju verotoksine 1 i 2
<b>Stx, stx</b>	<i>Shiga toxin genes</i> Geni koji kodiraju verotoksine
<b>Stx/ VT –ELISA</b>	Imunoenzimski test koji ima sposobnost detekcije verotoksina
<b>Stx/VT- PCR</b>	Lančana reakcija polimerazom za detekciju <i>stx</i> gena
<b>Stx1</b>	<i>anti-Stx neutralizable toxin</i> Verotoksin 1
<b>Stx2</b>	<i>Nonneutralizable toxin</i> Verotoksin 2
<b>T3SS</b>	<i>Type III Secretion System</i> sekrecijski sistem tip III – za sekreciju drugih LEE kodiranih proteina

<b>TBX</b>	<i>Tryptone Bile X-Gluc agar</i> TBX agar - kromogeni agar za identifikaciju $\beta$ -glukuronidaza pozitivnih sojeva <i>E. coli</i>
<b>Tir</b>	<i>Translocated intimin receptor</i> Translocirani receptor za intimin
<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i> Vrsta citokina
<b>tRNA</b>	<i>Transfer RiboNucleic Acid</i> Transportna ribonukleinska kiselina
<b>TTP</b>	<i>Thrombotic Thrombocytopenic Purpura</i> Trombotičko-trombocitopenična purpura
<b>VCA</b>	<i>Vero cell assay</i> Test na Vero stanicama
<b>VT</b>	<i>Verotoxin</i> Verotoksin
<b>VTEC</b>	<i>VerocyoToxigenic Escherichia Coli, Verotoxigenic E. Coli</i> Verocitotoksigena, Verotoksigena <i>E. coli</i>
<b>VTEC non-O157</b>	Verotoksigena <i>E. coli</i> serotipa različitog od <i>E. coli</i> O157:H7
<b>VTEC O157</b>	Verotoksigena <i>E. coli</i> serotip O157:H7
<b>WHO</b>	World Health Organization

## Prilog 2. Popis tablica

- Tablica 1.** Klinički simptomi patogenih skupina *E. coli* (FENG i WEAGANT, 2002.)
- Tablica 2.** Deset najučestalijih serotipova VTEC potvrđenih u EU 2007/2008. godine (ANON., 2010.e)
- Tablica 3.** VTEC seropatotipovi ovisno o stupnjevima jačine oboljenja i sposobnosti izazivanja epidemije (GYLES, 2007.)
- Tablica 4.** Proizvodna područja školjkaša obuhvaćena istraživanjem
- Tablica 5.** Tumačenje IMViC testa
- Tablica 6.** Sojevi korišteni u verifikaciji metoda
- Tablica 7.** Određivanje „cut-off“ vrijednosti
- Tablica 8.** Primjer tipičnih rezultata testa po uputi Verotoxin Antigen, 6006, Generic Assays
- Tablica 9.** Granica detekcije ELISA testa bez umnažanja (CFU/mL)
- Tablica 10.** Korištene početnice za amplifikaciju
- Tablica 11.** Stvarni broj dodane *E. coli* O157:H7/non-O157 određen MPN metodom
- Tablica 12.** Usporedni prikaz dokaza porasta *E. coli* O157:H7 klasičnim metodama za izdvajanje  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* i ELISA postupkom
- Tablica 13.** Određivanje prisutnosti verotoksina ELISA postupkom u uzorcima školjkaša s različitim zagađenja s VTEC O157:H7
- Tablica 14.** Određivanje prisutnosti verotoksina u uzorcima školjkaša u ELISA postupku sa i bez obogaćenja
- Tablica 15.** Broj mikroorganizama u zagađenom moru
- Tablica 16.** Usporedba osjetljivosti, specifičnosti i podudarnosti ELISA metode sa klasičnom kulturnom metodom 3
- Tablica 17.** Udjeli uzoraka školjkaša s izoliranom *E. coli* u ukupnom broju pretraženih školjkaša po vrstama

- Tablica 18.** Karakteristike kultura VTEC izdvojenih iz školjkaša
- Tablica 19.** Nalaz VTEC/EPEC u školjkašima prema kronološkom redu i točkama uzorkovanja
- Tablica 20.** Broj VTEC/EPEC u ukupno pretraženim i uzorcima s izoliranom *E. coli*
- Tablica 21.** Razlike u učestalosti VTEC-EPEC između vrsta školjkaša
- Tablica 22.** Razlike između vrsta školjkaša s obzirom na prisutnost *E. coli* i nezadovoljavajuće vrijednosti MPN *E. coli*/100 g
- Tablica 23.** Razlike u učestalosti nalaza sojeva VTEC/EPEC u školjkašima između proizvodnih područja
- Tablica 24.** Broj pozitivnih nalaza VTEC i EPEC u uzorcima unutar granica razreda mikrobiološke kontaminacije za razvrstavanje proizvodnih područja
- Tablica 25.** Razlike proizvodnih područja s obzirom na MPN *E. coli*/u 100g školjkaša
- Tablica 26.** Udio nalaza VTEC/EPEC u više vrsta školjkaša u istom proizvodnom području
- Tablica 27.** Mogućnost utjecaja porasta MPN *E. coli*/100g na pojavnost VTEC i EPEC
- Tablica 28.** Prikaz rezultata nalaza VTEC i EPEC prema godinama istraživanja
- Tablica 29.** Prikaz rezultata nalaza VTEC i EPEC prema ljetnoj i zimskoj sezoni

### **Prilog 3. Popis slika**

- Slika 1.** Različiti patovarovi *E. coli* prema DONNENBERGU, 2002.
- Slika 2.** Prikaz razvoja bolesti i mjesta djelovanja VTEC u organizmu (prema GYLES, 2007.)
- Slika 3.** Dagnje (foto: I. Listeš)
- Slika 4.** Kamenice (foto: I. Listeš)
- Slika 5.** Prnjavice (foto: I. Listeš)
- Slika 6.** Kunjke (foto: I. Listeš)
- Slika 7.** *E. coli* O157:H7 i različiti ATCC sojevi *E. coli* na O157:H7 ID agaru (foto: I. Listeš)
- Slika 8.** Prikaz kapilarne gel-elektroforeze
- Slika 9.** Stvarna količina  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* (tri ATCC soja *E. coli*) i  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7 u 100g kontaminiranih školjkaša određena MPN metodom na TBX i O157:H7 ID agaru (foto: I. Listeš)
- Slika 10.** Tehnika nacjepljivanja metodom 1 - varijanta 1 na TBX agaru, uz kontrolu rasta na O157:H7 ID agaru (foto: I. Listeš)
- Slika 11.** Tehnike nacjepljivanja primjenom metode 1 na TBX agaru, varijanta 2 - oznaka 1 i 2 i varijanta 3 - oznaka 3, uz kontrolu rasta na O157:H7 ID agaru - oznaka 4 (foto: I. Listeš)
- Slika 12.** Tehnika nacjepljivanja primjenom metode 2, varijanta 2 (T-tehnika iscrpljivanja na jednoj petrijevoj ploči CT-SMAC agara - lijevo i O157:H7 ID agara - desno) (foto: I. Listeš)
- Slika 13.** Tehnika nacjepljivanja primjenom metode 2, varijanta 1 (iscrpljivanje preko dvije petrijeve ploče O157:H7 ID - gornji red i CT-SMAC agara - donji red) (foto: I. Listeš)

- Slika 14.** Tri varijante metode 3 naciepljivanja čiste kulture od 1 CFU *E. coli* O157:H7/g školjkaša na O157:H7 ID agaru,  $10^{-3}$  razrjeđenje (oznaka 1), T-tehnika (oznaka 2) i iscrpljivanje preko dvije ploče (oznake 3 i 4) (foto: I. Listeš)
- Slika 15.** Tri varijante naciepljivanja metode 3 zagađenjem  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7 i  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* u odnosu 0,5:0,6 CFU/g školjkaša (foto: I. Listeš)
- Slika 16.** Tri varijante naciepljivanja metode 3 zagađenjem  $\beta$ -GLUC(-) *E. coli* O157:H7 i  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* u odnosu 0,25:1,1 CFU/g školjkaša (foto: I. Listeš)
- Slika 17.** Usporedba porasta miješane kulture  $\beta$ -GLUC/sorbitol(-) *E. coli* O157:H7 i  $\beta$ -GLUC/sorbitol (+) *E. coli* u odnosu 0,25:1,1 CFU/g školjkaša, umnožene u mTSBN bujonu tehnikom iscrpljivanja, na CT-SMAC i O157:H7 ID agar, (foto: I. Listeš)
- Slika 18.** Dokaz porasta 5400 MPN *E. coli* non-O157:H7 i zagađenja s 9200 MPN VTEC O157:H7/100g školjkaša na TBX agaru u uzorku 2270 (foto: I. Listeš)
- Slika 19.** Dokaz porasta 9200 MPN VTEC O157:H7 i dodane kompetitivne mikroflore od 5400 MPN *E. coli* non-O157:H7 u 100g školjkaša na O157:H7 ID agaru (foto: I. Listeš)
- Slika 20.** Dokaz rasta 130 MPN VTEC O157:H7 (smaragdno zelene kolonije u poljima) u uzorku s 5400 MPN *E. coli* non-O157:H7 u 100g školjkaša (foto: I. Listeš)
- Slika 21.** Dokaz rasta 20 MPN VTEC O157:H7 (smaragdno zelene kolonije) u uzorku s 5400 MPN *E. coli* non-O157:H7 u 100g školjkaša (foto: I. Listeš)
- Slika 22.** Dokaz porasta VTEC O157:H7 iz tri razine zagađenja metodom 2 na O157:H7 ID agaru (na slici desno), uz dodatak TBX agara za vidljiv rast *E. coli* non-O157:H7 (na slici lijevo) (foto: I. Listeš)
- Slika 23.** Dokaz bogatog rasta VTEC O157:H7 iz sve tri razine zagađenja metodom 3 na O157:H7 ID agaru (foto: I. Listeš)



- Slika 24.** Broj VTEC O157:H7 MF metodom na O157:H7 ID agaru, (foto: I. Listeš)
- Slika 25.** MPN  $\beta$ -GLUC(-)VTEC O157:H7 i  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* non O157:H7 na O157:H7 ID i TBX agaru u uzorku zagađenih živih dagnji bazena 1 (foto: I. Listeš)
- Slika 26.** MPN  $\beta$ -GLUC(-)VTEC O157:H7 i  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* non O157:H7 na O157:H7 ID i TBX agaru u uzorku zagađenih živih dagnji iz bazena 2, ponavljanje A (foto: I. Listeš)
- Slika 27.** MPN  $\beta$ -GLUC(-)VTEC O157:H7 i  $\beta$ -GLUC(+) *E. coli* non O157:H7 na O157:H7 ID i TBX agaru u uzorku zagađenih živih dagnji iz bazena 2, ponavljanje B (foto: I. Listeš)
- Slika 28.** Porast  $\beta$ -GLUC(-) VTEC O157:H7/100g školjkaša (smaragdno zelene kolonije) u uzorcima dagnji B1 i B2, metodom 3, varijante 2 i 3 naciepljivanja na O157:H7 ID agar (foto: I. Listeš)
- Slika 29.** ELISA test na uzorcima iz pokusa onečišćenja živih školjkaša putem mora i pozitivnim izolatima *E. coli* iz školjkaša u PCR testu (oznake 39-120)
- Slika 30.** Verifikacija PCR postupka i izbor pozitivne kontrole
- Slika 31.** PCR pozitivne *E. coli* kulture iz pojedinačnih uzoraka školjkaša
- Slika 32.** Zastupljenost VTEC kolonija unutar PCR pozitivnih *E. coli* kultura iz pojedinog uzorka školjkaša

#### **Prilog 4. Popis shema**

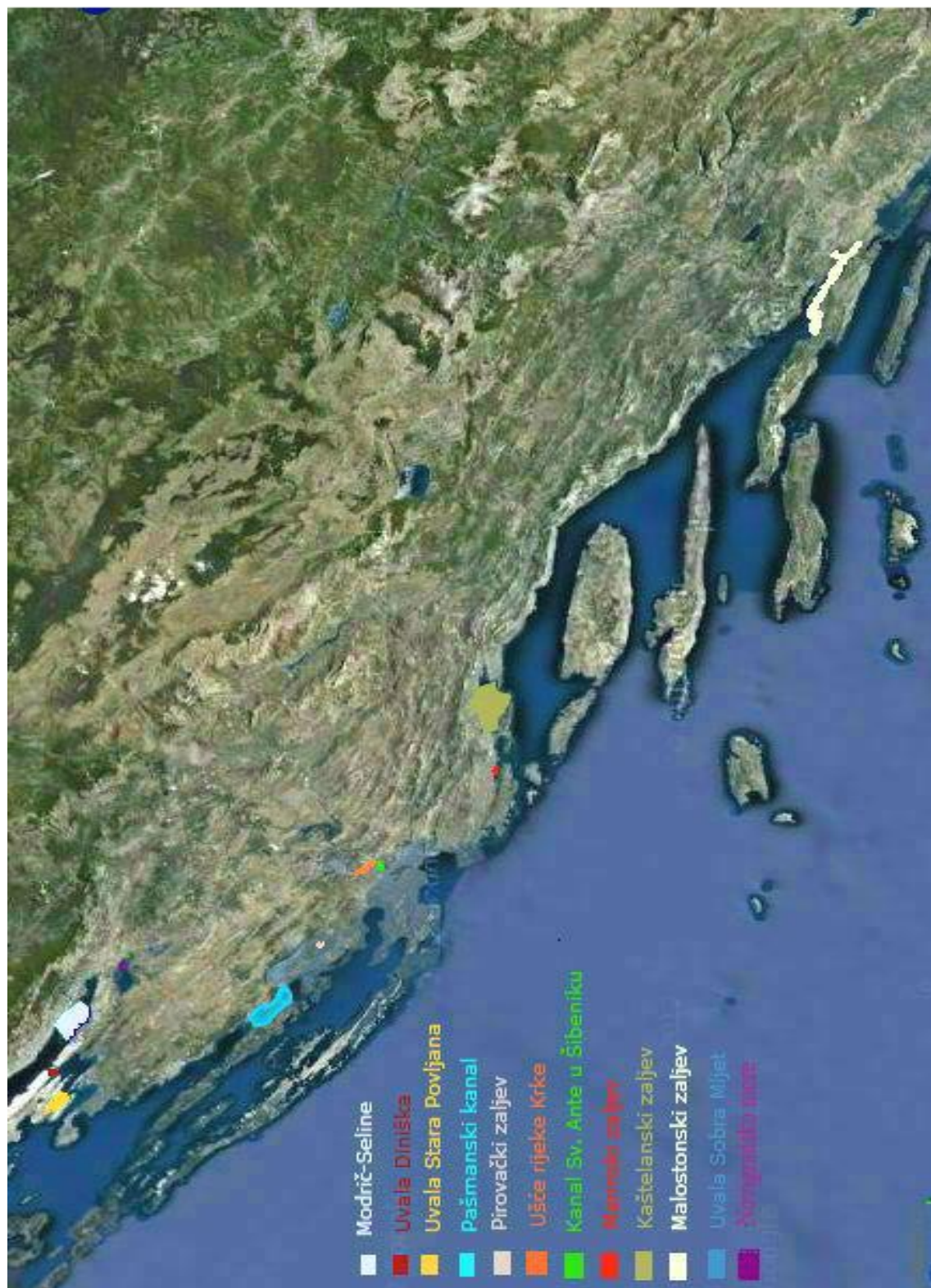
- Shema 1.** Metoda ISO/TS 16649-3/2005 za brojanje i izolaciju  $\beta$ -glukuronidaza pozitivne *E. coli* pri 44 °C u uzorcima školjkaša (ANON., 2005.b)
- Shema 2.** Metoda 1. Modifikacija ISO/TS 16649-3 MPN metode za izolaciju  $\beta$ -glukuronidaza negativne *E. coli* na TBX agaru uz inkubaciju pri 41,5 °C
- Shema 3.** Metoda 2. Kombinacija MPN metode i metode za izolaciju  $\beta$ -glukuronidaza negativne *E. coli* sa dodatnim obogaćenjem u mTSBN i izdvajanjem na O157:H7 ID agaru
- Shema 4.** Metoda 3. Metoda za izolaciju  $\beta$ -glukuronidaza negativne *E. coli* obogaćenjem u mTSBN i izdvajanjem na O157:H7 ID (i CT-SMAC agaru)

## **Prilog 5. Popis grafikona**

- Grafikon 1.** Broj slučajeva HUS-a prikazan prema serogrupama uzročnika i dobi pacijenata za 2008. godinu, (ANON., 2010.e)
- Grafikon 2.** Udio hrane u ukupno pretraženim uzorcima koji su povezani s oboljenjima od VTEC od 2005. - 2008. (prema ANON., 2010.e)
- Grafikon 3.** Broj uzoraka školjkaša sa izoliranom *E. coli*, VTEC i EPEC, prema broju pretraženih školjkaša
- Grafikon 4.** Distribucija gena unutar vrsta školjkaša
- Grafikon 5.** Proizvodna područja sa utvrđenim VTEC i EPEC u uzorcima školjkaša
- Grafikon 6.** Prevalencija VTEC i EPEC u ukupno pretraženim uzorcima i uzorcima sa izoliranom *E. coli*
- Grafikon 7.** Udio pojedinih vrsta školjkaša u VTEC i EPEC uzorcima
- Grafikon 8.** Odnos prevalencija VTEC i EPEC u pretraženim uzorcima i uzorcima sa izoliranom *E. coli* po vrstama školjkaša
- Grafikon 9.** MPN *E. coli*/100 g u VTEC i EPEC pozitivnim uzorcima po vrstama školjkaša
- Grafikon 10.** Odnos srednjih i maksimalnih vrijednosti MPN/100g po vrstama školjkaša
- Grafikon 11.** Prikaz odnosa proizvodnih područja prema zastupljenosti uzoraka s izdvojenom VTEC/EPEC u ukupnom broju pozitivnih uzoraka školjkaša
- Grafikon 12.** Prevalencija VTEC/EPEC u uzorkovanim školjkašima po proizvodnim područjima
- Grafikon 13.** Odnos prevalencija VTEC i EPEC u uzorcima s izdvojenom *E. coli* u školjkašima iz ispitanih proizvodnih područja
- Grafikon 14.** Odnos broja izoliranih VTEC i EPEC u školjkašima prema proizvodnim područjima i broja uzoraka prema MPN vrijednosti
- Grafikon 15.** MPN *E. coli*/100g u uzorcima pozitivnima na nalaz VTEC/EPEC po proizvodnim područjima

- Grafikon 16.** Odnos srednjih i maksimalnih MPN *E. coli* /100g vrijednosti po proizvodnim područjima
- Grafikon 17.** Odnos proizvodnih područja s obzirom na broj školjkaša razvrstanih u razrede
- Grafikon 18.** Odnos srednjih i maksimalnih MPN vrijednosti proizvodnih područja sa više vrsta školjkaša
- Grafikon 19.** Broj pretraženih vrsta školjkaša Malostonskog zaljeva prema granicama razreda za razvrstavanje područja
- Grafikon 20.** Pojavnost i odnos MPN *E. coli*/100g u uzorcima školjkaša s nalazom VTEC/EPEC iz Malostonskog zaljeva
- Grafikon 21.** Prikaz vrijednosti MPN *E. coli*/100g uzoraka školjkaša sa nalazom VTEC i EPEC po redu pojavljivanja
- Grafikon 22.** Godišnje razlike u pojavnosti pozitivnih nalaza VTEC i EPEC u uzorcima školjkaša
- Grafikon 23.** Godišnje razlike u pojavljivanju VTEC i EPEC pozitivnih uzoraka školjkaša uz ljetne i zimske temperature mora

Prilog 6. Proizvodna područja dalmatinskog dijela istočne obale



## 10. ŽIVOTOPIS

Irena Listeš, rođ. Jelaska-Relja rođena je 15. prosinca 1968. godine u Splitu. Udana je i majka je dvoje djece.

Osnovnu školu „Ruđer Bošković“ završila je 1983. u Splitu. Kemijski školski centar u Splitu završava 1987. godine, a Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisuje 1987. godine gdje diplomira 1994. godine s prosjekom ocjena 4,29.

Nakon završenog Veterinarskog fakulteta u Zagrebu, 1994. godine volontira u Veterinarskom zavodu Split, a 1995/96 radi u Poljoprivrednom centru „Vitroplant“, Solin na poslovima otvaranja i vođenja veterinarske ljekarne i osnivanja veterinarske savjetodavne službe u sklopu istraživačkog projekta „Poticanje razvoja Splitsko-dalmatinske županije“.

Kroz 1997. i 1998. godinu radi u Veterinarskoj stanici Kaštela na svim poslovima karakterističnim za veterinarsku djelatnost. U 2000. godini polaže državni stručni ispit za zvanje veterinarski inspektor. U periodu 2000/01 radi na Popisu stanovništva 2001. godine i honorarno na istraživanju tržišta i javnog mišljenja za agenciju PULS, a 2002. godine postaje voditelj pogona za uzgoj i mrijest riblje mlađi u poduzeću „Maring“ - Split, gdje radi na tehnološkim i veterinarskim poslovima, uz praćenje i uvođenje novih znanstvenih dostignuća na polju marikulture. U 2003. godini zapošljava se u Hrvatskom veterinarskom institutu Zagreb - Veterinarski zavod Split (HVI-VZS), kao djelatnica Laboratorija za mikrobiologiju hrane i hrane za životinje, te 2007. godine postaje voditeljica laboratorija za pripremu podloga i sterilizaciju i zamjenica voditelja laboratorija za mikrobiologiju hrane i hrane za životinje. Djelatnica je Nacionalnog referentnog laboratorija za praćenje mikrobiološke i virusne kontaminacije školjkaša, uspostavljenog od 2011. godine u sklopu Laboratorija za mikrobiologiju hrane i hrane za životinje, Veterinarskog zavoda u Splitu.

Do sada je sudjelovala u sljedećim stručnim usavršavanjima:

- 2005 Tečaj peludne analize meda, Zavod za ribarstvo, pčelarstvo i specijalnu zoologiju, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; Zagreb  
Seminar; Kako u rutini uspješno određivati mikroorganizme hrane, Čakovec, Hrvatska
- 2006 Međunarodna radionica; "5th Workshop of European national referent laboratories" 7-9 march 2006, Weymouth, UK
- 2007 Međunarodna radionica; "6 th Workshop of European national reference laboratories" 15-17 May 2007, Galway, Irska

- 2008 Seminar; Primjena Higijenskog paketa EU na žive školjkaše, MPRRR, Poreč, Hrvatska
- Seminar; Organizacija nacionalnih referalnih laboratorija i veterinarske službe u Sloveniji, MPRRR i HVI, Zagreb, Hrvatska
- Projekt; "Training course on methods for risk assessment in animal health and food safety fields" na Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" Teramo Italija, u okviru Interreg/cards-phare project, Interregional Center for Food Safety and Risk Analysis (SARA)
- Projekt; "Training period in food safety" na Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" Teramo, Italija, u okviru Interreg/cards-phare project, Interregional Center for Food Safety and Risk Analysis (SARA)
- Seminar;"IV regionalni seminar o HACCP sustavu" u organizaciji Hrvatske agencije za hranu, Split, Hrvatska
- 2009 Projekt; "Training course of anatomy, histology and bacteriology for diagnostic disease of marine/aquatic fish and molluscs" na Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" Teramo, Italija, u okviru projekta "Centre for Aquaculture, production and Safety" (CAPS)
- Projekt; "Training course for Norovirus Research about Hepatitis A and Bluetongue adopting PCR methods" na Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" Teramo, Italija, u okviru projekta "Centre for Aquaculture, production and Safety" (CAPS)
- Projekt; "Training course in microbiological methods for *Vibrio* spp, *Listeria monocytogenes* from seafood, Staphylococcal enterotoxins and validation of the methods according ISO 16140" na Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" Teramo, Italija, u okviru projekta "Centre for Aquaculture, production and Safety " (CAPS)
- Seminar; edukacija za proizvođače o proizvodnji u akvakulturi i zdravstvenoj ispravnosti proizvoda školjaka i riba u okviru projekta "Centre for Aquaculture, production and Safety" (CAPS), Split, Hrvatska
- Međunarodna radionica; Primjena zemljopisnog informacijskog sistema za potporu kontrole i održavanja zdravstvene ispravnosti proizvoda školjaka i riba (The Web Based GIS and Database application) uz završni seminar u okviru projekta "Centre for Aquaculture, production and Safety" (CAPS), Split, Hrvatska

2010 Međunarodna radionica; 9th Workshop of microbiological NRLs for monitoring bacteriological and viral contamination of bivalve molluscs, EURL CEFAS 18-19 May, Ancona, Italija

Međunarodna radionica; Workshop on Anisakis and other fish parasitic infestation management, food safety and business aspects, experiences from MS (FBO and CA), Zadar, Hrvatska

2011 Međunarodna radionica; 10<sup>th</sup> Workshop of microbiological NRLs for monitoring bacteriological and viral contamination of bivalve molluscs, 10-12 May, EURL CEFAS, Weymouth, UK,

2012 Međunarodna radionica; Workshop on Food Safety requirements regarding fish and live bivalve molluscs AGR 47097. Implementacija i način primjene europskih regulativa vezanih uz žive školjkaše i ribe u Italiji, Španjolskoj, Engleskoj i Danskoj, Split, Hrvatska

Do sada je sudjelovala u objavi slijedećih znanstvenih i stručnih članaka:

Radovi u časopisima:

KOVAČIĆ, A, I. LISTEŠ, C. VUČICA, L. KOZAČINSKI, I. TRIPKOVIĆ, K. SIŠKO-KRALJEVIĆ (2013): Distribution and genotypic characterization of *Campylobacter jejuni* isolated from poultry in Split and Dalmatia County, Croatia.

Zoonoses Public Health, 60, 269 - 276

ŠKOKO, I., E. LISTEŠ, I. LISTEŠ, L. KOZAČINSKI (2010): Norovirusi u školjkašima kao akutni problem današnjice, Meso XII, 3, 173-179

FLORIJAČIĆ T., A. OPAČAK, I. BOŠKOVIĆ, D. JELKIĆ, S. OZIMEC, T. BOGDANOVIĆ, I. LISTEŠ, M. ŠKRIVANKO, Z. PUŠKADIJA (2009): Heavy metal concentrations in the liver of two wild duck species: influence of species and gender, Ital. journal Anim. Sci. Vol 8 (suppl 3), 222-224

MLADINEO I, I. LISTEŠ (2004): *Kudoa* sp. u filetima oslića; Meso VI, 3, 46-50



Radovi objavljeni u zbornicima radova domaćih i međunarodnih kongresa:

ŠKOKO, I., I. LISTEŠ, T. DUJIĆ, A. KATIĆ (2011): Hygiene assessment criteria in the production of carcasses in the dalmatia. U: N. Maltar-Strmečki, K. Severin, A.Slavica, ed., Book of Abstracts, The International Congress "Veterinary Science and Profession", 03-04.10.2011, Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Pp 86 - 86.

FLORIJAČIĆ T., A. OPAČAK, I.BOŠKOVIĆ, D. JELKIĆ, S. OZIMEC, T. BOGDANOVIĆ, I. LISTEŠ, M. ŠKRIVANKO, Z. PUŠKADIJA (2010): Koncentracija teških metala u jetri dvije vrste divljih pataka, U: Marić, S., Z.Lončarić, T.Florijančić; R. Lužaić, Zbornik sažetaka 45. hrvatskog i 5.međunarodnog simpozija agronoma, Osijek: Poljoprivredni fakultet, str. 183 - 184

ŽAPER, J., M. ODAK, I. LISTEŠ, A. RAKIĆ (2009): Sirifikacija mlijeka s reziduama cefalosporina, U: Pičuljan, K. i S. Smolec, Knjiga sažetaka, XXI. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, 22. travnja 2009,Trogir, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, str. 243-243