

# Shiga toksin enteroagregacijska *Escherichia coli* O104:H4 – emergentni serotip

**Boško DESNICA, prim., dr. med.,  
specijalist infektolog**

Zavod za gastrointestinalne infekcije  
Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran  
Mihaljević", Zagreb

## Ključne riječi

*Shiga toksin*  
*enterohemoragijska Escherichia coli*  
*enteroagregacijska Escherichia coli*  
*serotip O157:H7*  
*serotip O104:H4*

## Key words

*Shiga toxin*  
*enterohemorrhagic Escherichia coli*  
*enteroaggregative Escherichia coli*  
*serotype O157: H7*  
*serotype O104: H4*

**Primljeno:** 2011–12–08

**Received:** 2011–12–08

**Prihvaćeno:** 2011–12–20

**Accepted:** 2011–12–20

Pregledni članak

Tijekom epidemije Shiga toksin producirajuće *Escherichia coli* (STEC) serotipa O104:H4 u Njemačkoj 2011. god. oboljelo je 4500 bolesnika, s učestalošću hemolitičko uremičkog sindroma od preko 20 %. Izolirani soj do tada rijedak u ljudi pripada enteroagregacijskom patotipu *E. coli*, ali s čimbenicima virulencije enterohemoragijskog patotipa te ekstraintestinalnog patotipa *E. coli*. Analiza genoma pretpostavlja mogućnost horizontalnog genskog transfera između EHEC i EAEC. Kombinacije male infekcijske doze, izrazito citotoksičnog toksina ST 2a su dovele do visokog postotka tromboangiopatskih komplikacija. Epidemiološka istraživanja ukazuju na povezanost epidemije s uvozom kontaminiranog sjemena iz Afrike.

## Shiga toxin enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 – an emerging serotype

Review article

During the outbreak of Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* (STEC), serotype O104: H4 in Germany in 2011, up to 4500 patients were affected, with the incidence of hemolytic uremic syndrome of over 20 %. Isolated strain, previously rare in humans, belongs to enteroaggregative pathotypes of *E. coli*, but with the virulence factors congruent with pathotypes of enterohemorrhagic and enteroaggregative *E. coli*. Genome analysis implies the possibility of horizontal gene transfer between EHEC and EAEC. Combinations of low infectious dose, highly cytotoxic toxins ST 2a led to a high percentage of thromboangyopathic complications. Epidemiology studies suggest an association of the outbreak with contaminated seeds imported from Africa.

## Uvod

*Escherichia coli* je prvi puta izolirana 1885. god. kao crijevni saprofit u čovjeka i u velikom broju životinjskih vrsta. Neki su sojevi stekli čimbenike virulencije koji uzrokuju važne intestinalne i ekstraintestinalne bolesti kao enterokolitis, hemoragični kolitis, hemolitičko uremički sindrom, infekcije mokraćnih puteva, sepsu i novorođenački meningitis.

Postoji pet vrsta *E. coli* koji uzrokuju intestinalne bolesti: tipična enteropatogena *E. coli* (tEPEC), enteroinvazivna *E. coli* (EIEC), enterotoksikogena *E. coli* (ETEC), Shiga toksin verotoksin producirajuća *E. coli* (STEC/VTEC) i enteroagregacijska *E. coli* (EAEC). Dvojbena je da li u ovu grupu intestinalnih patogena uključiti i adherentno-invazivnu *E. coli* (AIEC) jer njezina moguća uloga u patogenezi Crohnove bolesti nije još definitivno potvrđena. Svi ostali sojevi koji uzrokuju ek-

straintestinalne infekcije pripadaju grupi ekstraintestinalnih patogena *E. coli* (ExPEC) [1, 2, 4].

Dijagnostika patogenih sojeva *E. coli* je zasnovana na serotipizaciji i genetskim metodama (PCR, MLST, PFGE). Određivanje O:H serotipova i gena virulencije je ključno u identifikaciji patogenog potencijala pojedinog soja, no ograničen broj referalnih laboratorija raspolaže sa svim O (O1–O185) i H (H1–H56) serumima potrebnim za potpunu serotipizaciju. Pulsna gel elektroforeza (PFGE) omogućava identifikaciju epidemiološki povezanih izolata unutar O:H serotipova. Multisekvencijalnim tipiziranjem (MLST) se određuje sedam bakterijskih gena te se može pouzdano odrediti genetska srodnost u epidemiološki inače nepovezanim izolatima [3, 4, 7].

Genom svih sojeva *E. coli* se sastoji od 4200 – 5500 gena s oko 2200 zajedničkih tzv. gena jezgre. Stalni protok gena između sojeva *E. coli* je rezultat uglavnom horizontalnih transfera i povremenih delecija. Genska pri-

lagodljivost omogućava *E. coli* adaptaciju na različite uvjete u okolišu, kombinacije koje rezultiraju fenotipskom divergencijom, ali i pojavu novih hipervirulentnih sojeva koji nose gene virulencije i rezistencije što se do sada u klasičnim patogenim sojevima *E. coli* nije događalo [5, 8, 9].

Sojevi *E. coli* koji izlučuju Shiga toksin (verotoksin) ili enterohemoragijske *E. coli* su važan uzročnik alimentarnih toksoinfekcija i teških i potencijalno letalnih bolesti kao što su hemoragični kolitis i hemolitičko uremički sindrom. STEC/VTEC izlučuju dva moćna citotoksina Stx1/VT1 i Stx2/VT2. STEC obično uz citotoksine imaju i druge čimbenike virulencije, od kojih je najvažniji intimin odgovoran za adheziju bakterije na enterocit. Intiminskom ekspresijom upravlja gen *eae* i u do sada poznatim enterohemoragičnim serotipovima (O157:H7, O26:H11) koji su uzrokovali relevantne epidemije i predstavljali javno-zdravstveni problem uvijek je bila potvrđena nazočnost *eae* gena [1, 10, 11].

## Osvrt

No, u epidemiji O104:H4 prošle godine genotipizacijom soja je postalo razvidno da je nedostatak *eae* gena i posljedično intimina, kompenziran s pozitivnim AAF/1 (agregacijsko adherentnim fimbrija I) faktorom. Slični sojevi STEC O104:H21 i O113:H21 su izolirani u epidemijama 1996. i 2002. u SAD i Australiji. Do sada su svi sojevi *E. coli* koji produciraju ST/VT, a ne pripadaju klasičnom enterohemoragijskom soju O157:H7 klasificirani kao non-O157:H7. Prvi izolati datiraju iz 1975., a u Francuskoj i Kaliforniji su dokazani u bolesnika s hemoragičnim kolitisom [1, 12].

Incidencija O157 i non-O157 infekcija u SAD-u je 1,19 i 0,59/100 000 stanovnika, u EU 1,1 i 0,6/100 000 stanovnika. Oko 70 % STEC infekcija u SAD-u i oko 50 % u EU je uzrokovano serotipom O157:H7. Međutim, meta-analize laboratorijskih postupaka u detekciji stolice kod bolesnika s hemoragičnim kolitisom pokazuju da se u 95 % laboratorija stolica kultivira na O157:H7, a tek u 3 % se određuje Shiga toksin ili PCR kojim se identificira non O157:H7 serotip. Podaci iz različitih zemalja jasno ukazuju da je broj sporadičnih non-O157 slučajeva znatno veći nego broj u epidemijama. Isto tako se čini da je interhumani prijenos češći nego kod O157 [11, 13].

Ono što je zajedničko svim enterohemoragijskim *E. coli* je da su preživači glavni rezervoar, što je i logično jer dugo zadržavanje hrane u probavnom traktu pogoduje horizontalnom prijenosu genskog materijala između raznih sojeva *E. coli*. STEC sojevi su izolirani iz goveda, ovaca, koza, jelena i drugih domaćih i divljih životinja. STEC je izolirana i iz mesojeda, no vjerojatno se radi o prolaznom kliconoštvu stečenom konzumacijom kontaminirane vode ili hrane. Goveda su najvažniji izvor infekcije u ljudi (meso, mliječni proizvodi, fekalna kontami-

nacija). Ona nose različite serotipove *E. coli*, komezale i patogene. STEC nije patogen za odrasle preživace osim što kod goveda može biti uzrokom neonatalne dijareje teladi. Prevalencija STEC je izrazito varijabilna u goveda (0,4 – 74 %). Vjerojatan izvor infekcije je kontaminacija hrane i/ili vode fecesom zaraženih životinja. STEC O26 može preživjeti u gnoju 3 – 4 mjeseca, a na polju nagnenom stajskim gnojem i do godinu dana. Fekalije mogu kontaminirati meso tijekom klanja, biti isprane u izvor vode, kontaminirati voće i povrće tijekom gnojenja ili natapanja. Čovjek se dakle zarazi direktno u kontaktu sa životinjom ili indirektno kroz okoliš, hranu, vodu za piće ili u dodiru s vodom kontaminiranom fekalnim materijalom koji sadrži STEC [14, 15, 16].

U svibnju 2011. Njemačka je proglasila epidemiju hemolitičko uremičkog sindroma uzrokovanu STEC serotipa O104:H4. U periodu od početka svibnja do srpnja prijavljena su 852 bolesnika s hemolitičko uremičkim sindromom i 3469 s enterokolitisom, a u drugim zemljama 49 bolesnika s hemolitičko uremičkim sindromom i 76 s enterokolitisom. U epidemiji je umrlo 50 bolesnika. Izolacijom uzročnika potvrđeno je da se radi o STEC soju koji pripada serotipu O104:H4 sa čimbenicima virulencije tipičnima za enteroagregacijsku *E. coli*, ali i s nekoliko čimbenika virulencije tipičnim za ekstraintestinalnu patogenu *E. coli* (ExPEC) uključujući i stečenu rezistenciju na brojne antibiotike. Soj je izlučivao TEM-1 i CTX-M-15 beta laktamazu i bio rezistentan na ampicilin, koamoksiklav, piperacilin/sulbaktam, piperacilin/tazobaktam, cefuroksim, cefotaksim, ceftazidim, cefopodoksim, streptomycin, nalidiksičnu kiselinu, tetraciklin i trimetoprim/sulfametoksazol. Posjedovao je gene virulencije tipične za STEC/VTEC/EHEC: shigatoksin 2a, LPF STEC O26, sve tipične za EAEC, te *irp2*, *iha*, *aer* tipične za ExPEC [9, 13, 17, 18].

Epidemiološka istraživanja su konačno dovela do hipoteze da je izvor epidemije konzumacija klica fenu-greeka sa farmi za zdravu hranu, iako iz analiziranih sjemenki, uvezenih iz Egipta nije izolirana O104:H4 [19]. Analizom literature jasno je uočljiva povezanost između STEC epidemija i konzumacije kontaminiranog povrća, osobito raznih klica i zelene salate. Najveća STEC O157:H7 epidemija do danas se dogodila u Osaki (Sakai) 1996. nakon konzumacije klica rotkvice s više od 8 000 oboljelih [20]. Klasični soj EAEC ONT:H10 je 1993. bio uzročnikom velike epidemije s više od 2000 oboljelih također u Japanu nakon konzumacije svježih klica [21]. Za sada je još uvijek nejasno radi čega je letalitet kao i udio bolesnika s hemolitičko uremičkim sindromom bio tako visok u ovoj epidemiji.

Više od 80 % oboljelih su bili stariji od 17 godina, a 65 % oboljelih su bili ženskog spola. Kliničke osobitosti su bile visoka učestalost hemolitičko uremičkog sindroma (gotovo 25 %), s latentnim periodom između dijarealne bolesti i HUS-a od 7 dana. Bolesnici su bili većinom

afebrilni (83 %), bez abdominalnih kolika, a prezentirali su se kao dijarealna bolest s dizenteričkim stolicama u 91 % slučajeva. Leukocitoza (više od 10 000/μL) je zabilježena u 71 % oboljelih [13, 17, 22].

Do danas je epidemija STEC/EAAC O104:H4 u Njemačkoj najveća po broju bolesnika.

## Preporuke

Što se tiče općih preporuka i zaključaka nužno je na prvom mjestu informirati opću populaciju o rizicima povezanim s nepravilnim pripremanjem i rukovanjem hranom. Meso, osobito mljeveno mora biti adekvatno termički obrađeno. Sve osobe koje rukuju s hranom moraju redovito i temeljito prati ruke prije i nakon svakog kontakta s obrokom. Pravilno pohranjivanje u hladnjaku radi izbjegavanja curenja mesa ili ribe na povrće. Povrće koje se jede sirovo ili u salati mora biti temeljito oprano. Jedino pasteurizirano mlijeko se može smatrati sigurnim za uporabu. Razumno je svježe klice smatrati hranom visokog rizika jer vlažni okoliš u kojem rastu predstavlja idealne uvjete za razmnožavanje bakterija kojima mogu biti kontaminirane.

Serotip O104:H4 vrlo je rijedak i do sada je zabilježeno samo nekoliko slučajeva bolesti u ljudi. Izolirani soj pokazuje kombinaciju čimbenika virulencije STEC/VTEC i enteroagregacijske *E. coli*. Komparacijom potpunog slijeda genoma izolata iz epidemije u Njemačkoj i izolata EAEC iz Afrike čini se da je afrički soj akvirirao gene za kodiranje Stx2a toksina i gena za antibiotsku rezistenciju [6].

Dijagnostika enterohemoragičnih *E. coli* počiva na izolaciji uzročnika na Hep-2 kulturi stanica, CVD432 DNA analizi (osjetljivost 89 %, specifičnost 99 %), određivanju ST/VT ELISA metodom. Serotipizacija može biti otežana radi autoaglutinacije samih bakterija.

Antimikrobna terapija nije indicirana, temeljem iskustva ostaje liječenje dijarealne bolesti nadoknadom tekućine i korekcijom elektrolita, kod bolesnika s hemolitičkom uremičkom sindromom plazmafereza uz suportivno liječenje intenzivnog tipa. Ako je antimikrobna terapija empirijski započeta treba je odmah ukinuti. Terapija antimotilitetnim agensima usporava migratorne motorne komplekse i olakšava adherenciju *E. coli* na receptorska mjesta na enterocitima.

## Zaključak

Epidemiološki nadzor nad STEC sojevima (ne samo O157:H7) se mora pojačati s fokusom na dokazivanje Shiga toksina i u sporadičnim slučajevima hemoragičnog kolitisa. Ubrzavanje dijagnostike kao i ranije prepoznavanje epidemije omogućuje uklanjanje potencijalno kontaminirane hrane prije konzumacije. Iako je kliconoštvo

relativno kratko (8 dana) djeca mogu biti kliconoše do 3 tjedna, odgovarajući higijenski nadzor može spriječiti interhumani prijenos.

Autori izjavljuju da nisu u sukobu interesa.

Authors declare no conflict of interest.

## Literatura

- [1] Beutin L, Krause G, Zimmermann S, Kaulfuss S, Gleier K. Characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1099–1108.
- [2] Blanco M, Blanco JE, Dhahi G, i sur. Typing of intimin(*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (muB and xiR/beta2B). *J Med Microbiol* 2006; 55: 1165–1174.
- [3] Gyles CL. Shiga toxin producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci* 2007; 85(13 Suppl): E45–62.
- [4] Piva IC, Pereira AL, Ferraz LR, i sur. Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasilia, Brazil. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1827–1832.
- [5] Chattaway MA, Dallman T, Okeke IN, Wain J. Enteroaggregative *E. coli* O104 from an outbreak of HUS in Germany 2011, could it happen again? *J Infect Dev Ctries* 2011; 5: 425–36.
- [6] Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, i sur. Origins of *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-Uremic syndrome in Germany. *N Engl J Med* 2011; 365: 709–717.
- [7] Nielsen EM, Scheutz F, Torpdahl M. Continuous surveillance of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections by pulse-field gel electrophoresis shows that most infections are sporadic. *Foodborne Pathog Dis* 2006; 3: 81–87.
- [8] Kim J, Oh K, Jeon S, i sur. *Escherichia coli* O104:H4 from 2011 European outbreak and strain from South Korea. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1755–1756.
- [9] Scheutz F, Moller Nielsen E, i sur. Characteristics of enteroaggregative Shigatoxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Euro Surveill* 2011; 16(24), pii 19889.
- [10] Schmidt H, Knop C, Franke S, Aleksic S, Heesemann J, Karch H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 701–705.
- [11] Kaspar C, Doyle ME, Arceher J. FRI Food Safety Review: Non-O157:H7 Shiga Toxin-Producing *E. coli* from Meat and Non-Meat Sources. Food Research Institute, UW-Madison, Dec. 2009/April 2010 Available at: [http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRI\\_Brief\\_NonO157STEC\\_4\\_10.pdf](http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRI_Brief_NonO157STEC_4_10.pdf)
- [12] Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, i sur. 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* 2003; 41: 4930–4940.
- [13] European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority. Shiga toxin/verotoxin producing

- Escherichia coli* in humans, food and animals in the EU/EEA with special reference to the German outbreak strain STEC O104. Technical report. Stockholm: ECDC; 2011.
- [14] Aidar-Ugrinovich L, Blanco J, Blanco M, i sur. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brazil. *J Food Microbiol* 2007; 115: 297–306.
- [15] Alonso S, Mora A, Blanco M, i sur. Fecal carriage of *Escherichia coli* O157:H7 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. *Int Microbiol* 2007; 10: 109–116.
- [16] Friesema IH, VAN DE Kasstele J, DE Jager CM, Heuvelink AE, VAN Pelt W. Geographical association between livestock density and human Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157 infections. *Epidemiol Infect* 2011; 8: 1–7.
- [17] Frank C, Werber D, Cramer JP, i sur. Epidemic profile of Shiga toxin producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany – Preliminary Report. *N Engl J Med* 2011; 365: 1771–1780.
- [18] Denamur E. The 2011 Shiga toxin producing *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak: a lesson in genomic plasticity. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 1124–1125.
- [19] European Food Safety Authority. Tracing seeds, in particular fenugreek seeds, in relation to the Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Germany and France. 2011. <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/176e.pdf>
- [20] Michino H, Araki K, Minami S, i sur. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am J Epidemiol* 1999; 150: 787–796.
- [21] Itoh Y, Nagano I, Kunishima M, Ezaki T. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2546–2550.
- [22] Scavia G, Morabito S, Tozzoli R, i sur. Similarity of Shiga toxin producing *Escherichia coli* O104:H4 strains from Italy and Germany. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1957–1958.