

Epidemic disease caused by the verotoxin O104:H4 *Escherichia coli* serotype via food of plant origin

Truszczyński M., Pejsak Z., National Veterinary Research Institute in Pulawy

The purpose of this paper was to characterize the consumers' exposition and risk to the pathogenic *Escherichia coli* strains producing Shiga toxin called also verotoxin. These strains are called STEC or VTEC and also enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC). The mentioned toxin, including two variants of it, is responsible for the Haemolytic Uremic Syndrome (HUS), in humans. Several hundreds of *E. coli* serotypes produce Shiga toxin. Over 100 serotypes of this number are pathogenic for humans. Clinically most important are strains of the O157:H7 serotype. Until May 2011 *E. coli* O104:H4 was never identified in humans, except 10 cases identified as HUS. Thus the recent epidemic disease in Germany, with over 4000 cases and 50 deaths, which has been caused by STEC O104:H4 originated from vegetables, is regarded as the unusual phenomenon. This serotype was supposedly transferred from Egypt to Germany with the seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). Genetic properties of the O104:H4 serotype were characterized and tests for the identification of the correspondent genes were introduced. In this article clinical symptoms of EHEC infection were also described. Moreover, mechanisms of the transformation of innocuous, commensal *E. coli* into extremely pathogenic strains were presented. It was underlined that *E. coli* easily exchanges genetic information through horizontal gene transfer, so such epidemic diseases may occur in future.

Keywords: *E. coli* O104:H4, epidemic disease, Germany.

Celem artykułu jest charakterystyka ekspozycji i ryzyka konsumentów na chorobotwórcze szczepy *Escherichia coli* wytwarzające shigatoksyny, zwane też werotoksynami lub werocytotoksynami. Określone są one jako STEC (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*) lub VTEC (Vero toxin-producing *Escherichia coli*). Zjadliwe dla ludzi szczepy *E. coli* w obrębie zdefiniowanego patotypu STEC nazywane są również enterokrwotocznymi *E. coli* (enterohaemorrhagic *E. coli* – EHEC). Podjęty temat uwzględnia również istotne dane, które łączą się z właściwościami *E. coli* w aspekcie mechanizmów chorobotwórczości oraz epidemiologii i rezerwuaru ludzkiego oraz zwierzęcego tych bakterii. Głównym źródłem przedstawionych niżej informacji jest raport naukowy Europejskiego Urzędu do spraw Bezpieczeństwa Żywności – EFSA (European Food Safety Authority) z 2011 r. (1).

Istnieje kilkaset różnych serotypów *E. coli* wytwarzających toksynę Shiga.

Epidemia wywołana przez werotoksyczny serotyp O104:H4 *Escherichia coli* za pośrednictwem żywności pochodzenia roślinnego

Marian Truszczyński, Zygmunt Pejsak

z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Spośród nich ponad 100 uważanych jest za chorobotwórcze dla człowieka. W tych ramach szczepy serotypu O157:H7 oceniane są jako najważniejsze klinicznie. Natomiast do 50% zakażeń powodowanych jest przez szczepy serotypów STEC, które nie mają antygeny O157 i są zaliczane do innych serotypów (2, 3, 4).

Wytwarzane przez wymienione drobnoustroje shigatoksyny są przyczyną występującego u ludzi zespołu hemolityczno-mocznicowego (haemolytic-uremic syndrome – HUS). Nigdy jednak do drugiej połowy maja 2011 r. nie wykazywano w takim powiązaniu serotypu O104:H4, poza dwukrotną izolacją w Niemczech w 2001 r. (5) i jednym ogniskiem w Korei w 2005 r. (6). Zgodnie z danymi Europejskiego Centrum do spraw Zapobiegania i Zwalczenia Chorób (European Centre for Disease Prevention and Control – ECDC) w latach 2004-2009 w państwach Unii Europejskiej 10 osób zakażyło się szczepami STEC O104 (1). Sporadycznie, jak również wynika z cytowanej publikacji, w 2010 r. szczepy serogrupy O104 izolowano w Austrii, Finlandii i Szwecji. Natomiast epidemia rozwijająca się z północnych Niemiec w maju i czerwcu 2011 r., spowodowana przez ten werotoksyczny serotyp za pośrednictwem świeżych warzyw, przyjęła rzadko spotykane rozmiary. W tym okresie zachorowało około 3000 osób, a zmarło ponad 40, zwłaszcza z powodu zespołu hemolityczno-mocznicowego (1).

Według nieco późniejszych informacji z 5 lipca 2011 r. w Europie i Ameryce Północnej odnotowano ponad 4,1 tys. przypadków zakażeń wywołanych przez *E. coli* O104:H4 (STEC). Najliczniejsze miały miejsce w północnych Niemczech, a w kolejności mniej liczne, w pobliżu Bordeaux (Francja; 7). W sumie zmarło do tej pory, licząc od 21 maja 2011 r. około 50 osób. Frank i wsp. (8) wykazali, że zanieczyszczone szczepami O104:H4 (STEC) surowe pomidory, ogórki lub sałata stanowią materiał, za pośrednictwem którego następuje zakażenie człowieka. Z danych technicznego raportu EFSA dotyczącego nasion jako nośników O104:H4 (STEC)

wynika, że zwłaszcza nasiona kozieradki, importowane do Niemiec z Egiptu, stanowiły pierwotne źródło tego drobnoustroju (9, 10).

Obraz chorobowy u człowieka w wyniku zakażenia przez szczepy EHEC

Enterokrwotoczne szczepy *E. coli* (EHEC; około 100 różnych serotypów, w tym szczepy serotypu O104:H4) mogą wywołać u człowieka chorobę o różnym przebiegu – od łagodnych objawów biegunkowych do krwotocznych biegunk oraz nasilającej się dysfunkcji nerek, co określane jest jako zespół hemolityczno-mocznicowy.

Okres inkubacji choroby waha się od 3–8 dni. Typowy obraz chorobowy, wywołany przez STEC, charakteryzuje się zapaleniem żołądka i jelit lub wyłącznie okrężnicy o ostrym przebiegu. Często występuje niskiego stopnia gorączka, czasem wymioty. U większości chorych przy łagodnym przebiegu w ciągu 5–7 dni następuje powrót do zdrowia, zazwyczaj bez pomocy lekarza. U około 15% dzieci, u których jako przyczynę choroby zidentyfikowano szczepy STEC serogrupy O157, pojawia się zespół hemolityczno-mocznicowy. Odsetek zachorowań z objawami tego zespołu jest zazwyczaj dużo niższy u ludzi dorosłych. Zespół hemolityczno-mocznicowy może być, u małego odsetka chorujących, przyczyną zejścia śmiertelnego. Ponadto obraz chorobowy charakteryzuje się niedokrwistością hemolityczną i trombocytopenią (1). Natężenie biegunki określa kilka czynników, takich jak rodzaj serotypu *E. coli*, wiek pacjenta i dawka czynnika zakażającego. Dzieci w wieku poniżej 5 lat są bardziej narażone na ciężki przebieg zespołu hemolityczno-mocznicowego, a noworodki w wyniku długotrwałej biegunki z powodu odwodnienia i możliwości rozwoju posocznicy (11, 12).

Transmisja szczepów STEC przeważnie zachodzi za pośrednictwem zanieczyszczonej wytwarzającymi shigatoksynę szczepami *E. coli* żywności pochodzenia zwierzęcego, wody lub w wyniku kontaktu

ludzi ze zwierzętami. Odzwierzęce źródła nie odnoszą się do O104:H4 (STEC), gdyż zwierzęta i żywność pochodzenia zwierzęcego nie są źródłem szczepów tego serotypu, a wyłącznie żywność roślinnego pochodzenia zanieczyszczona z rezerwuaru ludzkiego. Zakażenie się możliwe jest też bezpośrednio od człowieka do człowieka, w tym w rodzinach lub innych skupiskach większych grup ludzi (np. szkoły, przedszkola, domy opieki).

W leczeniu zaleca się podawanie płynów nawadniających. Poglądy na temat skuteczności antybiotyków są sprzeczne. Mogą one bowiem aktywować uwalnianie toksyn Shiga i wspomagać rozwój zespołu hemolityczno-mocznicowego (1).

Zakażenia wywołane przez szczepy STEC są rejestrowane przez Unię Europejską. Na przykład w 2009 r. informowano o stwierdzeniu na tym obszarze 3573 przypadków zakażeń, wtedy jeszcze bez udziału szczepów serotypu O104:H4. Spośród tej liczby ponad połowę zachorowań powodowały STEC O157:H7. U 242 pacjentów rozpoznano zespół hemolityczno-mocznicowy.

22 maja 2011 r. Niemcy poinformowały UE o istotnym wzroście liczby pacjentów z objawami zespołu hemolityczno-mocznicowego i krwotoczną biegunką powodowaną przez STEC (11), co jak się później okazało, stanowiło początek epidemii.

Właściwości czynnika etiologicznego zachorowań w Niemczech w 2011 r.

Drobnoustrojem wywołującym chorobę okazał się szczep sorbitolo-dodatni *E. coli* serotypu O104:H4, wytwarzający shigatoksynę 2a, a niewytwarzający intyminy oraz enterohemolizyny (1).

Wyniki porównania, przy użyciu PFGE, szczepów niemieckich i duńskich z okresu epidemii w 2011 r. wykazały identyczne lub bardzo podobne wzorce. Kombinacja czynników zjadliwości potwierdziła, że wariant wysoce patogenny wymienionego serotypu jest pochodzenia ludzkiego, a nie zwierzęcego. O danych tych informowało ECDC (1).

Szczep, o którym mowa ma unikatowe, niespotykane połączenie czynników zjadliwości STEC: obecność genu *stx2* i genów *aatA*, *aggR*, *aap*, *aa*, *aggC* – typowych dla grupy patogennych dla człowieka enteroagregacyjnych *E. coli* (EAggEC). Zakażenia wywołane przez EAggEC powodują zazwyczaj długotrwałe wodniste biegunki, zwłaszcza u dzieci i podróżujących do krajów rozwijających się po krótkim tam przebywaniu (13).

Wymieniona grupa enteropatogennych dla człowieka szczepów o genie *aggR* cechuje się w procesie adhezji do hodowli komórek HEp-2 skupiskami, czyli agregatami

komórek bakteryjnych. Stąd nazwa enteroagregacyjnych szczepów *E. coli* (13).

Wprawdzie kodowane przez wymienione geny właściwości toksyczne, będące przyczyną krwotocznego zapalenia jelit człowieka oraz uszkodzenia nerek, są istotne w patogenezie zachorowań człowieka, wywołanych przez charakteryzowaną hybrydę *E. coli*, to jednak warunkiem rozwinięcia się obrazu chorobowego jest adhezja tych bakterii do błony śluzowej przewodu pokarmowego. Umożliwia ona kolonizację jelit. W konsekwencji w wyniku nagromadzenia się tam dużej liczby tej odmiany komórek *E. coli* i wytworzenia dużej ilości werotoksyn oraz ich wchłonięcia do krwioobiegu rozwija się obraz zespołu hemolityczno-mocznicowego. W chorobotwórczości charakteryzowanego wariantu *E. coli* odgrywają też rolę dodatkowe geny zjadliwości występujące w plazmidach, fagach i wyspach patogenności tej odmiany pałeczki okrężnicy, np. O-I 122(1).

Przechodzenie komensala w wariant chorobotwórczy *E. coli* i dane epidemiologiczne

Generalnie wiadomo, że pałeczka okrężnicy włącznie z charakteryzowanym wariantem O104:H4 jest bakterią, która bardzo łatwo oraz często wymienia informację genetyczną na drodze horyzontalnego transferu genów (np. dzięki koniugacji, transformacji lub transdukcji) z innymi pokrewnymi bakteriami, takimi jak inne szczepy *E. coli*, *Salmonella* spp. i *Shigella* spp. W wyniku tego szczepy *E. coli* mogą nabywać właściwości pochodzące od licznych gatunków bakterii, a *E. coli* z komensala może w ten sposób przekształcić się w drobnoustroj chorobotwórczy o możliwości wywołania różnych objawów chorobowych (14). Zatem podobnych sytuacji, jak w przypadku omawianej epidemii należy spodziewać się również w przyszłości. Mogą one wystąpić nie tylko w krajach o niskim poziomie higieny, lecz również w takich, które dysponują sprawną służbą sanitarną i wysokiego stopnia społeczną świadomością w zakresie profilaktyki chorób zakaźnych. Potwierdza to epidemia EHEC, mająca obecnie miejsce w Niemczech, dokąd jednak dodatkowo utworzony w wyniku zmienności wariant był przewieziony z innego kraju. To zaś w związku z nasilającym się międzynarodowym obrotem produktami żywnościowymi coraz częściej może się zdarzać również w przyszłości.

Wśród szczepów pałeczki okrężnicy typu STEC, przeciwnie niż w odniesieniu do odmiany stanowiącej serotyp O104:H4 STEC, związanej z żywnością pochodzenia roślinnego istnieją, jak wspomniano uprzednio, grupy szczepów *E. coli* chorobotwórczych dla zwierząt, które również

u człowieka wywołują zaburzenia żołądkowo-jelitowe, a których źródłem jest mleko lub mięso. Tworzą je szczepy enterokrwtocenne, enterotoksyczne, enteroagregacyjne, enteropatogenne i enteroinwazyjne (1).

Przegląd czynników zjadliwości STEC, uwzględniając ich genetyczne podstawy, przedstawił Bolton (15).

Ostatnio dokonana analiza filogenetyczna szczepów *E. coli* izolowanych od ludzi i zwierząt z geograficznie różnych obszarów, przy użyciu PCR i sekwencjonowania wielopunktowego (multilocus sequence typing – MLST) oraz standardowej metody do analiz filogenetycznych bakterii, wskazywała liczne zmienności i rekombinacje między patogennymi rodami (lineages) tego gatunku bakterii (16, 17). Wśród szczepów STEC są wytwarzające shigatoksynę (werotoksynę) 1 (Stx1) i wytwarzające shigatoksynę 2 (Stx2). Badania w tym kierunku kontynuowali Mellmann i wsp. (5), wykazując wymienioną metodą wśród 169 szczepów enterokrwtocennych *E. coli* (EHEC), nienależących do serogrupy O157, 29 różnych typów sekwencyjnych (STs).

Co roku stwierdzane są EHEC w różnych częściach świata, w tym w Europie, jako przyczyna sporadycznych raczej zachorowań ludzi, czasami włącznie z objawami zespołu hemolityczno-mocznicowego, a nawet w konsekwencji z zejściem śmiertelnym. Jednak liczba zakażonych i chorujących oraz zmarłych ludzi, biorąc pod uwagę analogiczny obszar występowania, jest zawsze dużo niższa niż ma to miejsce w Niemczech w epidemii w 2011 r. Oprócz tego wykazywane szczepy nie należą do serotypu O104:H4. Izolowane są one od bydła, owiec, kóz, niewykazujących objawów chorobowych lub też z przypadków chorobowych, manifestujących się biegunką (18). Dzikie oraz udomowione przeżuwacze rzadko zachorowują w wyniku zakażenia lub nosicielstwa szczepów STEC. Są one bezobjawowymi nosicielami tych szczepów, stanowiąc najbardziej powszechny rezerwar zwierzęcy pod kątem potencjalnej transmisji do ludzi, u których mogą wywołać chorobę. Wydalane są przez zwierzęta z kałem do środowiska, skąd może zakażać się człowiek. Zakażenie może też następować przez bezpośredni kontakt ludzi ze zwierzętami lub częściej przez produkty żywnościowe na poszczególnych etapach łańcucha żywnościowego, lub za pośrednictwem zanieczyszczonej tymi bakteriami wody (1).

Świnie są, rzadziej niż przeżuwacze, bezobjawowymi nosicielami STEC (19). Nosicielstwo STEC u drobiu w Europie wydaje się również rzadsze niż u przeżuwaczy (20).

Również ludzie mogą stanowić rezerwar zakażenia, będąc bezobjawowymi

nosicielami STEC w przewodzie pokarmowym (21).

Całościowo ujmując źródła zakażenia człowieka, ekspozycja ludzi na zakażenie szczepami STEC, w tym należącymi do licznych serotypów *E. coli*, ma miejsce ze strony: produktów pochodzenia zwierzęcego oraz świeżych owoców i warzyw oraz nasion; zanieczyszczonej przez STEC wody; kontaktu bezpośredniego lub pośredniego ze zwierzętami lub ich kałem; kontaktu człowiek-człowiek; drogą fekalno-oralną. Na tym tle czynnik etiologiczny epidemii niemieckiej, która pojawiła się 21 maja 2011 r., uważany jest za pochodzący pierwotnie z rezerwuaru ludzkiego oraz szerzący się wyłącznie za pośrednictwem żywności pochodzenia roślinnego. Zgodnie z wnioskiem EFSA (1) wydaje się on łączyć mechanizm chorobotwórczości i podstawy genetyczne zjadliwości STEC i EAEC, jak na to wskazują uprzednio cytowane publikacje.

Należy dodać, że szczegółowe dane na temat chorobotwórczych odmian *E. coli* ze szczególnym uwzględnieniem szczepów shigatoksycznych i enterokrwotocznych, przedstawili wcześniej Osek i wsp. (22, 23, 24, 25) oraz Weiner (2).

Piśmiennictwo

1. Anon.: European Food Safety Authority. Scientific Report of EFSA. Urgent advice on the public health risk of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in fresh vegetables. *EFSA Journal* 2011, 9 (6), 2274, 1-50.
2. Weiner M.: Shigatoksyczne enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* – nowe czy dobrze znane zagrożenie? *Życie Wet.* 2011, 86, 7, 507-514.
3. Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Gonzalez E.A., Bernardem M.I.: Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: Prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VETC in ruminants, raw beef products, and humans. *Exp. Biol. Med.* 2003, 228, 345-351.
4. Kaspar C., Doyle M.E., Arche J.: FRI Food Safety Review: non-O157:H7 Shiga Toxin-producing *E. coli* from meat and Non-Meat Sources. Food Research Institute, UW-Madison. 2009. Available at: http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRI_Brief_NonO157STEC_4_10.pdf.
5. Mellmann A., Bielaszewska M., Köck R., Friedrich A.W., Fruth A., Middendorf B., Harmsen D., Schmidt M.A., Karch H.: Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 2008, 14, 1287-1290.
6. Bae W.K., Lee Y.K., Cho M.S., Ma S.K., Kim N.H., Choi K.C.: A case of hemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O104:H4. *Yonsei Med. J.* 2006, 47, 437-439.
7. Anon.: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/escherichia_coli.
8. Frank C., Faber M.S., Askar M., Bernard H., Fruth A., Gilsdorf A., Höhle M., Karch H., Krause G., Prager R., Spode A., Stark K., Werber D.: Large and ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome, Germany, May 2011. *Euro Surveill.* 2011, 16, 21, 1-3. pii=19878. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19878>.
9. Anon.: European Food Safety Authority. Technical Report of EFSA. Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O105:H4 2011 Outbreaks in Germany and France. *EFSA Journal* 2011, 1-23.
10. Anon.: Decyzja Wykonawcza Komisji z dnia 6 lipca 2011 r. w sprawie środków nadzwyczajnych mających zastosowanie do nasion kozieradki i niektórych nasion lub ziaren przywożonych z Egiptu. *Dz. U. Unii Europejskiej* 2011, L179, 10-12.
11. Anon.: ECDC Rapid Risk Assessment. Outbreak of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in Germany. European Centre for Disease Prevention and Control 2011, 1-5.
12. Frank C., Werber D., Kramer J.P., Askar M., Faber M., an der Heiden M., Bernard H., Fruth A., Prager R., Spode A., Wadl M., Zoufaly A., Jordan S., Stark K., Krause G.: Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany – preliminary report. *N. Engl. J. Med.* 2011, 365, 1-11.
13. Nataro J.P., Steinem T., Guerrant R.L.: Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 1998, 4, 251-261.
14. Tenaillon O., Skurnik D., Piccard B., Denamur E.: The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010, 8, 207-217.
15. Bolton D.J.: Verocytotoxigenic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli*: virulence factors and pathogenicity in the farm to fork paradigm. *Foodborne Pathog. Dis.* 2010, 8, 357-365.
16. Reid S.D., Hermelin C.J., Bumbaugh A.C., Selander R.K., Whittam T.S.: Paralel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* 2000, 406, 64-67.
17. Wirth T., Falush D., Lan R., Colles F., Mensa P., Wieler L.H., Karch H., Reeves P.R., Maiden M.C., Ochman H., Achtman M.: Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* 2006, 60, 1136-1151.
18. Caprioli A., Moabito S., Brugere H., Oswald E.: Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* 2005, 36, 289-311.
19. Bonardi S., Brindani F., Pizzin G., Lucidi L., D'Incau M., Liebana E., Moabito S.: Detection of *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 85, 101-110.
20. Dipineto L., Santaniello A., Fontanella M., Lagos K., Fiorretti A., Menna L.E.: Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in living layer hens. *Lett. Appl. Microbiol.* 2006, 43, 293-295.
21. Vincent C., Berlin P., Daignault D., Dozois C.M., Dutil L., Galanakis C., Reid-Smith R.J., Tellier P.P., Tellis P.A., Ziebell K., Manges A.R.: Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerg. Infect. Dis.* 2010, 16, 88-95.
22. Osek J.: Prevalence of Shiga toxin genes among *Escherichia coli* strains isolated from pigs. *Vet. Rec.* 1999, 145, 557-558.
23. Osek J.: Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhetic and healthy piglets after weaning. *Vet. Microbiol.* 1999, 68, 209-217.
24. Osek J., Gallien P., Protz D.: Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from calves in Poland. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 2000, 23, 267-276.
25. Osek J., Gallien P.: Zastosowanie specyficznych dla toksyn Shiga sond DNA znakowanych digoksygeniną do oznaczenia w kale bydła shigatoksycznych szczepów *Escherichia coli* (STEC). *Medycyna Wet.* 2002, 58, 863-866.

Prof. dr hab. Marian Trusczyński, Państwowy Instytut Weterynaryjny, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, e-mail: mtruszcz@piwet.pulawy.pl