

FIL/IDF - ref. S. I. 9405
(nastavak)

Značaj patogenih mikroorganizama u sirovom mlijeku

M. Rea and M. G. Fleming, National Dairy Products Centre, Moorepark, Fermoy, Co. Cork, Ireland

Poglavlje 8.

ESCHERICHIA COLI (ETEC)

1. Uvod

Escherichia coli prvi puta opisana 1885. postupno se pojavila kao uzročnik dječjeg proljeva. Danas su opće poznate četiri patogene kategorije *E. coli* uzročnika proljeva: enteropatogene (EPEC), enteretoksigene (ETEC), enteroinvazivne (EIEC) i enterohemoragične (EHEC). Ovo će se poglavlje baviti samo enterotoksigenom *E. coli* ili ETEC.

Prije 1968. nije se znalo da je ETEC uzročnik proljeva, a tada se pokazalo da je on važan patogen u Indiji i Bangladešu gdje je ETEC infekcija endemična. U zemljama u razvoju su proljevi zajedno s lošom ishranom glavni uzrok smrti djece mlađe od 5 godina. ETEC je odgovoran za veliki udjel akutnog proljeva u djetinjstvu u tim predjelima i zbog toga značajno pridonosi visokoj razini smrtnosti. Sojeve ETEC karakterizira proizvodnja enterotoksina koji su dobro okarakterizirani, neotporni prema toplini i/ili prema toplini otporni. Prema toplini neotporan enterotoksin (LT) je imunološki srodan s toksinom kolere (CT) dok je prema toplini otporan enterotoksin (ST) nije antigen i male je molekularne težine. Sojevi ETEC, glavna zaliha nesimptomatičnih humanih prenosilaca, normalno je povezan s proljevima putnika iz razvijenih u manje razvijene zemlje prije nego bolestima izazvanim hranom u razvijenim zemljama. Ipak i u razvijenim je zemljama bilo provala bolesti izazvanih hranom.

2. Karakteristike

2.1. Klasifikacija, morfologija i uzgajanje

E. coli se klasificira kao član familije Enterobacteriaceae.

Bakterije su Gram-negativni, nesporogeni ravni štapići s flagelama ili nepokretni (1). Osim proteinskih flagela većina sojeva ima rese ili vlaknaste

bjelančevine, koje se, često brojne, istežu s površine bakterije, a neke od njih imaju posebne funkcije adhezivnih organa. Na hranjivom agaru mogu proizvesti dva tipa kolonija: hrapave (R) i glatke (S). S-tipovi su nisko-konveksni, vlažni, sivi, sjajne površine i potpuno oštri a lako dispergiraju u otopini soli. R tipovi su suhi i teško dispergiraju u otopini soli. S oblici su razvili polisaharidne lance po strani kao dio njihovih vanjskih lipopolisaharidnih membrana dok su R oblici mutacijom izgubili polisaharidnu stranu lanaca, pa se na agaru pojavljuju kao suhe, naborane kolonije.

2.2. Biokemija

E. coli je fakultativni anaerob koji može rasti u jednostavnim šećerima i minimalnim osnovnim supstratima. Njegova je optimalna temperatura 37°C. Fermentira glukozu i ostale ugljikohidrate proizvodeći piruvat, koji kasnije prelazi u mliječnu, octenu i mravlju kiselinu. Laktozu općenito fermentira, ali neki sojevi to čine uz odgađanje ili je uopće ne fermentiraju. Sojevi *E. coli* normalno proizvode indol, pozitivni su na metil-crvenu boju, negativni u Voges Proskauer reakciji, a ne koriste citrat kao jedini izvor ugljika. O ovim se pokusima normalno govori kao o ImVic pokusu. Oko 95% *E. coli* pokazuje ImVic model +++ i klasirani su kao biotip I, dok preostale *E. coli* pokazuju ImVic model +-+ te su klasirane kao biotip 2 (1).

2.3. Serologija

Početnu shemu serotipiziranja razvio je Kaufman (2), a temelji na somatskim (O), flagelarnim (H) i kapsularnim (K) antigenima *E. coli*. Antigen O temelji na 0-specifičnom polisaharidu unutarnje membrane lipolisaharida stanice. Ovaj se površinski antigen nalazi u svim glatkim (S oblici) Enterobacteriaceama i termostabilan je (100°C x 2h). O antigeni, kojih je više od 170, čine temelj za klasificiranje *E. coli* u podskupine (1). H antigeni prema toplini labilni flagelarni antigeni sastavljeni od bjelančevina, od kojih je do sada identificirano 56. K antigeni, identificirani na temelju njihovog kemijskog sastava, su kiseli antigeni kapsularnog polisaharida, od kojih je poznato gotovo 80 različitih tipova.

Kada su prvi opisani kao uzročnici proljeva ljudi, izolirani su sojevi ETEC pripadali širokom nizu serotipova, ali uz rijetke iznimke nisu pripadali skupini enteropatogenih serotipova. Ipak su Orskov et al. (3) našli određenu učestalost nakupljanja serotipova kad su proučavali velik broj sojeva ETEC. Sada se predlaže da prisutnost nekih O i H (a nekada i K) antigena ukazuje na veliku vjerojatnost da je soj enterotoksičan (4). Najobičnije seroskupine

uključuju 06, 08, 015, 020, 025, 027, 063, 078, 080, 085, 0115, 0128ac, 0139, 0148, 0153, 0159 i 1067, iako su identificirane i druge sero skupine ETEC (5, 6). Zbog toga su gotovo svi 078:H11 i 078:H12 sojevi enterotoksigeni, dok su sojevi 078 bez tih specifičnih H antigena rijetko enterotoksigeni. Mnogi tipovi ETEC, kao 06:K15:H16, 078:H11, 078:H112 su rašireni širom svijeta, dok su drugi, kao 0159:H (Japan) i 0139:H28 (Brazil) do sada opisani samo u malobrojnim predjelima. Čini se da svako geografsko područje ima vlastiti jedinstven spektar serotipova i tipova enterotoksina (7).

2.4. Otpornost i antibiotska osjetljivost

Izvjestavalo se da su sojevi ETEC iz različitih dijelova svijeta neobično osjetljivi prema antibioticima. U jednom radu o rezervatu indijanskih Apača utvrđeno je da su svi izolati iz djece s proljevom bili osjetljivi na sve testirane antibiotike. Trideset posto drugih sojeva *E. coli* izoliranih iz djece na istom rezervatu bilo je rezistentno na četiri ili više antibiotika (8). Ipak, u drugim dijelovima svijeta, na primjer Tajlandu, Filipinima i Hondurasu često su izolirani prema antibioticima rezistentni ETEC sojevi (7). I humani (9, 10) i animalni (11) sojevi su nosili pojedine plasmide koji šifriraju i proizvodnju enterotoksina i otpornost prema antibiotiku.

3. Izoliranje i identificiranje

Ne postoji niti jedna metoda za otkrivanje *E. coli* iz hrane kao što je to slučaj s drugim patogenim bakterijama. Temperatura povišena od 44-45°C je obično metoda za selekciju mikroorganizama fekalne koliformne skupine čiji je član *E. coli*, između ostalih zastupljenih koliformnih bakterija. Analitički priručnik Uprave SAD za hranu i lijekove (BAM) /12/ preporuča kao korak oporavljanja oštećenih stanica 3 sata držanja pri 35°C u tekućem hranjivom supstratu moždane mase iza čega slijedi selektivno obogaćivanje u tekućem supstratu triptona tijekom 20 sati pri 44°C. Poslije obogaćivanja tekući se supstrat prelije na Levinov eozin-metilen modar i MacConkey agar. Tipične kolonije fermentiranja laktoze selekcioniraju se kao i netipične kolonije koje ne fermentiraju laktozu za daljnje karakteriziranje i identificiranje patogenih svojstava.

Jednom vjerojatne kolonije *E. coli* pronalaze se na selektivnom supstratu, a BAM preporuča slijedeće biokemijske pokuse za potvrdu: indol, MRVP, plin iz glukoze, citrat, citohrom oksidaza, malonat, laktoza, celobioza, KCN, lizin dekarboksilaza, arginin dihidrolaza, ornitin dekarboksilaza i Gram bojenje (12).

4. Otkrivanje enterotoksina

Ne postoje biokemijski označivači koji lako utvrđuju razliku između ETEC i ne-ETEC sojeva pa za te svrhe nema niti dostupnih selektivnih supstrata. Postoje ipak trgovački preparati polivalentnih antiseruma koji reagiraju s općim seroskupinama patogenih *E. coli*. Njihova vrijednost u identificiranju patogenih sojeva *E. coli* ograničena je zbog manje općih podskupina *E. coli* koje se nebi otkrile ovim antiserumima, a virulencija ne može uvijek biti u korelaciji s postojanjem specifičnih O i K antiseruma.

U standardnim testovima za STa, testiraju se filtrati sterilnih kultura kako bi se utvrdila njihova sposobnost da uvjetuju nakupljanje tekućine u utrobi mladog miša. Pokus nije prikladan za rutinske laboratorije, a sada su dostupne dvije alternative komercijalnih testova. *E. coli* ST, EIA komplet TD 700 (Oxoid Ltd.) testovi za dokazivanje STa, STa2 u kulturi filtrata primjenom konkretnog enzima imunopokusa koji uključuje sintetički toksin i monoklonalno antitijelo (13). SNAP^R komplet hibridiziranja (du Pont UK Ltd.) nabraja rast bakterija na filtrima u odnosu na postojanje gena koji kontroliraju proizvodnju STa. Sustavi koriste neradioaktivne reagencije. Povremeno se krivi rezultati postižu sa sojevima hibridima nesposobnim da proizvedu toksin koji se može otkriti (13).

Za standardni test ST_B testovi se pripremaju samo u malobrojnim laboratorijima. Kako istraživački pribor pripremljena DNA sonda, ali se ne može nabaviti u trgovini.

Standardni test za toksin LT odnedavno uključuje sterilne filtrate za uzgoj na stanicama izraslim na kulturi tkiva. Koriste se jajčane stanice ovarija kineskog hrčka ili općenitije adrenalne stanice YI miša (14). Dostupni su i imunološki testovi s antiserumima pripremljenim protiv LTI ili toksina kolere. To se može nabaviti u trgovačkoj mreži.

- (1) VET-RPLA test TD 920 (Oxoid Ltd.). Otkriva zastupljenost LTI u filtratima kulture pasivnom reverznom aglutinacijom senzibiliziranih lateks kuglica (15).
- (2) Phadebact ETEC-LT komplet (Pharmacia LKB Diagnostics) test za LTI koaguliranjem u preparatima proizvedenim privremeno isključivši rast bakterija na agar pločama u pribavljenom tekućem ekstratu (16).
- (3) Biken test (Institute Virion Ltd.) kojim valja analizirati skupine sojeva što rastu na specijalnom Biken agaru. U središnjoj su udubini smještena specifična antitijela protiv LTI. Crte precipitacije nastaju blizu onih kolonija koje su proizvele LTI (17).

- (4) Komplet hibridiziranja SNARP (du Pont UK Ltd.) analizira rast bakterija na filtrima i zastupljenost gena što kontroliraju proizvodnju LTI. Sustav koristi neradioaktivne reagencije.

5. *Pojavljivanje: mlijeko i mliječni proizvodi*

Kako je zastupljenost ETEC sojeva značajnije vezana sa zemljama u razvoju i ljudima iz tih krajeva oni su glavno sabiralište ETEC sojeva (18), a podataka o ETEC sojevima u mlijeku i mliječnim proizvodima nema mnogo. Valja naglasiti da mnoge mlade životinje (telad i prasad) također boluju od teških proljeva izazvanih s ETEC, iako normalno različitim sterotipovima pa možda postoji veza između humanih i animalnih sojeva *E. coli* ili plasmida koje oni nose. *Echeverria et al.* (19) su referirali o izoliranju serotipa 078:H12 iz svinje koja je prethodno okrivljena kao uzročnik proljeva ljudi i tako postoji mogućnost da enterotoksigena infekcije *E. coli* mogu izazvati životinje.

Glatz i Brudvig (20) su u SAD analizirali 78 uzoraka sira iz trgovačke mreže, izolirali 136 sojeva *E. coli*, a niti jedan nije proizvodio enteroksin.

Franke et al. (21) kontrolirajući mlijeko i mliječne proizvode u Njemačkoj između 77 izolata *E. coli* otkrili su četiri soja ETEC iz sira Camembert i jedan soja ETEC iz jogurta. Niti jedan od 76 sojeva *E. coli* izoliranih iz mlijeka i drugih mliječnih proizvoda nije proizvodio enterotoksin. A jedno trovanje hranom propisano ETEC bilo je povezano s konzumiranjem francuskog sira Brie, a oboljelo je 169 ljudi, ali izvor kontaminiranja nije određen u tvornici (22).

6. *Patogenost za čovjeka*

Mehanizmi patogenosti: kako bi došlo do proljeva domaćinu valja ispuniti uvjete:

- (1) soj mora biti toksigen, odnosno nositi plamid koji kodira LT i/ili ST toksin;
- (2) domaćin mora progutati dovoljan broj stanica izazivača bolesti. Navodi se da bi bilo potrebno 10⁶ ili više stanica (23). U jednom radu s ljudima, dobrovoljcima, infektivne su doze sojeva ETEC potrebnih da izazovu proljev bile između 10⁸ i 10¹⁰ stanica (24);
- (3) mikroorganizam mora dodirivati mukoza tankog crijeva, pokazati činitelje koji dozvoljavaju mikroorganizmu da se priljubi na tanko crijevo ljudi dozvoljavajući im da savladaju mehanizam peristaltičke

obrane tankog crijeva i da se nasele na mukoznoj površini epitelnih stanica. Da bi se mogao nastaniti na sluzavoj površini mikroorganizam mora imati vezivne činioce koji su ne-flageralne, filamentozna potencijalne nazubljene membrane. Gaastra i de Graaf (25) izvješćuju da su mnogi ETEC nitasti, adhezivni činioci identificirani i svaki se razlikuje kemijski, fizički i antigeno. Ovi činioci dobro su vezani uz specifičnog domaćina, pa se čini da sojevi ETEC koji nastanjuju životinje ne nastanjuju se u ljudima i obratno.

Simptomi: Kliničke pojave ETEC infekcija su vodenast proljev, mučnina, grčevi u abdomenu i slaba groznica, koji su posljedica dehidriranja i acidoze izazvane pretjeranim gubitkom tekućine i elektrolita (5). Trajanje bolesti je od 3 do 19 dana, a simptomi se pojavljuju unutar 8 do 44 sata.

7. Epidemiologija

Nema sumnje o tome da je u zemljama u razvoju ETEC znatan uzročnik proljeva svih skupina u zemljama (predjelima) loših higijenskih uvjeta, naročito u tropima gdje je učestalost izoliranja ETEC između 10 i 70% radilo se o djeci ili odraslima koji boluju od proljeva (26).

ETEC je glavni uzročnik dječjeg proljeva u manje razvijenim zemljama u kojima izvješća o djeci očekuju česti nadzor u kući, u kojima se napominje, da djeca mogu tijekom prve 2 do 3 godine života pretrpjeti dvije do tri kliničke infekcije po djetetu godišnje (27). ETEC je također najčešći uzročnik proljeva putnika. Proučavanja prevedena u Hondurasu, Keniji, Meksiku i Maroku ukazuju da je ETEC izazvao 60-70% proljeva putnika iz industrijskih zemalja (WHO). Taylor i Echeverria (26) izvješćuju o proljevima putnika u Aziji među dobrovoljcima Mirovnih snaga u Tajlandu, japanskim putnicima i stranim stanovnicima u Bangladešu, gostima u hotelima te članovima različitih skupina. Obim napada proljeva od >50% tijekom 4-6 tjedana navodi se za te skupine, a sojevi ETEC su bili najčešće izolirani patogeni (20-34%) među tim od proljeva oboljelim putnicima.

Opći su pregledi pokazali da ETS nisu opći uzrok sporadičkog endemičnog proljeva u zemljama u razvoju gdje zadovoljava higijenski standard. Proučavanje u SAD, Kanadi, Švedskoj, Britaniji i Švicarskoj pokazala su da ETEC nisu bili opći uzrok domaćeg sporadičnog proljeva (26). Ipak, bilo je izvješća o dječjem epidemičnom proljevu izazovnom s ETEC u razvijenim zemljama u Glasgovu (29), SAD (30) i Engleskoj (31). Ovi su se nastupi pojavili u bolničkim dječjim sobama.

Sojevi ETEC mogu povremeno izazvati infekcije hranom. Rosenberget al. (32) su referirali o jednom trovanju u SAD gdje je 2000 ljudi oboljelo pijući vodu kontaminiranu blatom iz kanala. Kudoh et al. (33) pisali su o dva trovanja izazvana kontaminiranom vodom i dva koja je uzrokovala infekcije hranom u Japanu. Riordan et al. (34) navode pojavu proljeva izazvanu s ETEC iako je povod trovanja bilo konzumiranje majoneze pure u jednoj školi Engleskoj.

8. Verotoksin koji proizvodi i *ESCHERICHIA COLI* (VTEC)

Sojeve *Escherichia coli* koji proizvode jak citotoksin, aktivan prema stanicama prvi su opisali Konowalchuk et al. (36), a *E. coli* 0157:H7 konačno je identificirana kao patogen 1982. što je uslijedilo poslije dva trovanja hranom uslijed neobičnog gastrointestinalnog oboljenja. Obe su pojave oboljenja izazvane sendvičima pripremljenim u restoranima iste firme od mljevene govedine. *E. coli* 0157:H7 izolirana je iz zamrznutog sirovog goveđeg mesa u obliku male paštete iz iste mase mesa upletene u jedno od trovanja (37, 38). Ovaj se serotip sada smatra glavnim uzročnikom trovanja hranom, a izvještavalo se o mnogim trovanjima povezanim više s mesom, a manje sa sirovim mlijekom u UK, Kanadi i SAD (38-41). *E. coli* 0157:H7 nije serotip ranije prepoznat kao uzročnik krvavog proljeva (hemoradički kolitis), prestanka rada bubrega (hemoragičan sindrom trovanja mokraćom) ljudi. Drugi sojevi *E. coli* (VTEC) koji proizvode verotoksin, na primjer 026:H11, povezivali su se s hemoragičnim kolitisom i hemolitičkim sindromom trovanja s mokraćom (5, 42), ali danas se s pojavom bolesti izazvanom hranom povezuje samo serotip 0157:H7 te je identeficiran kao najčešći uzročnik oboljenja vezanih s VTEC.

Bolest izazvana s *E. coli* 0157:H7 obično je žestoka i javlja se kao tri različita tipa, odnosno, kao trombotička trombocitopena crvenila (TTP), hemolitički sindrom uremije (HUS) i krvavi kolotis (44, 45).

Tipovi vrsta hrane iz koje su mikroorganizmi izolirani uključuju svinjske odreske, svinjsku butinu, svinjski pečeni odrezak, pečenu govedinu, batak pilića, srnetinu i nepasterizirano mlijeko (46). Osnovna hrana nosač upleten u izbijanju trovanja hranom s *E. coli* 0157:H7 bilo je mljeveno goveđe meso, a dokazi upućuju da to meso većinom nije bilo dovoljno kuhano (38, 44, 47, 48). I sirovo je mlijeko također bilo uključeno kao prijenosnik infekcije u pojavama HUS male djece koja piju mlijeko proizvedeno na farmama njihovih obitelji (39). O vodi se također govori kao o prenosiocu infekcije s jedne osobe na drugu (46, 49, 50).

Kao spremište *E. coli* 0157:H7 (39, 51-53) mnogi znanstveni radnici navode stada muzara, naročito mladih životinja u stadu. Mikroorganizmi su također izolirani iz fecesa teladi i junica s *E. coli* bacilozom (52). Da li su stada goveda jedino spremište *E. coli* 0157:H7, a ne zna se da li se druga hrana, koja nije govedina i mlijeko, kontaminira za prerade i baratanja s njom te da li su i druge životinje proizvođači hrane nosači mikroorganizama. Međutim, kako je mikroorganizam izoliran iz janjadi, prasadi i srna, a moguće i iz svinje, ovce i jelena i oni mogu također biti nosači (46).

Izolati većine biokemijskih reakcija *E. coli* 0157:H7 su tipične *E. coli* osim što *E. coli* 0157:H7 ne fermentira sorbitol (37) i nedostaje joj aktivnost glukuronidaze i zbog toga je negativni MUG pokus što se koristi za brzo fluorogeno analiziranje za *E. coli* (54). Mikroorganizam raste također, ali vrlo slabo, pri 44-45°C i ne raste unutar 48 sati pri 10 ili 45,5°C. Mnogi postupci za otkrivanje fakalnih koliforma i kasnije *E. coli* u hrani koriste kao temperature inkubacije 44-45°C, zbog toga se i tradicionalnim metodama za izoliranje *E. coli* iz hrane vjerojatno ne bi otkrilo *E. coli* 0157:H7 (45).

Kako je probavni trakt goveda, a možda i drugih životinja za hranu važan izvor *E. coli* 0157:H7, valja uključiti kontrolne mjere za priječenje infekcija s *E. coli* 0157:H7, dobre postupke u praksi proizvodnje i prerade hrane animalnog porijekla kako bi se izbjegao dodir s fekalijama tijekom klanja ili mužnje te spriječila fekalna kontaminacija tijekom ponovnog dobivanja i prerade te hrane. Taj mikroorganizam nije neobično otporan prema toplini i stvarno je osjetljiviji prema toplini od izolata *Salmonella* - zbog toga je potrebno adekvatno zagrijavanje te hrane, jer konzumiranje sirovog ili djelomično kuhanog mesa, peradi te sirovog mlijeka može predstavljati ozbiljnu opasnost infekcije.

9. Terapija

Radna skupina WHO (18) izvještava da je dociklin bio učinkovit 85-90% u kratkotrajnoj (tri tjedna) profilaksi putničkog proljeva u Keniji i Maroku. U tim je područjima ETEC bio općenito osjetljiv na lijek. Proučavanja nisu bila poduzimana u područjima za koja se zna da je ETEC često rezistentan prema antibiotiku. M e r s o n et al. (35) su koristili tretaciklin u liječenju infekcija s ETEC odraslih u Bangladešu, te izvjestili da je procjenom 63 slučaja, liječenje uvjetovalo nešto raniji završetak bolesti pacijenata s LT-ST sojevima, ali nije djelovalo na bolest pacijenata s ST sojevima. U obadvije skupine bolesnika tretaciklin je skratio trajanje

izlučivanja mikroorganizama, ali zbog njegove ograničene učinkovitosti i općenito izvrsnog reagiranja proljeva izazvanog s ETEC na samu terapiju i ponovnog davanja vode upotreba tetraciklina nije bila opravdana u liječenju proljeva starije populacije izazvanih s ETEC.

Literatura

- 1 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. I. N.R. Krieg & J.G. Holt (Editors), Williams and Wilkins, Baltimore, London, Los Angeles and Sydney (1984).
- 2 Kaufman, F. The serology of the coli group *J. Immunol.* 57:71-100 (1947).
- 3 Orskov, F., Orskov, I., Evans, D.J., Jr., Sack, R.B. & Sack, D.A., Special E. coli serotypes among enterotoxigenic strains from diarrhoea in adults and children. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 162: 73-80 (1976).
- 4 Orskov, I. & Orskov, F. Special O:K:H serotypes among enterotoxigenic E. coli strains from diarrhoea in adults and children. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 163: 99-110 (1977).
- 5 Levine, M.M. Escherichia coli that cause diarrhoea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Entero-invasive, Enterohaemorrhagic and Enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155: 377-389 (1987).
- 6 Robins-Brown, R.M. Traditional enteropathogenic Escherichia coli of infantile diarrhoea. *Rev. Infect. Dis.* 9: 28-53 (1987).
- 7 Sack, R.B. Enterotoxigenic Escherichia coli: Identification and characterization. *J. Infect. Dis.* 142: 279-286 (1980).
- 8 Woodward, W.E., Hirschhorn, N., Sack, R.B., Cash, R.A., Browlee, I., Chickadonz, G.H., Evans, L.K., Shepard, R.H. & Woodward, R.C. Acute diarrhoea on an Apache Indian reservation. *Am. J. Epidemiol.* 99: 281-290 (1974).
- 9 Scotland, S.M., Gross, R.J., Cheasty, T. & Rowe, B. The occurrence of plasmids carrying genes for both enterotoxin production and drug resistance in Escherichia coli of human origin. *J. Hyg. (Camb.)* 83: 534-538 (1979).
- 10 Echeverria, P. & Murphy, J.R. Enterotoxigenic Escherichia coli carrying plasmids coding for antibiotic resistance and enterotoxin production. *J. Infect. Dis.* 142: 273-278 (1980).
- 11 Glyles, G.L., Palchaudhuri, S. & Maas, W.K. Naturally occurring plasmid carrying genes for enterotoxin production and drug resistance. *Science* 198: 198-199 (1977).
- 12 Mehlman, I.J. & Lovett, J. FDA Bacteriological Analytical Manual, 6th edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA (1984).
- 13 Scotland, S., Willshaw, G.A., Said, B., Smith, H.R. & Row, B. Identification of Escherichia coli that produce heat stable enterotoxin STA by a commercially available enzyme-linked immunoassay and comparison of the assay with infant mouse and DNA profile tests. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1697-1699 (1989).
- 14 Scotland, S.M., Gross, R.J. & Rowe, B. Laboratory tests for enterotoxin production, enteroinvasion and adhesion in diarrhoeagenic Escherichia coli. In: M. Sussman (Editor), *The Virulence of Escherichia coli: Reviews and Methods.* Academic Press, London pp. 395-405 (1985).

- 15 Scotland, S., Flomer, R.H. & Rowe, B. Evaluation of a reversed passive latex agglutination test for the detection of *Escherichia coli* heat-labile toxin culture supernatant. *J. Clin. Microbiol.* 27: 339-340 (1989).
- 16 Chapman, P.A. & Daly, C.M. Comparison of YI mouse adrenal cell and coagglutination assays for the detection of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *J. Clin. Pathol.* 42: 755-768 (1989).
- 17 Honda T., Arita, M., Takeda, Y. & Miwatani, T. Further evaluation of the biker test (Modified Flek Test) for the detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* producing heat labile enterotoxin and application of the test to sampling of heat labile enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 16: 60-62 (1982).
- 18 WHO Scientific Working Group. *Escherichia coli* diarrhoea. *Bull. World Health Org.* 58: 23-36 (1980).
- 19 Echeverria, P., Verhaert, L., Basaca-Sevilla, V., Banson, T., Cross, J., Orskov, F. & Orskov, I. Search for heat labile enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans, livestock, food, water in a community in the Philippines. *J. Infect. Dis.* 138: 87-90 (1978).
- 20 Glatz, B. & Brudvig, S. Survey of commercially available cheese for enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 43: 395-398 (1980).
- 21 Franke, V., Hahn, G. & Tolle, A. Incidence and identification of enterotoxigenic *E. coli* strains in milk and milk products. *Zbl. Bakt. Hyg.* 257: 51-59 (1984).
- 22 MacDonald, K.L., Eidson, M., Strohmeyer, C., Levy, M.E., Wells, J.G., Puh, N.D., Wachsmith, K., Hargrett, N.T. & Cohen, M.L. A multistate outbreak of gastrointestinal illness caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in imported soft cheese. *J. Infect. Dis.* 151: 716-720 (1985).
- 23 Doyle, M.P. & Cliver, D.O. *Escherichia coli* In: D.O. Cliver (Editor), *Foodborne Diseases*. Academic Press, Inc., London, pp. 209-215 (1990).
- 24 duPont, H., Formal, S.B., Hornick, R.B., Snyder, M.J., Libonati, J.P., Sheahan, D.G., LaBrec, E.H. & Kalas, M.D. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhoea. *N. Engl. J. Med.* 285: 1-9 (1971).
- 25 Gaastra, W. & de Graaf, F.K. Host-specific fimbrial adhesions of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiol. Rev.* 46: 129-161 (1982).
- 26 Gross, R.J. & Rowe, B. *Escherichia coli* diarrhoea. *J. Hyg., Camb.* 95: 531-550 (1985).
- 27 Black, R.E., Brown, K.H., Becher, S., Abdul Alion AR. M. & Huq, I. Longitudinal studies of infectious diseases and physical growth of children in rural Bangladesh. *Am. J. Epidemiol.* 115: 315-323 (1982).
- 28 Taylor, D.N. & Echeverria, P. Etiology and epidemiology of traveller's diarrhoea in Asia. *Rev. Infect. Dis.* 8, Suppl. 2: 5136-5141 (1986).
29. Gross, R.J., Rowe, B. & Scotland, S.M. Enterotoxin testing of *Escherichia coli* causing epidemic infantile enteritis in the U.K. *Lancet* 1: 629-631 (1976).
- 30 Ryder, R.W., Wachsmith, I.K., Buxton, A.E., Evans, A.G., duPont, H.L., Mason, E. & Barret, F.F. Infantile diarrhoea produced by heat-stable enterotoxigenic *Escherichia coli*. *N. Engl. J. Med.* 295: 849-853 (1976).
- 31 Rowe, B., Gross, R.J., Scotland, S.M., Wright, A.E., Shillom, G.N. & Hunter, N.J. An outbreak of infantile enteritis caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* 06H16. *J. Clin. Pathol.* 31: 217-219 (1978).

- 32 Rosenberg, M.L., Koplan, J.P., Wachsmith, I.K., Wells, J.G., Gangarosa, E.J., Guerrant, R.L. & Sack, D.A. Epidemic diarrhoea at Crater Lake from enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Ann. Int. Med.* 86: 714-718 (1977).
- 33 Kudoh, Y., Zen-Yoji, H., Matsushita, S., Sakai, S. & Maruyama, T. Outbreaks of acute enteritis due to heat-stable enterotoxin-producing strains of *Escherichia coli*, *Microbiol. Immunol.* 21: 175-178 (1977).
- 34 Riordan, T., Gross, R.J., Rowe, B., Scotland, S.M. & Johnston, S.M. An outbreak of foodborne enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea in England. *J. Infect.* 11: 167-171 (1985).
- 35 Merson, M.H., Sack, R.B., Islam, S., Saklayer, G., Huda, N., Huq, I., Zulich, A.W., Yolken, R.H. & Kapikian, A.Z. Disease due to enterotoxigenic *Escherichia coli* in Bangladeshi adults: Clinical aspects and a controlled trial to tetracycline. *J. Infect. Dis.* 141: 702711 (1980).
- 36 Konowalchuk, J., Speirs, J.L. & Stavric, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18: 705-712 (1977).
- 37 Wells, J.G., Davis, B.R., Wachsmith, I.K., Riley, L.W., Sokow, R. & Morris, G.K. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreak associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J. Clin. Microbiol.* 18: 512-520 (1983).
- 38 Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D. & McGee, H.B. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308: 681-685 (1983).
- 39 Martin, M.L., Shipman, L.D., Wells, J.G., Potter, M.E., Hodberg, K., Wachsmith, I.K., Tauxe, R.V., Davis, J.P., Arnolai, J. & Tilleli, J. Isolation of *Escherichia coli* 0157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic-uremic syndrome. *Lancet* 11: 1043 (1986).
- 40 Carter, A.D., Borczyk, A.A., Carlson, J.A.K., Harey, B., Hockin, J.C., Karmali, M.A., Krishnan, C., Korn, D.A. & Lior, H. A severe outbreak of *Escherichia coli* 0157:H7 - associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *N. Engl. J. Med.* 317: 1496-1500 (1987).
- 41 Anonymous. Outbreak of gastrointestinal disease in Sarnia, Ontario. *Ontario Dis. Surveillance Rep.* 7: 604-611 (1986).
- 42 Levin, M.M. Xu, J.G., Kaper, J.B., Lior, H., Prado, V., Tall, B., Nataro, J., Karch, H. & Wachsmith, K.A. DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* 156: 175-182 (1987).
- 43 Scotland, S.M., Rowe, B., Smith, H.R., Willshaw, G.A. & Gross, R.J. Verotoxin-producing strains of *Escherichia coli* from children with haemolytic uremic syndrome and their detection by specific DNA probes. *J. Med. Microbiol.* 25: 237-243 (1988).
- 44 Griffin, P.M., Ostroff, S.M., Tauxe, R.V., Greene, K.D., Wills, J.G., Lewis, J.H. & Blake, P.A. Illnesses associated with *Escherichia coli* 0157:H7 infections. *Ann. Intern. Med.* 109: 705-712 (1988).
- 45 Doyle, M.P. & Padhye, V.V. *Escherichia coli*. In: M.P. Doyle (Editor), *Foodborne Bacterial Pathogenes*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 235-281 (1989).
- 46 Doyle, M.P. *Escherichia coli* 0157-H7 and its significance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 12: 289-302 (1991).

- 47 Ryan, C.A., Tanue, R.V., Hosek, G.W., Wells, J.G., Stoesz, P.A., McFadden, H.W. Smith, P.W., Wright, G.F. & Blake, P.A. Escherichia coli 0157:H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological and pathological findings. *J. Infect. Dis.* 154: 631-638 (1986).
- 48 Belongia, E.A., MacDonals, K.L., White, K.E., Corlach, J.A., Lobato, M. & Osterholm, M.T. Outbreak of Escherichia coli 0157:H7 colitis associated with precooked hamburgers. *Asts. 29th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy No. 1011*: 273 (1989).
- 49 McGowan, K.L., Wickersham, E. & Strockbine N.A. Escherichia coli 0157:H7 from water. *Lancet* 1: 967-868 (1989).
- 50 Spika, J.S., Parsons, J.E., Nordenberg, D., Wells, J.G., Gunn, R.A. & Blake. P.A. Hemolytic uremic syndrome and diarrhoea associated with Escherichia coli 0157:H7 in a day care centre. *J. Pediatr* 109: 289-291 (1986).
- 51 Chapman, P.A. Wright, D.J. & Norman, P. Verotoxin-producing Escherichia coli infections in Sheffield: cattle as a possible source. *Epidemiol. Inf.* 102: 439-455 (1989).
- 52 Orskov, F., Orskov, I. & Villar, J.A. Cattle as reservoir of verotoxin-producing Escherichia coli 0157:H7. *Lancet* 11 11: 276 (1987).
- 53 Borczyk, A.A., Karmali, M.A., Lior, H. & Duncan, L.M.C. Bovine reservoir for verotoxin producing Escherichia coli 0157:H7. *Lancet* 1: 98 (1987).
- 54 Feng, P.C.S. & Hartman, P.A. Fluorogenic assays for the immediate confirmation of E. coli. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1320-1329 (1982).