

***E. coli* O157:H7 en andere V.T.E.C.: epidemiologie in België**

***E. coli* O157:H7 and other V.T.E.C.: epidemiology in Belgium**

door

Pierard D¹, Lauwers S.

Abstract

Verocytotoxin-producing Escherichia coli (V.T.E.C.) not only cause diarrhoea but also the haemolytical uremic syndrome (H.U.S.). Epidemics with over a thousand cases have been described. In the U.S.A. and Great Britain transmission happens mainly via contaminated food products, mainly (minced) meat. Transmission from person to person occurs also, as can be expected from an organism with a low infective dose.

Sources of infection in Belgium aren't clear and until now, no epidemic has been reported. A P.C.R. search for V.T.E.C. in faeces at the Academic Hospital of the V.U.B. revealed 1,02% of the faecal samples to be positive. O157 V.T.E.C. was isolated in 0,17% of the samples and other serotypes in 0,66% of the samples. V.T.E.C. are less frequent than Salmonella or Campylobacter, but when combining all V.T.E.C. serotypes, more frequent than Yersinia or Shigella. The

¹ Akademisch Ziekenhuis, Vrije Universiteit Brussel, Departement Microbiologie, Laarbeeklaan 101, B-1090 Brussel, België.

O157 V.T.E.C. represents one fifth to one fourth of all V.T.E.C. H.U.S. was in 1996 notified among 4/100 000 children <5 years old and 1,5/100 000 children >16 years old. These numbers are comparable with other countries. In Belgium, O157 V.T.E.C. is responsible for the majority of the H.U.S. cases but non-O157 V.T.E.C. can also cause this syndrome. Other V.T.E.C. serotypes should not be neglected.

The clinical laboratories must be encouraged to look for O157 V.T.E.C. by using sorbitol-Mac Conckey agar. In H.U.S. cases faeces samples could be sent to the V.T.E.C. reference laboratory in order to detect the other serotypes.

Key-words

Verocytotoxines, hemolytic uremic syndrom, *Escherichia coli* O157.

Inleiding

Terwijl Konowalchuk et al. het nut van Verocellen onderzochten voor het aantonen van hitte-labiele enterotoxinen (L.T.) van E.T.E.C., stelden deze auteurs vast dat cultuurfiltraten van sommige *Escherichia coli*-stammen een uitgesproken onomkeerbaar cytopathogeen effect produceerden op Verocellen. Zij noemden de organismen Verocytotoxine-producerende *E. coli* (V.T.E.C.). Pas in 1983 kon men deze V.T.E.C. in verband brengen met ziektebeelden: hemorragische colitis enerzijds en het Hemolytisch Uremisch Syndroom (H.U.S.) anderzijds. Via een klassieke epidemiologische studie had C.D.C. (Centers for Disease Control, Atlanta) op het einde van 1982 twee kleine uitbraken van hemorragische colitis geassocieerd met de isolatie van een toen zeer zeldzaam serotype van *E. coli*, nl. O157:H7 (1). Kort nadien toonden Canadese onderzoekers aan dat O157:H7 *E. coli* Verocytotoxines produceert. Karmali et al. publiceerden in 1983 en 1985 de resultaten van hun onderzoek naar V.T.E.C. in H.U.S.-patiënten: ze vonden een associatie tussen het klassieke H.U.S. en de isolatie van V.T.E.C. uit faeces (2). Na het optreden van massale epidemieën, in 1992 in de V.S. (3) en in 1996 in Japan (4) en Schotland (5), werd de aandacht van zowel media, overheid, als voedingsindustrie bijzonder op dit organisme gevestigd. In de V.S. heeft dit recent geleid tot de spectaculaire terugname uit de handel

van meer dan 500 000 kilo gehakt rundvlees, na identificatie van een met O157:H7 V.T.E.C. besmet hamburgerlot.

Nomenclatuur en definities

Enkele jaren na de eerste beschrijving van de Verocytotoxines of Verotoxines (V.T.) door Konowalchuk et al., hebben Amerikaanse auteurs aangetoond dat deze toxines zeer verwant zijn met het Shigatoxine geproduceerd door *Shigella dysenteriae* type 1. De benamingen Shiga-like toxine-producerende *E. coli* (S.L.T.-E.C.) en recenter Shigatoxine producerende *E. coli* (S.T.E.C.) werden voorgesteld, maar werden niet algemeen aanvaard (1). Een derde benaming, enterohemorragische *E. coli* (E.H.E.C.), die naar de bloederige diarree of colitis verwijst, werd door M. Levine voorgesteld en zou eigenlijk moeten beperkt worden tot het serotype O157:H7 en andere serotypes die dezelfde klinische, epidemiologische en pathogene eigenschappen vertonen. Het bestaan van deze drie (vier) benamingen, V.T.E.C., S.T.E.C. (vroeger S.L.T.-E.C.) en E.H.E.C., is een belangrijke bron van verwarring en maakt het niet gemakkelijk om de literatuur over dit onderwerp te volgen.

De Verocytotoxines zijn eiwitten die uit meerdere subeenheden bestaan (1). Er zijn twee hoofdtypes van toxines, V.T.1 en V.T.2, maar V.T.2 omvat meerdere varianten.

Microbiologie

Bij meer dan 100 verschillende serotypes van *E. coli* werden Verocytotoxine-producerende stammen beschreven. De belangrijkste zijn O157:H7 (en zijn onbeweeglijke variant O157:H-), O26:H11, O103:H2 en O111:H- (1). Naast de productie van V.T.1, V.T.2 (en zijn varianten) of beiden, zijn andere virulentiefactoren nodig om ziekte te veroorzaken: de eigenschap „attachment-effacement”-letsels aan het darmslijmvlies te veroorzaken, de productie van enterohemolysine en de aanwezigheid van een groot plasmide van 55 tot 75 Mda (1). Men beschouwt het serotype O157:H7 en O157:H- als het meest pathogeen, daarna volgen O26:H11, O103:H2 en O111:H- (1, 6).

O157 V.T.E.C. kunnen gemakkelijk opgespoord worden dankzij hun bijzonder biotype: ze vergisten geen sorbitol en zijn β -glucuronidase negatief, in tegenstelling tot de meeste *E. coli*-stammen. Op het

milieu sorbitol-MacConckey (S.M.A.C.) vormen ze kleurloze kolonies die met een antiserum of een latex reactief geagglutineerd kunnen worden (3, 7). Ze moeten zorgvuldig geïdentificeerd worden: atypische stammen (o.a. urease positieve O157 V.T.E.C.) komen in België voor (6). Het is wenselijk om de productie van Verocytotoxines te bevestigen (commercieel beschikbare kits of referentielaboratorium) omdat niet noodzakelijk alle O157 *E. coli* Verocytotoxines produceren (7).

V.T.E.C. van andere serotypes hebben geen bijzondere karakteristieken en kunnen enkel via productie van Verocytotoxines opgespoord worden. Dit wordt uitgevoerd op cellijnen, door immunologische testen (E.H.E.C.-Premier en V.T.E.C.-R.P.L.A.-kits) of d.m.v. genetische methoden (D.N.A.-hybridisatie, P.C.R.) (6). Ook atypische sorbitol positieve en lucuronidase positieve O157:H- stammen die in Duitsland beschreven zijn, kunnen enkel met deze methoden opgespoord worden (8).

Ziektebeelden

V.T.E.C.-infectie veroorzaakt niet enkel de ernstige ziektebeelden zoals hemorrhagische colitis, Hemolytisch Uremisch Syndroom of trombotische trombocytopenische purpura, maar ook en veel vaker, een niet-gecompliceerde diarree die zelfs niet altijd bloederig is (6). Asymptomatische patiënten komen ook voor. Het H.U.S., gedefinieerd door hemolytische anemie (met rode bloedcel-fragmentatie veroorzaakt door de capillaire letsels), trombocytopenie en acute nierinsufficiëntie, wordt voornamelijk bij kleine kinderen waargenomen. Het betreft een ernstige ziekte met een mortaliteit van ongeveer 5%, ondanks de huidige therapeutische mogelijkheden, en met belangrijke sekwellen op lange termijn (hypertensie, chronische nierinsufficiëntie...) (9). Op basis van gegevens verkregen tijdens epidemieën van O157 V.T.E.C.-infecties, schat men dat 5 tot 10% van de geïnfecteerde kinderen H.U.S. ontwikkelen. Het overeenkomstige percentage voor infecties met andere V.T.E.C.-serotypes is onbekend (3).

Epidemiologie

Infecties met O157 V.T.E.C. zijn na 1982 opgedoken in de V.S., Canada en het V.K. en hun frequentie neemt waarschijnlijk toe (10).

Men spreekt van een "emerging infectious disease". O157 V.T.E.C. zijn ook in talrijke andere landen aanwezig maar met een lagere incidentie. Niet-O157 V.T.E.C. zijn overal verspreid maar er is geen aanwijzing dat ze frequenter worden (3).

In een screening voor V.T.E.C., uitgevoerd in ons laboratorium door middel van een P.C.R.-protocol, werden Verocytotoxine genen gevonden in 1,02% van alle faecesmonsters bestemd voor coprocultuur. Niet-O157 V.T.E.C. werden in 0,66% van de monsters afgezonderd en O157 in 0,17%; in de overige P.C.R.-positieve monsters was het onmogelijk een V.T.E.C.-stam af te zonderen, waarschijnlijk omdat de concentratie V.T.E.C. te laag was. Globaal werden V.T.E.C. minder frequent afgezonderd dan *Salmonella* spp. (3,4% van de stalen) en *Campylobacter jejuni/coli* (3,2%) maar frequenter dan *Yersinia* spp. (0,53%) en *Shigella* spp. (0,25%). Voor geen enkel geval was er een epidemiologisch verband, behalve voor twee kinderen uit eenzelfde familie. De meeste patiënten vertoonden een niet-gecompliceerde diarree, meestal zelfs niet bloederig (6). Een registratie in 1996 van H.U.S. in België toonde aan dat het syndroom een incidentie heeft van 4 gevallen/100 000 kinderen < 5 jaar en 1,5 gevallen/100 000 kinderen < 16 jaar, wat vergelijkbaar is met cijfers uit andere ontwikkelde landen. In deze H.U.S.-gevallen vinden we veel frequenter O157 dan bij niet-geselecteerde patiënten met diarree: in drievierde van de V.T.E.C.-geassocieerde H.U.S.-gevallen werden O157 V.T.E.C. gedetecteerd (11). Dit suggereert dat stammen van deze serogroep pathogener zijn dan andere V.T.E.C.

In tegenstelling tot andere landen, werd in België tot nog toe geen enkele epidemie van V.T.E.C.-infecties gerapporteerd. In Noord-Amerika en Groot-Brittannië werden herhaaldelijk O157 V.T.E.C.-epidemieën gemeld (3). Bij de drie grootste O157 V.T.E.C.-epidemieën werden honderden tot duizenden gevallen geteld:

- 553 gevallen in 1992 in het noordwesten van de V.S. waarvan 40 H.U.S. en 4 overledenen; het vehikel was een besmet hamburgerlot (3).
- 6 561 gevallen in 1996 in Japan met 101 H.U.S. en 3 overledenen; besmette radijsscheuten bleken het vehikel te zijn (1, 4).
- 496 gevallen in 1996 in Schotland met meer dan 10 overledenen; het aantal H.U.S.-gevallen werd niet gerapporteerd, maar de meeste patiënten waren bejaarden die snel overleden zonder het syndroom te ontwikkelen; de infectiebronnen waren vlees en bereide schotels afkomstig van één slager (5).

In continentaal Europa werden uitbraken met O157:H7 V.T.E.C. slechts uitzonderlijk gemeld. Toch werden uitbraken met andere serotypes beschreven: O111:H- in Italië, O103:H2 en O111:H- in Frankrijk (8). De besmettingsbron werd niet duidelijk geïdentificeerd. In Australië lag droge worst aan de basis van een epidemie van O111:H-infecties (12).

De infecterende dosis voor V.T.E.C.-infecties kon niet direct gemeten worden vermits geen vrijwilligersstudies werden uitgevoerd met deze bacterie, die levensbedreigende complicaties kan veroorzaken. Op basis van indirecte argumenten schat men ze zeer laag. De meeste informatie betreffende de transmissiewegen van V.T.E.C. is afkomstig van uitbraakonderzoek. In de V.S. werd rundvoedsel, als infectiebron voor O157 V.T.E.C.-gevallen, in talrijke epidemieën geïncrimineerd: het betrof voornamelijk vlees (gehakt, hamburgers, salami) en melk (onbehandeld of opnieuw besmet na pasteurisatie) (3). In gevallen waar ander voedsel de besmettingsbron was, werd vaak toch nog een verband gelegd met runderen: niet-gepasteuriseerd appelsap van vruchten besmet met runderfaeces, aardappelen en radijsscheuten besmet met mest. Anderzijds heeft men ook transmissie via water kunnen documenteren, via niet-gechloreerd distributiewater en vooral via zwembeurten in besmette meren. Interhumane transmissie blijkt een belangrijke bron te zijn van secundaire gevallen.

De infectiebronnen van sporadische gevallen met V.T.E.C.-infectie zijn veel minder gekend. In een Belgische case-control studie waar V.T.E.C.-geïnfecteerde patiënten en gepaarde controles werden ondervraagd, kwam slechts consumptie van vis naar voren als risicofactor in een multivariate analyse (13). Opvallend is dat het eten van rauw vlees — nochtans zeer dikwijls door patiënten en controles gerapporteerd — maaltijden in een fast-food restaurant, rundhamburgers of onbehandeld water geen risicofactoren zijn. Dit stemt evenwel overeen met gegevens van Belgische vlees- en dierenstudies: O157 stammen werden slechts uitzonderlijk afgezonderd uit runderen of rundvlees (14). Pohl et al. hebben 70 V.T.E.C. uit runderen afgezonderd; geen enkele behoorde tot het serotype O157:H7 (15). In een studie van meer dan tweeduizend vleesmonsters hebben wij V.T.E.C. afgezonderd in 1,6% van de rundvleesstalen, 4% van de schapenvleesstalen en 13% van de wildvleesstalen, maar geen enkele van deze stammen behoorde tot het serotype O157. Bovendien herbergden de afgezonderde V.T.E.C.-stammen weinig of geen van de hierboven beschreven, bijkomende virulentiefactoren, wat waarschijnlijk betekent dat ze minder pathogeen zijn voor de mens (14).

Besluit

Tot nog toe werd in België geen enkele epidemie van V.T.E.C.-infecties gerapporteerd. Nochtans blijkt de isolatiefrequentie van dit organisme vergelijkbaar te zijn met dat van andere landen. In het bijzonder is het Hemolytisch Uremisch Syndroom even frequent als in andere Europese landen. Het serotype O157:H7 en zijn onbeweeglijke variant O157:H- worden frequenter afgezonderd in H.U.S.-gevallen dan niet-O157 V.T.E.C., terwijl in de meeste gevallen van ongecompliceerde diarree de stammen tot andere serotypes behoren.

De klinische laboratoria kunnen met de huidige technieken slechts in routine O157 V.T.E.C. opsporen. Ze dienen te worden aangemoedigd om dit te doen, en als het niet mogelijk zou zijn op alle onderzochte faecesmonsters, dan ten minste op de bloederige monsters, op de monsters van patiënten met het Hemolytisch Uremisch Syndroom, een anamnese van bloederige diarree, een reis in het buitenland, een voedselintoxicatie of in de context van uitbraak. De registratie van alle gevallen van het Hemolytisch Uremisch Syndroom is ook nuttig en geeft bovendien de mogelijkheid om onrechtstreeks de frequentie van V.T.E.C.-infecties te volgen. Faecesmonsters kunnen naar het V.T.E.C.-referentielaboratorium verzonden worden om ook andere V.T.E.C.-serotypes op te sporen.

Résumé

Les *Escherichia coli* producteurs de Vérocytotoxines (V.T.E.C.) ne sont pas seulement cause de diarrhée mais aussi du syndrome d'hémolyse urémique (H.U.S.). Des épidémies ont été décrites qui ont compté jusqu'à plusieurs milliers de cas. Aux Etats-Unis et en Grande-Bretagne, ces infections sont principalement véhiculées par la viande de boeuf (hachée). La transmission peut aussi se faire par voie interhumaine, comme on s'y attend pour un organisme qui a une faible dose infectante.

Les sources d'infection ne sont pas claires en Belgique et on n'a pas encore rapporté d'épidémie. Pourtant une P.C.R. pour la recherche de V.T.E.C. s'est avérée positive pour 1,02% des échantillons de selles examinés à l'A.Z.-V.U.B. Un V.T.E.C. O157 a pu être isolé de 0,17% des échantillons et d'autres sérotypes de 0,66%. Les V.T.E.C. sont moins fréquents que les *Salmonella* et les *Campylobacter* et, si l'on considère tous les sérotypes, que les *Yersinia* et les *Shigella*.

Les V.T.E.C. O157 représentent un cinquième à un quart de tous les V.T.E.C. En 1996 le H.U.S. a été rapporté chez 4,3/100 000 enfants de <5 ans et chez 1,8/100 000 enfants de <16 ans, ce qui est comparable aux taux rapportés dans d'autres pays. En Belgique, les V.T.E.C. O157 sont responsables de la majorité des cas d'H.U.S. mais les V.T.E.C. non-O157 peuvent également provoquer ce syndrome. Ces autres sérotypes ne doivent donc pas être négligés.

Les laboratoires cliniques doivent être encouragés à rechercher les V.T.E.C. O157 par l'utilisation du milieu sorbitol-MacConkey. Dans les cas de H.U.S., des échantillons de selles pourront être envoyés au laboratoire de référence pour la détection d'autres sérotypes.

Mots-clés

Vérocytotoxines, syndrome d'hémolyse urémique, *Escherichia coli* O157.

Samenvatting

Verocytotoxine-producerende *Escherichia coli* (V.T.E.C.) veroorzaken niet alleen diarree maar ook het Hemolytisch Uremisch Syndroom (H.U.S.). Epidemieën met soms duizenden gevallen werden beschreven. In de V.S. en Groot-Brittannië gebeurt transmissie hoofdzakelijk via besmet voedsel, vnl. (gehakt) rundvlees. Ook interhumane transmissie komt voor zoals verwacht bij een organisme met een lage infecterende dosis.

De besmettingsbronnen in België zijn niet duidelijk en er werden tot nog toe geen epidemieën gerapporteerd. Nochtans was een P.C.R. voor het opsporen van V.T.E.C. in faeces positief in 1,02% van de faecesmonsters die werden onderzocht in het A.Z.-V.U.B. O157 V.T.E.C. kon in 0,17% van de monsters afgezonderd worden en andere serotypes in 0,66%. V.T.E.C. zijn minder frequent dan *Salmonella* en *Campylobacter* en als men alle serotypes beschouwt, zijn zij frequenter dan *Yersinia* en *Shigella*.

De O157 V.T.E.C. vertegenwoordigen een vijfde tot een vierde van alle V.T.E.C. In 1996 werd het H.U.S. bij 4,3/100 000 kinderen <5 jaar en 1,8/100 000 kinderen <16 jaar geregistreerd. Deze aantallen zijn vergelijkbaar met die in andere landen. In België is O157 V.T.E.C. verantwoordelijk voor de meeste H.U.S.-gevallen, maar ook niet-O157 V.T.E.C. kunnen het syndroom veroorzaken. Deze serotypes mogen dus niet worden verwaarloosd.

De klinische laboratoria moeten aangemoedigd worden om O157 V.T.E.C. op te sporen door het gebruik van een sorbitol-MacConkey agar. In H.U.S.-gevallen kunnen faecesmonsters voor detectie van andere serotypes naar het V.T.E.C.-referentielaboratorium worden opgestuurd.

Sleutelwoorden

Verocytotoxines, hemolytisch uremisch syndroom, *Escherichia coli* O157.

Referenties

1. NATARO J P, KAPER J B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 142-201.
2. KARMALI M A, PETRIC M, LIM C, FLEMING P C, ARBUS G S, LIOR H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. J Infect Dis 1985; 151: 775-782.
3. GRIFFIN P M. *Escherichia coli* and Other Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: Blaser M J, Smith P D, Ravdin J I, Greenberg H B, Guerrant R L (ed.), Infections of the Gastrointestinal Tract. First edition. New York: Raven Press 1995: 739-761.
4. WATANABE H, WADA A, INAGAKI Y, ITOH K, TAMURA K. Outbreaks of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan, 1996. Lancet 1996; 348: 831-832.
5. COWDEN J M. Scottish Outbreak of *Escherichia coli* O157, November-December 1996. Eurosurveillance 1997; 2: 1-2.
6. PIÉRARD D, STEVENS D, MORIAU L, LIOR H, LAUWERS S. Isolation and Virulence Factors of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* in Human Stool Samples. Clin Microbiol Infect 1997; 3: 531-540.
7. SMITH H R, SCOTLAND S M. Isolation and identification methods for *Escherichia coli* O157 and other Verocytotoxin producing strains. J Clin Pathol 1993; 46: 10-17.
8. CAPRIOLI A, TOZZI A E. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in continental Europe. In: Kaper J B, O'Brien Juliette-Wytsmanstraat 14, B-1050 Elsene (ed.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. Washington DC: American Society for Microbiology 1998 (in press).
9. KELLES A, VAN DYCK M, PROESMANS W. Childhood haemolytic uraemic syndrome: longterm outcome and prognostic features. Eur J Pediatr 1994; 153: 38-42.
10. ARMSTRONG G L, HOLLINGSWORTH J, MORRIS J G Jr. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. Epidemiol Rev 1996; 18: 29-51.
11. PIÉRARD D, CORNU G, PROESMANS W et al. Hemolytic uremic syndrome in Belgium: incidence and association with Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection Clin Microbiol Infect 1998 (submitted for publication).
12. PATON A W, RATCLIFF R M, DOYLE R M, et al. 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 1996; 34: 1622-1627.
13. PIÉRARD D, CROWCROFT N, DE BOCK S et al. A case-control study of sporadic infection with O157 and non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Epidemiol Infect 1998 (submitted for publication).

14. PIÉRARD D, VAN DAMME L, MORIAU L, STEVENS D, LAUWERS S. Virulence factors of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw meats. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 4585-7.
15. POHL P, DAUBE G, LINTERMANS P, KAECKENBEECK A, MAINIL J. Description de 70 souches d'*Escherichia coli* d'origine bovine possédant les gènes des vérotoxines. *Ann Med Vet* 1991; 135: 267-272.