



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ &**  
**ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ**



**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Θέμα: Εκτίμηση της επίπτωσης των λοιμώξεων από εντεροαιμορραγική *Escherichia coli* O157:H7 στον ανθρώπινο πληθυσμό της κεντρικής Ελλάδας. Συσχέτιση της συχνότητας αυτής με τον επιπολασμό του παθογόνου μικροοργανισμού στο ζωικό πληθυσμό, καθώς και σε ζωικά και φυτικά προϊόντα.**

Πινκά Γ. Ουρανία

Γενική Ιατρός

**Επιβλέπων**

Χατζηχριστοδούλου Χρήστος, Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας

**Τριμελής επιτροπή:**

Χατζηχριστοδούλου Χρήστος, Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας

Συρογιαννόπουλος Γεώργιος, Καθηγητής Παιδιατρικής

Πετεινάκη Ευθυμία, Αναπλ. Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

**ΛΑΡΙΣΑ 2014**

© 2014 Ουρανία Πινακά

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

*Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (4<sup>η</sup>/13-04-2011 ΓΣΕΣ):*

- 1<sup>ος</sup> Εξεταστής**  
**(Επιβλέπων)** Δρ. Χρήστος **Χατζηχριστοδούλου**  
*Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*
- 2<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Ευθυμία **Πετεινάκη**  
*Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*
- 3<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Γεώργιος **Συρογιαννόπουλος**  
*Καθηγητής Παιδιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*
- 4<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Σπυρίδων **Πουρνάρας**  
*Αναπληρωτής Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών*
- 5<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Νικόλαος **Τσιρόπουλος**  
*Καθηγητής (Χημεία, Ανάλυση και προσδιορισμός οργανικών ουσιών), Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*
- 6<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Αλέξανδρος **Γκόβαρης**  
*Καθηγητής Υγιεινής Τροφίμων Ζωϊκής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*
- 7<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Αθανάσιος **Τσακρής**  
*Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΜΕΡΟΣ Α-ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	11
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ <i>E. COLI</i> O157:H7</b> .....	12
Εισαγωγή.....	12
Ιστορική αναδρομή.....	14
Τρόποι μετάδοσης της <i>E. coli</i> O157:H7.....	16
Παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση και την ανάπτυξη της <i>E.coli</i> O157:H7.....	19
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ <i>E. COLI</i> O157:H7</b> .....	21
2.1 Μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού.....	21
2.2 Αντιγονική δομή της <i>E.coli</i> O157:H7.....	22
2.3 Παθογένεια.....	23
2.4 Δευτερεύοντες παθογενετικοί μηχανισμοί της <i>E. coli</i> O157:H7.....	26
2.4.1 Εντεροαιμολυσίνη (hly).....	26
2.4.2 Πρωτεάση της σερίνης (EspP).....	27
2.4.3 Θερμοανθεκτική εντεροτιξίνη EAST 1.....	28
2.5 Το γονιδίωμα της <i>E. coli</i> O157:H7.....	28
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ <i>E. COLI</i> O157:H7 ΚΑΙ NON-O157 STEC</b> .....	29
3.1 Κλινική εικόνα λοίμωξης από <i>E. coli</i> O157:H7.....	29
3.2 Παθογένεια και κλινική εικόνα λοίμωξης από non-O157 STEC.....	32
3.3 Σύγκριση της κλινικής εικόνας από λοίμωξη με <i>E. coli</i> O157:H7 και non-O157.....	33
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ <i>E. COLI</i> O157:H7 ΚΑΙ ΤΩΝ NON-O157 STEC ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ</b> .....	35
4.1 Επιδημίες και εξάρσεις κρουσμάτων στους ανθρώπους.....	35
4.1.1 Επιδημίες και εξάρσεις κρουσμάτων από <i>E. coli</i> O157:H7 στην Ελλάδα και στον κόσμο.....	35

4.1.2	Επιδημίες και εξάρσεις κρουσμάτων από non-O157 STEC.....	38
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ <i>E. COLI</i> O157:H7 ΚΑΙ ΤΩΝ NON-O157 STEC ΣΤΑ ΖΩΑ.....</b>		42
<b>5.1</b>	<b>Επιπολασμός των STEC στα βοοειδή.....</b>	42
5.1.1	Επιπολασμός της <i>E. coli</i> O157:H7 στα βοοειδή.....	42
5.1.2	Επιπολασμός των non-O157 STEC στα βοοειδή.....	43
<b>5.2</b>	<b>Παράγοντες που επηρεάζουν τον αποικισμό της <i>E. coli</i> O157:H7 και των non-O157 STEC στα βοοειδή.....</b>	45
<b>5.3</b>	<b>Επιπολασμός των STEC στα μικρά μηρυκαστικά (πρόβατα και αίγες).....</b>	47
5.3.1	Επιπολασμός της <i>E. coli</i> O157 στα μικρά μηρυκαστικά.....	47
5.3.2	Επιπολασμός των non-O157 STEC στα μικρά μηρυκαστικά.....	47
<b>5.4</b>	<b>Επιπολασμός των STEC στους χοίρους.....</b>	48
5.4.1	Επιπολασμός της <i>E. coli</i> O157:H7 στους χοίρους.....	48
5.4.2	Επιπολασμός των non-O157 STEC στους χοίρους.....	49
<b>5.5</b>	<b>Επιπολασμός των STEC στα πουλερικά.....</b>	49
5.5.1	Επιπολασμός της <i>E. coli</i> O157:H7 στα πουλερικά.....	49
5.5.2	Επιπολασμός των non-O157 STEC στα πουλερικά.....	50
<b>5.6</b>	<b>Επιπολασμός των STEC σε άλλα ζώα.....</b>	50
5.6.1	Επιπολασμός της <i>E. coli</i> O157:H7 σε άλλα ζώα.....	50
5.6.2	Επιπολασμός των non-O157 STEC σε άλλα ζώα.....	51
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup>. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ <i>E. COLI</i> O157:H7 ΚΑΙ ΤΩΝ NON-O157 STEC ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ.....</b>		52
<b>6.1</b>	<b>Επιπολασμός της <i>E. coli</i> O157:H7 στα τρόφιμα.....</b>	52
6.1.1	Επιπολασμός της <i>E. coli</i> O157:H7 σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης.....	52
6.1.2	Επιπολασμός της <i>E. coli</i> O157:H7 σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης.....	54
<b>6.2</b>	<b>Επιπολασμός των non-O157 STEC στα τρόφιμα.....</b>	56
6.2.1	Επιπολασμός των non-O157 STEC σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης.....	56

6.2.2	Επιπολασμός των non-O157 STEC σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης.....	57
6.3	Επιπολασμός της <i>E. coli</i> O157:H7 σε σφάγια και σε τρόφιμα φυτικής και ζωικής προέλευσης στην Ελλάδα.....	58
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7<sup>ο</sup>. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΗΣ <i>E. COLI</i> O157:H7.....</b>		61
7.1	Καλλιέργεια και ορολογικές εξετάσεις για την ανίχνευση της <i>E. coli</i> O157:H7 σε κόπρανα ανθρώπων και ζώων.....	61
7.2	Ταχείες μέθοδοι ανίχνευσης (screening).....	61
7.3	Μέθοδοι τυποποίησης.....	61
7.4	Μέθοδοι ανίχνευσης της <i>E. coli</i> O157:H7 στα τρόφιμα.....	62
7.4.1	Προεμπλουτισμός και καλλιέργεια του δείγματος.....	62
7.4.2	Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός.....	62
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8<sup>ο</sup>. ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ <i>E. COLI</i> O157:H7.....</b>		64
8.1	Θεραπεία.....	64
8.1.1	Σύγχρονες θεραπευτικές στρατηγικές εναντι της <i>E. coli</i> O157:H7 στους ανθρώπους.....	66
8.2	Πρόληψη.....	67
8.2.1	Μέτρα πρόληψης στο περιβάλλον εκτροφής.....	67
8.2.2	Ανάπτυξη εμβολίων στα βοοειδή.....	69
8.2.3	Μέτρα πρόληψης και έλεγχος στο περιβάλλον επεξεργασίας.....	70
8.2.4	Μέτρα πρόληψης και έλεγχος στη διάθεση και στην κατανάλωση των προϊόντων.....	71
<b><u>ΜΕΡΟΣ Β-ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>.....</b>		74
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....</b>		75
1.1	Υλικά και μέθοδοι.....	75
1.1.1	Δίκτυο πρωτοβάθμιας περίθαλψης για την καταγραφή των λοιμώξεων από <i>E.coli</i> O157:H7 .....	75
1.1.2	Δίκτυο δευτεροβάθμιας περίθαλψης και δίκτυο εργαστηρίων για την καταγραφή των λοιμώξεων από <i>E. coli</i> O157:H7.....	76
1.1.3	Διερεύνηση περιπτώσεων (case investigation).....	77
1.2	Συλλογή δειγμάτων.....	79

1.2.1	Συλλογή ανθρώπινων δειγμάτων.....	79
1.2.2	Συλλογή δειγμάτων από κόπρανα ζώων.....	79
1.2.3	Συλλογή δειγμάτων από προϊόντα ζωικής προέλευσης.....	80
1.2.4	Συλλογή δειγμάτων από προϊόντα φυτικής προέλευσης.....	81
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>.ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ <i>E. COLI</i> O157:H7.....</b>		<b>83</b>
<b>2.1</b>	<b>Απομόνωση και ταυτοποίηση της <i>E. coli</i> O157:H7 σε ανθρώπινα κόπρανα και σε κόπρανα ζώων.....</b>	<b>83</b>
<b>2.2</b>	<b>Απομόνωση και ταυτοποίηση της <i>E. coli</i> O157:H7 σε κρέατα και σε λαχανικά.....</b>	<b>83</b>
<b>2.3</b>	<b>Απομόνωση της <i>E. coli</i> O157:H7 στο γάλα.....</b>	<b>84</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>		<b>85</b>
<b>3.1</b>	<b>Αποτελέσματα από τα δίκτυα επιδημιολογικής επιτήρησης.....</b>	<b>85</b>
3.1.1	Αποτελέσματα από το δίκτυο πρωτοβάθμιας περίθαλψης για την καταγραφή των λοιμώξεων από <i>E. coli</i> O157:H7.....	85
3.1.2	Αποτελέσματα από το δίκτυο δευτεροβάθμιας περίθαλψης και το δίκτυο εργαστηρίων για την καταγραφή των λοιμώξεων από <i>E.coli</i> O157:H7.....	85
3.1.3	Αποτελέσματα από τη διερεύνηση περιπτώσεων με τη χρήση ερωτηματολογίου στους ασθενείς με διάρροια.....	86
<b>3.2</b>	<b>Αποτελέσματα εργαστηριακών δειγμάτων.....</b>	<b>88</b>
3.2.1	Ανθρώπινα δείγματα.....	88
3.2.2	Δείγματα από κόπρανα ζώων.....	88
3.2.3	Δείγματα από προϊόντα φυτικής προέλευσης.....	90
3.2.4	Δείγματα από προϊόντα ζωικής προέλευσης (κρεατοσκευάσματα και γάλα).....	91
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>.ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>		<b>92</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....</b>		<b>101</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>		<b>125</b>





## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσης διδακτορικής διατριβής δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς την ουσιαστική συμβολή μιας σειράς ανθρώπων. Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω:

- Τον επιβλέποντα της διατριβής κύριο **Χατζηχριστοδούλου Χρήστο**, Καθηγητή Υγιεινής και Επιδημιολογίας, και Διευθυντή του Εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου αναθέτοντάς μου αυτήν την εργασία ώστε να γίνει δυνατή η εκπόνηση αυτής της διατριβής, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του και τη συνεχή καθοδήγησή του καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου.
- Τον κύριο **Πουρνάρα Σπύρο**, Αναπληρωτή Καθηγητή Μικροβιολογίας στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών για την καθοριστική του συμβολή τόσο σε επιστημονικό άλλα και σε πρακτικό επίπεδο.
- Τον κύριο **Γκόβαρη Αλέξανδρο**, Καθηγητή στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τις συμβουλές και την καθοδήγηση ιδιαίτερα στο κομμάτι της εργασίας που αφορούσε στο ζωικό πληθυσμό.
- Τον κύριο **Συρογιαννόπουλο Γεώργιο**, Καθηγητή Παιδιατρικής και την κυρία **Πετεινάκη Ευθυμία**, Αναπλ. Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, που συμμετείχαν στην επιτροπή εξέτασης της εργασίας, για την κρίση τους.
- Τον κύριο **Δανηλίδη Βασίλη**, Μικροβιολόγος, τως Διευθυντής του Εργαστηρίου του Νοσοκομείου Ειδικών Παθήσεων (Λοιμωδών) της Θεσσαλονίκης, για την πολύτιμη βοήθεια, την υποστήριξη και τη σημαντική συμμετοχή του στη διεκπεραίωση της διατριβής.
- Την κυρία **Κατσιαφλάκα Άννα**, τον κύριο **Πλακοκέφαλο Ηλία**, την κυρία **Μπαρμπούτση Ελευθερία**, την κυρία **Κολοκυθοπούλου Φωτεινή** και την κυρία **Δασκαλάκη Αγγελική** για την πολύτιμη βοήθειά τους στην ανάλυση των δειγμάτων.
- Την **οικογένεια** μου για τη συμπαράστασή της καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εως σήμερα στην Ελλάδα δεν αναφέρονται εξάρσεις κρουσμάτων που να οφείλονται σε STEC (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*) και οι περιπτώσεις λοίμωξης από STEC που έχουν καταγραφεί αποτελούν σποραδικές περιπτώσεις. Σκοπός της μελέτης αυτής είναι η εκτίμηση της επίπτωσης της *E. coli* O157:H7 στους ανθρώπους και η συσχέτισή της με τον επιπολασμό του παθογόνου στο ζωικό πληθυσμό καθώς και με τον επιπολασμό του σε προϊόντα ζωικής και φυτικής προέλευσης στην περιοχή της κεντρικής Ελλάδας. Συνολικά, συλλέχθηκαν 1010 δείγματα κοπράνων ζώων ( πρόβατα, αίγες, βοοειδή, όρνιθες, χοίροι), 667 δείγματα κοπράνων από ασθενείς με διάρροια, 60 δείγματα από λαχανικά, 30 δείγματα ωμού κρέατος και 30 δείγματα ωμού γάλακτος. Από τις καλλιέργειες των δειγμάτων αυτών, αποικίες συμβατές με *E. coli* που παράγουν Shiga toxin (άχρωμες αποικίες σε θρεπτικό υλικό SMAC) εξετάστηκαν για την απομόνωση των STEC μέσω της χρήσης ELISA και ακολούθως οι αποικίες που ήταν θετικές για Shiga τοξίνη εξετάστηκαν με PCR για την ανίχνευση των παθογόνων γονιδίων *stx1*, *stx2*, *eae*, O157 και H7. Στα δείγματα που προέρχονταν από τα κόπρανα των ζώων, απομονώθηκαν 80 (7.9%) στελέχη που παρήγαγαν Shiga τοξίνη μέσω της ELISA, ενώ μέσω της PCR, *E. coli* O157:H7 στελέχη απομονώθηκαν από 8 (0.8%) και non-O157 STEC στελέχη από 43 (4.2%) δείγματα. Τα STEC στελέχη απομονώθηκαν κυρίως από πρόβατα και αίγες, μικρός αριθμός απομονώθηκε από βοοειδή και κανένα από τα κόπρανα χοίρων και όρνιθων. Τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν την παρουσία των STEC στα μικρά μηρυκαστικά και φαίνεται ότι τα ζώα αυτά μπορούν να αποτελέσουν παράγοντες κινδύνου για τη μετάδοση της λοίμωξης στους ανθρώπους. Από τα 667 δείγματα κοπράνων από διαρροϊκούς ασθενείς που εξετάστηκαν, μόνο τρία (0.5%) ήταν ασθενώς θετικά για την απομόνωση της Shiga τοξίνης και όλα ήταν PCR αρνητικά. Ομοίως, και τα 60 δείγματα λαχανικών ήταν αρνητικά για την παραγωγή Shiga τοξίνης. Οι άχρωμες αποικίες από τα λαχανικά εξετάστηκαν όλες με PCR και βρέθηκαν αρνητικές για λοιμογόνα γονίδια, αποικίες από τρία όμως δείγματα (δυο δείγματα ρόκας και ένα σπανάκι) ήταν θετικές για τα γονίδια O157 και

H7. Η *E. coli* O157:H7 δεν απομονώθηκε σε κανένα από τα δείγματα κρέατος και γάλακτος που εξετάστηκαν. Τα αποτελέσματα αυτά, αποδεικνύουν ότι τα πρόβατα, οι αίγες, τα βοοειδή και τα φυλλώδη λαχανικά μπορούν να αποτελέσουν πηγές μετάδοσης των STEC και της *E. coli* O157:H7 στους ανθρώπους στην Ελλάδα, μέσω της κατανάλωσης μη καλά ψημένου κρέατος, μη παστεριωμένου γάλακτος ή μη κατάλληλα πλυμένων λαχανικών.

## ABSTRACT

In Greece, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) have only been sporadically reported. The objective of this study was to estimate the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in farm animals, vegetables and humans in Greece. A total number of 1010 fecal samples were collected from farm animals (sheep, goats, cattle, chickens, pigs), 667 diarrheal samples from humans and 60 from vegetables, 30 raw meat products and 30 milk samples for the detection of STEC using ELISA and, subsequently, the toxin-producing colonies were subjected to a multiplex PCR for genes *stx1*, *stx2*, *eae*, O157 and H7. In animal samples, 80 strains (7.9%) were found to produce Shiga toxin by ELISA, while by PCR, *E. coli* O157:H7 strains were detected from 8 (0.8%) and non-O157 STEC strains from 43 (4.2%) samples. STEC strains were isolated mainly from sheep and goats, rarely in cattle and not in pigs and chickens, suggesting that small ruminants constitute a potential risk for human infections. However, from the 667 human specimens only three (0.5%) were positive for the detection of Shiga toxins and all were PCR negative. Similarly, colorless colonies from all 60 vegetable samples were examined using ELISA for toxin production and PCR for toxin genes and were all negative, but colonies from 3 samples (two roman rockets and one spinach) were positive by PCR for O157 and H7. *E. coli* O157:H7 was not detected in meat and milk samples examined. These findings indicate that sheep, goats, cattle and leafy vegetables can be a reservoir of STEC and *E. coli* O157:H7 in Greece and the consumption of unpasteurized goat and sheep milk, undercooked meat or inadequately washed vegetables may serve as vehicle for STEC transmission to humans.

## **ΜΕΡΟΣ Α- ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ *E. COLI* O157:H7

### 1.1 Εισαγωγή

Τα εντεροτοξινογόνα στελέχη STEC (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*) που παράγουν Shiga τοξίνες (Stx), αποτελούν ένα νεοεμφανιζόμενο τροφιμογενή παθογόνο παράγοντα που προέρχεται από τα ζώα [1]. Τα εντεροτοξινογόνα στελέχη (STEC) της *E. coli* αναφέρονται στη βιβλιογραφία και ως εντεροαιμορραγικά στελέχη (Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) συνήθως όμως χρησιμοποιείται ο όρος STEC που περιλαμβάνει τόσο την *E. coli* O157:H7 όσο και τα non-O157 στελέχη. Η *E. coli* O157:H7 αποτελεί το στέλεχος που έχει μελετηθεί περισσότερο και έχει αναγνωριστεί ως αίτιο αιμορραγικής κολίτιδας (HC) και αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου (HUS) σε αρκετές εξάρσεις κρουσμάτων ενώ τα πιο συνηθισμένα non-O157 STEC στελέχη που σχετίζονται με νόσο στους ανθρώπους θεωρούνται το O26, O103, O111, O121 και O145.

Τα non-O157 STEC αναγνωρίστηκαν πρόσφατα ως παθογόνα στελέχη με ιδιαίτερο αντίκτυπο στην υγεία του ανθρώπου και πλέον αποτελούν σημαντική αιτία νόσου [2,3]. Η ικανότητα τους να προκαλούν σοβαρή νόσο στον άνθρωπο σχετίζεται αναμφίβολα με την ιδιότητά τους να παράγουν τοξίνες Stx1 και/ή Stx2 [4,5]. Ένας ακόμη παθογόνος παράγοντας των STEC, θεωρείται μια πρωτεΐνη η ιντιμίνη, η οποία ευθύνεται για την προσκόλληση των STEC στο εντερικό επιθήλιο και την εξάλειψη των μικρολαχνών του εντέρου [6]. Η ιντιμίνη κωδικοποιείται από το χρωμόσωμα *eae* [7].

Τα STEC έχουν απομονωθεί από πολλά ζώα. Σημαντικότερη δεξαμενή των STEC στις περισσότερες χώρες θεωρούνται τα βοοειδή, όμως και άλλα ζώα όπως τα πρόβατα, οι αίγες, οι χοίροι και οι όρνιθες φαίνεται να αποτελούν δεξαμενή της *E. coli* O157:H7 [8,9,10]. Μάλιστα, όπως αποδεικνύεται σε πρόσφατες έρευνες τα πρόβατα και οι αίγες αποτελούν σημαντική πηγή μετάδοσης των STEC στους ανθρώπους.

Η μετάδοση συνήθως πραγματοποιείται μέσω της κατανάλωσης μη καλά ψημένου κρέατος και μη παστεριωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων. Εκτός όμως από τα προϊόντα ζωικής προέλευσης και τα προϊόντα φυτικής προέλευσης όπως το λάχανο, το σέλινο, το κόλιαντρο, ο κάρδαμος [11], τα ραπανάκια [12], το μαρούλι [13], το σπανάκι [14] και ο χυμός μήλου [15] συνδέονται με λοίμωξη από *E. coli* O157:H7. Τα λαχανικά μολύνονται από τα κόπρανα των ζώων που φέρουν τον μικροοργανισμό ως μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου.

Στην Ελλάδα, οι λοιμώξεις από STEC στους ανθρώπους ανήκουν στα υποχρεωτικώς δηλούμενα νοσήματα στο ΚΕΕΛΠΝΟ. Έξι περιπτώσεις με STEC λοίμωξη καταγράφηκαν το χρονικό διάστημα από το 2004 έως το 2011 στην Ελλάδα. Δυο μόνο από αυτές τις περιπτώσεις, μια το 2006 και μια το 2007, οφείλονταν στην *E. coli* O157:H7. Σύμφωνα με την ετήσια ευρωπαϊκή επιδημιολογική αναφορά για τα λοιμώδη νοσήματα, για την ίδια περίοδο, η επίπτωση των STEC κυμαίνεται από 0 έως 0.06 ανα εκατομμύριο κατοίκους στην Ελλάδα.

Οι μέχρι τώρα έρευνες υπογραμμίζουν την παρουσία της *E. coli* O157 στην Ελλάδα. Στην παρούσα μελέτη γίνεται μια προσπάθεια εκτίμησης της επίπτωσης των λοιμώξεων από εντεροαιμορραγική *E. coli* O157:H7 σε ασθενείς με διάρροια και άλλα γαστρεντερικά συμπτώματα στην περιοχή της κεντρικής Ελλάδας. Η επίπτωση της στους ανθρώπους συσχετίζεται με τον επιπολασμό του παθογόνου μικροοργανισμού στο ζωικό πληθυσμό καθώς και με τον επιπολασμό του παθογόνου σε προϊόντα ζωικής και φυτικής προέλευσης. Ακόμη, εκτιμάται ο επιπολασμός των non-O157 STEC στους ανθρώπους και στα ζώα της κεντρικής Ελλάδας. Τέλος, γίνεται μια προσπάθεια καταγραφής του γονιδιακού προφίλ των λοιμογόνων γονιδίων της *E. coli* O157:H7 και των non-O157 STEC στα κόπρανα των ζώων, στα τρόφιμα ζωικής και φυτικής προέλευσης, και στους ανθρώπους στην περιοχή της κεντρικής Ελλάδας.

## 1.2 Ιστορική αναδρομή

Η *E. coli* O157:H7 ονομάστηκε έτσι επειδή εκφράζει το 157<sup>O</sup> σωματικό (O) αντιγόνο και το 7<sup>O</sup> βλεφαριδικό (H) αντιγόνο. Προέρχεται γενετικά από την *E. coli* O55:H7, ένα εντεροπαθογόνο στέλεχος που προκαλεί διάρροια στα βρέφη. Ο προγονικός κλώνος *E. coli* O55: H7 κατείχε την ομάδα των γονιδίων γνωστή ως «τόπος εξάλειψης των εντερικών κυττάρων» (LEE), που τα βακτήρια χρειάζονται για την προσκόλληση στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. Το πρώτο εξελικτικό στάδιο ήταν η απόκτηση της Shiga τοξίνης 2 (Stx2). Το δεύτερο εξελικτικό στάδιο ήταν η μετατροπή του σωματικού αντιγόνου από O55 σε O157 και η απόκτηση του μεγάλου pO157 πλασμιδίου. Στο επόμενο στάδιο, ο κλώνος έχασε την ικανότητά του να ζυμώνει τη σορβιτόλη και απέκτησε τη Shiga τοξίνη 1 (Stx1) [16].

Οι πρώτες έρευνες χρονολογούνται από το 1973 στις ΗΠΑ και λίγα χρόνια αργότερα το 1978 στον Καναδά και στο Ηνωμένο Βασίλειο. Απομονώθηκαν συνολικά οκτώ στελέχη *E. coli* O157:H7 μέχρι το 1982, ένα στις ΗΠΑ, ένα στο Ηνωμένο Βασίλειο και έξι στον Καναδά. Η πρώτη απομόνωση του μικροοργανισμού στην κεντρική Ευρώπη έγινε στο Βέλγιο το 1987, ενώ στην Αφρική και στη Νέα Ζηλανδία η *E. coli* O157:H7 απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1990 και το 1993 αντίστοιχα. Η πρώτη επιδημία στο Ηνωμένο Βασίλειο ανιχνεύθηκε το 1983 [16].

Η ανακάλυψη των τοξινών έγινε το 1977, από μια ομάδα επιστημόνων που διαπίστωσαν ότι οι τοξίνες που είχαν απομονώσει από ορισμένα στελέχη της *E. coli*, διέφεραν από τις μέχρι τότε γνωστές τοξίνες των εντεροτοξινογόνων κολοβακτηριδίων [17]. Τα βακτήρια της ομάδας αυτής χαρακτηρίστηκαν από την παραγωγή τοξινών, οι οποίες ονομάστηκαν Shiga-like τοξίνες εξαιτίας της ομοιότητας με την τοξίνη της *Shigella dysenteriae*, ενώ τα στελέχη της *E. coli* αποκαλούνται εν συντομία STEC [18]. Αργότερα, οι ίδιες τοξίνες ονομάστηκαν βεροτοξίνες και τα αντίστοιχα στελέχη VTEC, μιας και βρέθηκε ότι είναι τοξικές για τα βεροκύτταρα, δηλαδή για τα νεφρικά κύτταρα του πράσινου αφρικανικού πιθήκου. Με την πρόσφατα καθιερωμένη ονοματολογία οι τοξίνες αυτές αναφέρονται απλά ως Shiga τοξίνες, ενώ οι ονομασίες EHEC, VTEC και STEC



θεωρούνται ταυτόσημες.

Η κλινική σημασία των STEC στην παθογένεια των λοιμώξεων στους ανθρώπους ήταν άγνωστη μέχρι τις αρχές του 1980. Τη χρονιά αυτή, δυο ερευνητές ο Riley και ο Karmali συνέδεσαν τον μικροοργανισμό με την πρόκληση δυο νοσολογικών καταστάσεων αγνώστου αιτιολογίας έως τότε, την αιμορραγική κολίτιδα και το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο, αντίστοιχα ο καθένας [19, 20]. Το 1982, σε μελέτη δυο επιδημιών από το Riley και τους συνεργάτες του, στις οποίες οι ασθενείς παρουσίασαν αιμορραγική κολίτιδα, συνδέθηκε η βρώση μη καλά ψημένων χάμπουργκερ από αλυσίδα fast-food με τη λοίμωξη από ένα «σπάνιο» ορότυπο της *E.coli*, τον O157:H7, που παρήγαγε Shiga τοξίνη.

Το 1983, ο Karmali απέδειξε ότι υπήρχε συσχέτιση μεταξύ της λοίμωξης από STEC που ανήκαν σε διαφορετικούς οροτύπους, συμπεριλαμβανομένου και του O157:H7, και του αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου. Μέχρι τότε η *E. coli* O157:H7 δεν είχε αποδειχθεί ως αίτιο του αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου, ενώ το σύνδρομο είχε περιγραφεί από το 1955 [21]. Ο Karmali και οι συνεργάτες του, υπέδειξαν τις Shiga τοξίνες ως πρωτίστης σημασίας στην παθογένεια του αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου, επειδή οι Shiga τοξίνες ήταν παρούσες στα κοπρανώδη διηθήματα των ασθενών με αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο [5]. Το στοιχείο αυτό, όπως και η παρουσία αντισωμάτων έναντι των Shiga τοξινών στον ορό αρκετών ασθενών αποτέλεσε τον κοινό παρονομαστή μεταξύ των στελεχών διαφορετικών οροτύπων *E. coli* που σχετίζονταν με το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο. Τέλος, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι Shiga τοξίνες ήταν υπεύθυνες για τη ζημιά στα τριχοειδή των νεφρικών σπειραμάτων καθώς και άλλων οργάνων, πιθανότατα μέσω μιας άμεσης κυτταροτοξικής δράσης στο ενδοθήλιο των κυττάρων, ώστε να προκληθεί η χαρακτηριστική εικόνα της μικροαγγειοπάθειας του αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου.

### 1.3 Τρόποι μετάδοσης της *E. coli* O157:H7

Ο πιο συχνός τρόπος μετάδοσης του παθογόνου στον άνθρωπο είναι η βρώση μολυσμένων τροφίμων. Πολλά είδη κρέατος και γαλακτοκομικών προϊόντων έχουν λειτουργήσει ως πηγές μετάδοσης του μικροοργανισμού. Το χάμπουργκερ με βοδινό κρέας, οι μπριζόλες, το κεμπάπ, τα έτοιμα κρύα γεύματα με κρέας κοτόπουλου, γαλοπούλας και μοσχαριού, τα σαλάμια, τα λουκάνικα, τα τυριά, τα γάλατα, το βούτυρο, το γιαούρτι, το παγωτό, ο χυμός μήλου, τα σταφύλια, η λαχανοσαλάτα, το μαρούλι, το σπανάκι, τα ραδίκια, οι ρίζες φασολιών, τα πεπόνια αποτελούν μερικά μόνο από τα αίτια των επιδημιών (σχήμα 1)

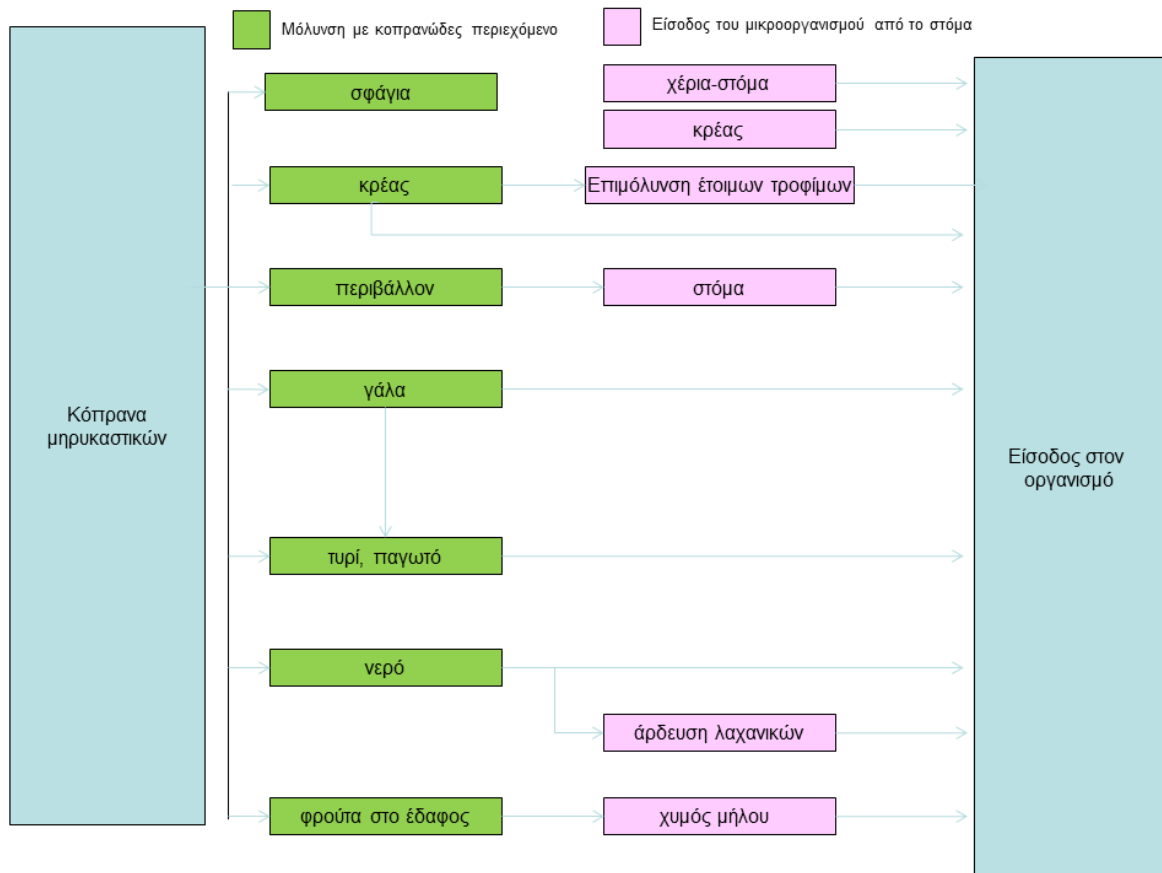
Η λίστα επεκτείνεται με την προσθήκη στα αίτια άλλων προϊόντων όπως τα μη καλά ψημένα προπαρασκευασμένα ζυμωτά μπισκότα, που αποτέλεσαν το αίτιο σε μια επιδημία στις ΗΠΑ το 2009 με 72 ασθενείς από *E. coli* O157 και 10 περιπτώσεις αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου [22].

Ως συχνότερες πηγές μετάδοσης της *E. coli* O157:H7 στις επιδημίες ανα τον κόσμο θεωρούνται: τα τρόφιμα στο 42.2% , τα γαλακτοκομικά προϊόντα στο 12.2%, η επαφή με τα ζώα στο 7.8%, το νερό στο 6.7%, το περιβάλλον στο 2.2% και άλλα άγνωστα αίτια στο 28.9% των επιδημιών. Τα αποτελέσματα προέρχονται από τη μελέτη 90 συνολικά επιδημιών που έλαβαν χώρα το χρονικό διάστημα από το 1982-2006 στο Ηνωμένο Βασίλειο, στην Ιρλανδία, στη Δανία, στη Νορβηγία, στη Φιλανδία, στις ΗΠΑ, στον Καναδά και στην Ιαπωνία [23].

Όλες οι *E. coli* μπορούν να μεταδοθούν μέσω της κοπρανοστοματικής οδού. Η μόλυνση επιτυγχάνεται είτε με άμεσο τρόπο είτε με έμμεσο μέσω επιμόλυνσης του φαγητού ή του νερού με κοπρανώδες περιεχόμενο. Περιγράφεται επίσης και η μετάδοση από άτομο σε άτομο, ως δευτερογενής τρόπος μετάδοσης μετά από τροφιμογενή ή υδατογενή λοίμωξη.

Η μετάδοση από άτομο σε άτομο αφορά κυρίως στην εξάπλωση της νόσου σε γηροκομεία, νοσηλευτικά ιδρύματα για ανθρώπους με άνοια και ψυχικά ασθενείς αλλά και σε παιδικούς σταθμούς [24,25]. Η ενδοοικογενειακή μετάδοση παρατηρείται συχνότερα σε άτομα ηλικίας 1-4 και

15-34 ετών [26]. Με υψηλότερο ποσοστό περιπτώσεων δευτερογενούς μετάδοσης σε επιδημίες στις οποίες οι ασθενείς ήταν ηλικίας μικρότερης των 6 ετών και χαμηλότερο σε αυτές όπου οι ασθενείς ήταν ηλικίας από 17-59 ετών [16].



**Σχήμα 1.** Τρόποι μετάδοσης της *E. coli* O157:H7 (Pennington, 2010)

Σημαντικό ρόλο στη δευτερογενή μετάδοση της νόσου παίζουν οι ασυμπτωματικοί φορείς. Ο χρόνος αποβολής του μικροβίου μετά από λοίμωξη, ποικίλλει στις διάφορες μελέτες. Σε μια από αυτές περιγράφεται η αποβολή της *E. coli* O157:H7 στα κόπρανα για χρονικό διάστημα άνω των 89 ημερών μετά τη λοίμωξη [27]. Σε μια πρόσφατη έρευνα σε εργαζόμενους παρασκευής τροφίμων σε αλλαντοβιομηχανία στην Ελβετία ανιχνεύθηκαν *stx* γονίδια με τη μέθοδο της PCR σε ποσοστό 3.5% στο σύνολο 5590 δειγμάτων κοπράνων που εξετάστηκαν [28].

Το πόσιμο νερό αλλά και τα νερά αναψυχής περιγράφονται ως ένας ακόμη τρόπος μετάδοσης της *E. coli* O157:H7 στους ανθρώπους. Καταγράφονται επιδημίες από μολυσμένο πόσιμο νερό, μη

κατάλληλα χλωριωμένο, προερχόμενο είτε από το δίκτυο ύδρευσης είτε από μη ελεγμένες φυσικές πηγές και πηγάδια. Το Μάιο του 2000 το δίκτυο ύδρευσης της πόλης Walkerton στο Ontario επιμολύνθηκε με *E. coli* O157:H7 και στη συνέχεια με *Campylobacter jejuni*, με αποτέλεσμα να ασθενήσουν πάνω από 2300 άτομα και να πεθάνουν επτά [29]. Οι παιδικές πισίνες αλλά και οι πισίνες μεγάλων διαστάσεων που μολύνθηκαν με κόπρανα ζώων ή ανθρώπων φορέων του μικροβίου, έχουν αποτελέσει το αίτιο υδατογενών επιδημιών. Σε τρεις επιδημίες περιγράφεται ως αίτιο το κολύμπι σε μολυσμένο με *E. coli* O157:H7 νερό λίμνης, όπου η λοίμωξη προήλθε από την κατάποση μικρών ποσοτήτων νερού από τους κολυμβητές κατά τη διάρκεια της κολύμβησης [30-32].

Οι βροχοπτώσεις φαίνεται να αποτελούν έναν ακόμη παράγοντα κινδύνου που σχετίζεται με εξάρσεις κρουσμάτων από *E. coli* O157, παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων είναι η επιδημία στην Αφρική το 1990, η επιδημία στο Walkerton του Καναδά το 2000, και μια μικρότερη επιδημία στο Glastonbury festival στην Αγγλία το 1997. Οι επιδημίες αυτές σχετίζονται με την κατανάλωση νερού από φυσικές πηγές και πηγάδια, μετά από έντονη βροχόπτωση [33-35].

Εξάρσεις κρουσμάτων που σχετίζονται με άμεση ή με έμμεση επαφή με μηρυκαστικά ζώα περιγράφονται στις ΗΠΑ και στο Ηνωμένο Βασίλειο. Η μεγαλύτερη επιδημία έως τώρα ανιχνεύθηκε στην Αγγλία την περίοδο Αυγούστου-Σεπτεμβρίου του 2009, όπου καταγράφηκαν συνολικά 93 περιπτώσεις, 78 ασθένισαν και 17 παρουσίασαν αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο [36].

Τέλος, αναφέρεται λοίμωξη από *E. coli* O157:H7 σε εργαζόμενους σε μικροβιολογικά εργαστήρια [37].

#### 1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση και την ανάπτυξη της *E. coli* O157:H7

Ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη και την επιβίωση της *E. coli* O157:H7 είναι η θερμοκρασία. Η *E. coli* O157:H7 αναπτύσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Η ελάχιστη θερμοκρασία στην οποία μπορεί ο μικροοργανισμός να αναπτυχθεί είναι 8 °C και η υψηλότερη 44-45 °C με ιδανικότερη αυτή των 37 °C. Η *E. coli* O157:H7 δεν είναι θερμοανθεκτική και επομένως το μαγείρεμα των φαγητών στους 70 °C για 2 λεπτά μπορεί να σκοτώσει τον μικροοργανισμό. Ο μικροοργανισμός επιζεί σε χαμηλές θερμοκρασίες και αντέχει στην ψύξη. Για παράδειγμα μικρή αλλαγή παρατηρήθηκε στον αριθμό του μικροοργανισμού σε χάμπουργκερς στα οποία είχε ενοφθαλμιστεί το παθογόνο και αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο στους -20 °C για 9 μήνες [38].

Ένας ακόμη παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την επιβίωση της *E. coli* O157:H7 είναι το pH. Ως ιδανικό για την ανάπτυξή της θεωρείται το pH μεταξύ 6-7, με ελάχιστο όριο το 4.4 και μέγιστο το 9. Το χαμηλότερο όριο εξαρτάται από το είδος του όξινου παράγοντα που χρησιμοποιείται. Τα ανόργανα οξέα όπως το HCL (π.χ οξύ του στομάχου) είναι λιγότερο ανασταλτικά από ότι τα οργανικά οξέα (π.χ οξικό οξύ) στην ίδια τιμή του pH. Η δυνατότητα αυτή του παθογόνου το καθιστά ικανό, σε αντίθεση με άλλους μικροοργανισμούς υπεύθυνους για τροφιμογενή νοσήματα, να αναπτύσσεται και να επιζεί σε περιβάλλον υψηλής οξύτητας, όπως του στομάχου [39].

Σε πειράματα, ενοφθαλμίζοντας την *E. coli* O157:H7 σε παστεριωμένο γάλα, για την παραγωγή φέτας και τελεμέ, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού άρχισε να μειώνεται όταν το pH των προϊόντων έφθασε 4.6. Μετά από ένα χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 30 ημερών η *E. coli* O157:H7 δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα [40]. Η αντοχή της *E. coli* O157:H7 σε περιβάλλον υψηλής οξύτητας εξηγεί και τον αυξημένο αριθμό επιδημιών που σχετίζονται με την κατανάλωση όξινων τροφίμων, όπως ο χυμός μήλου και η μαγιονέζα.

Η *E. coli* O157:H7 παρουσιάζει σημαντική ικανότητα επιβίωσης στο έδαφος, στο νερό και στην κοπριά για αξιοσημείωτο χρονικό διάστημα. Η επιβίωση του παθογόνου σε κόπρανα ζώου κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες εξαρτάται περισσότερο από τη θερμοκρασία και την ένταση των βροχοπτώσεων [41]. Ο μικροοργανισμός επιδεικνύει μεγάλη αντοχή σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από -20 έως +4 °C σε κόπρανα βοοειδών. Στην Ιρλανδία, ο μικροοργανισμός ανιχνεύθηκε σε κόπρανα που παρέμειναν στο χώμα για 99 ημέρες [42]. Σε άλλη μελέτη, η *E. coli* O157:H7 επέζησε για πάνω από 70 ημέρες σε κόπρανα βοοειδών σε θερμοκρασία 5 °C, για 56 ημέρες στους 22 °C και για 49 ημέρες στους 37 °C [41].

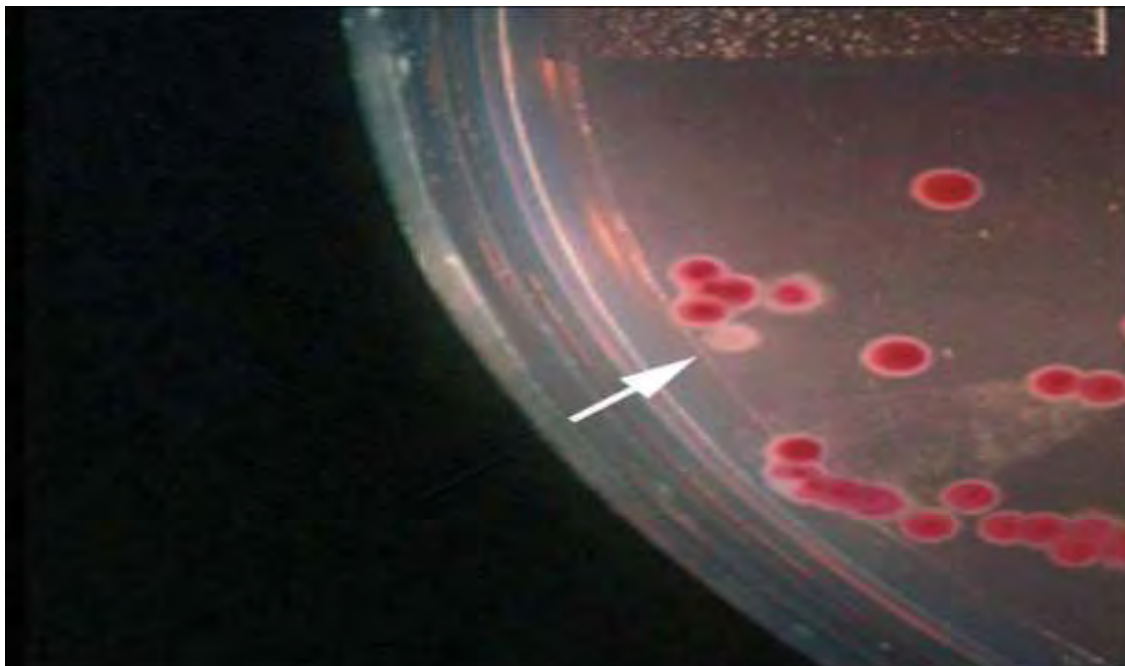
Η μικρότερη διάρκεια ζωής του μικροοργανισμού οφείλεται πιθανότατα στη μειωμένη βροχόπτωση, που είχε ως αποτέλεσμα την αφυδάτωση των κοπράνων. Η δυνατότητα επιβίωσης του παθογόνου για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα στα κόπρανα και στις κοπροσωρούς παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον κυρίως σε ότι αφορά στη μόλυνση των τροφίμων φυτικής προέλευσης αλλά και του νερού.

Άλλοι παράγοντες οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν την επιβίωση και την ανάπτυξη του μικροοργανισμού είναι: η εποχή [43,44], η ηλικία [45], το φύλο [46], η κατεύθυνση του ζώου, η διατροφή, ο τρόπος διαβίωσης, οι μετακινήσεις και ο χρόνος απογαλακτισμού του ζώου. Συγκεκριμένα, το παθογόνο παρατηρείται πιο συχνά την άνοιξη και το καλοκαίρι. Παρουσιάζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στα νεαρά ζώα που δεν έχουν γεννήσει πάνω από μια φορά, και αυτό δικαιολογείται λαμβάνοντας υπόψη ότι τα ενήλικα ζώα έχουν ένα πλήρες ανεπτυγμένο πεπτικό σύστημα, όπου ο συνδυασμός πτητικών λιπαρών οξέων και pH αναστέλλουν την ανάπτυξη των O157 STEC [47]. Τα αρσενικά ζώα παρουσιάζουν υψηλότερο επιπολασμό της *E. coli* O157:H7 σε σχέση με τα θηλυκά. Ο μικροοργανισμός παρατηρείται συχνότερα στα κρεατοπαραγωγά ζώα. Τέλος, η διαβίωση σε κοπάδια, το stress των μετακινήσεων και ο απογαλακτισμός με την ανάπτυξη της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας των προστομάχων (μεγάλης κοιλίας) αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη της *E. coli* O157:H7 στα βοοειδή.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ *E. COLI* O157:H7

### 2.1 Μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού

Η *E. coli* O157 είναι ένα αρνητικό κατά Gram, μη σπορογόνο και προαιρετικά αναερόβιο ραβδοειδές βακτήριο, με διαστάσεις 2μm μήκος και 0.8μm σε διάμετρο. Παρότι τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και οι βασικές βιοχημικές ιδιότητες της *E. coli* O157:H7 είναι τα τυπικά της *E. coli*, το κύριο βιοχημικό χαρακτηριστικό του ορότυπου αυτού είναι ότι αδυνατεί να ζυμώσει τη σορβιτόλη μέσα σε 24 ώρες σε τρυβλίο με Sorbitol MacConkey agar (SMAC) [48]. Η αδυναμία του αυτή έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση άχρωμων αποικιών σε ένα κατά τα άλλα ροζ πληθυσμό των οργανισμών που ζυμώνουν τη σορβιτόλη. (Εικόνα 1). Ακόμη, εμφανίζει μειωμένη έως καθόλου δραστηριότητα της β-γλυκουρονιδάσης και θετική αντίδραση στη ραφινόζη και στη δουλσιτόλη.



**Εικόνα 1.** *E. coli* O157:H7 σε ένα τρυβλίο με Sorbitol-MacConkey άγαρ. Το βέλος δείχνει τη διακριτή άχρωμη αποικία του *E. coli* O157:H7. (Tarr et al., 2005).

## 2.2 Αντιγονική δομή της *E. coli* O157:H7

Η αντιγονική δομή της *E. coli* O157 είναι η τυπική των Gram αρνητικών βακτηρίων. Αντιγονικές ιδιότητες έχουν πολλές από τις ουσίες του κυτταρικού τοιχώματος, της κάψας και των βλεφαρίδων και σε μικρότερο βαθμό οι ουσίες από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Οι κυριότερες ομάδες αντιγόνων που χρησιμεύουν για το διαχωρισμό της σε ορότυπους είναι οι εξής: αντιγόνα σωματικά ή αντιγόνα O, αντιγόνα βλεφαρίδων ή αντιγόνα H και αντιγόνα ελύτρου ή αντιγόνα K.

Το σωματικό O αντιγόνο είναι το σακχαριδικό μεταβαλλόμενο μέρος του τριμερούς λιποπολυσακχαριδικού (LPS) αντιγόνου που βρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα της *E. coli* και των άλλων Gram αρνητικών εντεροβακτηριακών. Βάσει αυτού η *E. coli* διαχωρίζεται σε πάνω από 170 O ορότυπους. Το υπόλοιπο τμήμα του μορίου του λιποπολυσακχαριδικού αντιγόνου είναι το λιπιδικό ή A-λιπίδιο το οποίο είναι η ενδοτοξίνη. Όλο αυτό το σύμπλεγμα είναι βιολογικά ενεργό όπως αποδεικνύεται πειραματικά.

Τα H αντιγόνα είναι ουσίες πρωτεϊνικές από τη φλαγγελίνη των βλεφαρίδων. Υπάρχουν περίπου 50 διαφορετικά H αντιγόνα στα διάφορα στελέχη της *E. coli*. Οι αντιγονικές διαφορές στο αντιγόνο αυτό οφείλονται στη διαφορά των αμινοξέων στο μόριο της φλαγγελίνης. Έχουν εξαιρετική ειδικότητα και δεν εμφανίζουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με τα H αντιγόνα των διαφόρων άλλων εντεροβακτηριακών όπως αυτό παρατηρείται με τα O αντιγόνα. Είναι ουσίες συγκεκριμένες και δεν υπάρχει μετάπτωση από τη μια φάση στην άλλη, είναι δηλαδή ενός μόνο είδους σε κάθε στέλεχος και αυτή είναι μια ιδιότητα μόνιμη χρωμοσωμικά καθορισμένη.

Τα K αντιγόνα δηλαδή κάψας ή ελύτρου είναι πολυσακχαρίδια ποικίλης δομής αλλά μερικά είναι πρωτεϊνικά. Είναι μάλλον μια ομάδα αντιγόνων που προέρχεται από τις δομές της επιφάνειας της *E. coli* ανεξάρτητα αν αυτές οι δομές είναι κάψα, μικροκάψα ή απλώς ουσίες της επιφάνειας της εξωτερικής μεμβράνης. Έχουν διαχωρισθεί 100 αντιγονικοί τύποι K αντιγόνων. Ο καθορισμός του



ορότυπου ενός στελέχους *E. coli* βασίζεται κυρίως στο O αντιγόνο και στο H αντιγόνο. Η *E. coli* O157:H7 διαθέτει το σωματικό αντιγόνο 157 και το βλεφαριδικό 7 [49].

Τα τελευταία χρόνια πάνω από 380 διαφορετικοί STEC ορότυποι έχουν απομονωθεί από ανθρώπους με γαστρεντερίτιδα, πολλοί από αυτούς τους ορότυπους είναι παρόμοιοι με αυτούς που έχουν απομονωθεί από τα ζώα [50]. Μεταξύ των STEC οροτύπων μόνο ένας συγκεκριμένος αριθμός φαίνεται να σχετίζεται με την εκδήλωση νόσου στον άνθρωπο. Οι ορότυποι διαφέρουν σε συχνότητα εμφάνισης ανάλογα με τη χώρα και το έτος, η λίστα περιλαμβάνει συνήθως ορότυπους του O όπως 26, 91, 103, 111, 113, 121, 145 και 157 [51]. Η *E. coli* O157:H7 είναι αυτή που εμφανίζεται συχνότερα στις εξάρσεις κρουσμάτων αλλά και στις σποραδικές περιπτώσεις ασθενών με σοβαρή εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων.

### 2.3 Παθογένεια

Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό της παθογένειας της *E. coli* O157 είναι η ικανότητα της να παράγει μια ή περισσότερες Shiga τοξίνες. Η Shiga τοξίνη 1 είναι πανομοιότυπη με τη Shiga τοξίνη που παράγεται από τη *Shigella dysenteriae* τύπου 1 ενώ η Shiga τοξίνη 2 εμφανίζει ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων μόνο κατά 56% με τη Shiga τοξίνη 1 [52]. Η Shiga τοξίνη 2 παρουσιάζει αρκετούς υποτύπους, οι οποίοι διαχωρίζονται μεταξύ τους μόνο με τη χρήση της PCR. Κυριότεροι είναι οι υπότυποι Stx2c και Stx2e, οι οποίοι διαφέρουν όχι μόνο αντιγονικά, αλλά και ως προς την κυτταροτοξική δράση τους πάνω στα νεφρά και όλα κύτταρα in vitro. Η Stx2e προκαλεί τη νόσο του οιδήματος στους χοίρους, ενώ η Stx2c θεωρείται παθογόνος για τον άνθρωπο.

Τα περισσότερα *E. coli* O157 στελέχη παράγουν Shiga τοξίνη 2, το ποσοστό το οποίο παράγει και Shiga τοξίνη 1, κυμαίνεται από 25% το οποίο παρατηρείται σε χώρες της Ευρώπης, μέχρι πάνω από 80% το οποίο βρίσκουμε σε χώρες της Βορείου Αμερικής και της Ιαπωνίας [53,54,55].

Οι βεροτοξίνες αποτελούνται από διαφορετικά πολυπεπίδια, το A (33kDa) και το B (7.5kDa) με αναλογία 1:5. Το B πολυπεπίδιο αποτελείται από ένα πενταμερές κυκλικού

σχήματος, με κεντρικό πόλο και είναι υπεύθυνο για τη σύνδεση της τοξίνης πάνω στους υποδοχείς των κυττάρων στόχων. Πρόκειται για γλυκολιπιδικά μόρια της μεμβράνης των κυττάρων και διακρίνονται στους Gb3 υποδοχείς ( globotriaosyl ceramide), που κυρίως μας ενδιαφέρουν αφού συνδέονται με τις Stx1 και Stx2, στους Gb4 ( globotetraosyl ceramide), που συνδέονται με την Stx2e και σε υποδοχείς για τους υπόλοιπους Stx2 υποτύπους [56]. Gb3 υποδοχείς υπάρχουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, στα κύτταρα των λείων μυικών ινών, στα ερυθρά αιμοσφαίρια και στα κύτταρα του νεφρικού ιστού.

Η σύνδεση των βεροτοξινών με τους υποδοχείς ακολουθείται από την είσοδο της A υπομονάδας στο εσωτερικό των κυττάρων και το διαχωρισμό της σε δυο μέρη [57]. Στο μεγαλύτερο και ενζυμικώς ενεργό A1 τμήμα (28kDa), το οποίο έχοντας δράση N-γλυκοσιδάσης ενώνεται με το RNA και προκαλεί αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης του κυττάρου. Και στο μικρότερο A2 τμήμα (4kDa), το οποίο συνδέει το A1 τμήμα με το B.

Τα υπεύθυνα για την παραγωγή των βεροτοξινών γονίδια, εντοπίζονται σε λάμδα φάγους. Η προσάρτηση των φάγων από κάποια βακτηριακά στελέχη, επιτρέπει την *in vitro* και πιθανότατα και την *in vivo* μεταφορά των γονιδίων αυτών.

Η παραγωγή Shiga τοξίνης από μόνη της δεν είναι ικανή να προκαλέσει νόσο. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες, οι οποίοι συμβάλλουν στη μολυσματικότητα της *E. coli* O157 είναι το 60-MDa πλασμίδιο καθώς και ένα τμήμα του βακτηριακού χρωμοσώματος, γνωστό ως LEE ( locus for enterocyte effacement).

Ο ρόλος του 60MDa πλασμιδίου συνίσταται στη διευκόλυνση της προσκόλλησης του βακτηριδίου στον εντερικό βλεννογόνο [58]. Οι ερευνητές συνέδεσαν την παρουσία του πλασμιδίου με την παραγωγή ορισμένων βλεφαριδικών αντιγόνων, τις φίμπριες, τα οποία συμμετέχουν στον αποικισμό του εντέρου. Αυτή η άποψη αμφισβητείται σήμερα, κυρίως μετά την ανεύρεση του pO157 και σε ακίνητα στελέχη STEC [59]. Η πρόσφατη μάλιστα ολοκλήρωση της γενετικής αποκωδικοποίησης του πλασμιδίου ενισχύει τις αμφιβολίες αυτές, ενώ παράλληλα

επιβεβαιώνει τη συμμετοχή του στην παραγωγή της εντεροαιμολυσίνης (*hly*), ενός εκκριτικού συστήματος πρωτεϊνών τύπου II, ενός συστήματος καταλάσης-υπεροξειδάσης και μιας πρωτεάσης της σερίνης [60].

Παρόλα αυτά, ο ακριβής ρόλος του πλασμιδίου και η σημασία του για την εξέλιξη της νόσου δεν είναι ακόμη γνωστά και η δημοσίευση άλλωστε αρκετών διαφορούμενων μελετών αποδεικνύει την ανάγκη επιπλέον διερεύνησης.

Το LEE είναι υπεύθυνο για την παραγωγή και έκκριση μιας σειράς πρωτεϊνών και ειδικότερα της ιντιμίνης (*intimin*), η οποία κωδικοποιείται μέσω του γονιδίου *eae*, και θεωρείται απαραίτητη για την προσκόλληση (*attaching*) στο εντερικό επιθήλιο και την εξάλειψη (*effacing*) των μικρολαχνών του εντέρου [61]. Συγκεκριμένα, η προσκόλληση στο εντερικό επιθήλιο χαρακτηρίζεται από εναγκαλισμό των βακτηρίων από τις εντερικές λάχνες, κυρίως στις περιοχές των κρυπτών του τυφλού και του κόλου, και τη δημιουργία έτσι βοθροειδών μορφωμάτων. Κάτω ακριβώς από τα σημεία αυτά παρατηρείται καταστροφή ή αποκόλληση των επιθηλιακών κυττάρων με εξάλειψη των μικρολαχνών και κυτταροσκελετικές μεταβολές, με σημαντικότερη τη συσσώρευση πολυμερισμένης ακτίνης [62, 63]. Η ακτίνη αποτελεί δομικό τμήμα του σκελετού του επιθηλιακού κυττάρου και η καταστροφή της έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή προώθηση του μικροβίου πάνω στην κυτταρική μεμβράνη και τη στενή σύνδεσή του με το εντερικό επιθήλιο [64]. Οι αλλοιώσεις αυτές είναι υπεύθυνες τις επόμενες ημέρες για την εμφάνιση εξελκώσεων και οίδημάτων και βέβαια για τη μεταβολή της διαπερατότητας των κυττάρων και την πρόκληση διάρροιας [65]. Η στενή σύνδεση μεταξύ μικροβίου και ξενιστή υποβοηθά την απελευθέρωση των τοξινών στον υποβλεννογόνο ιστό του εντέρου, τη βλάβη των μικρών αιμοφόρων αγγείων και τελικά την απώλεια αίματος και την εκδήλωση αιμορραγικής διάρροιας.

## 2.4 Δευτερεύοντες παθογενετικοί μηχανισμοί της *E. coli* O157:H7

### 2.4.1 Εντεροαιμολυσίνη (hly).

Η ανίχνευση της εντεροαιμολυσίνης αφορά τη συντριπτική πλειοψηφία των στελεχών της *E. coli* O157:H7 και το 90% περίπου των υπολοίπων STEC [66]. Τα στελέχη αυτά δεν εμφανίζουν αιμολυτικές ιδιότητες σε απλό αιματούχο άγαρ, αλλά μόνο σε καλλιέργειες ερυθρών αιμοσφαιρίων προβάτου όπου έγινε προσθήκη ιόντων  $\text{Ca}^{+2}$  μετά από επώαση μιας ημέρας. Η παραγωγή της εντεροαιμολυσίνης καθορίζεται γενετικά από το πλασμίδιο pO157, αντίθετα από την α-αιμολυσίνη των υπολοίπων *E. coli* που κωδικοποιείται χρωμοσωμικά [67]. Πρέπει να αναφερθεί πάντως πως υπάρχει αρκετά μεγάλη ομολογία (60%) ανάμεσα στο τμήμα του DNA που κωδικοποιεί την εντεροαιμολυσίνη και στο αντίστοιχο τμήμα του DNA της α-αιμολυσίνης κάτι που πιθανόν να σχετίζεται και με κοινές παθογενετικές ιδιότητες [68].

Ο τρόπος με τον οποίο η εντεροαιμολυσίνη συμβάλλει στην παθογένεια της O157 δεν είναι γνωστός. Η προσφορά των ιόντων σιδήρου που ακολουθεί την απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης, φαίνεται να ενισχύει την ανάπτυξη της *E. coli* στον εντερικό βλεννογόνο χωρίς όμως να αποτελεί τη μόνη δράση της [60]. Άλλωστε η δράση της ομάδας των RTX τοξινών, στις οποίες ανήκει και η εντεροαιμολυσίνη, δεν φαίνεται να περιορίζεται στην καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων [69] καθώς θεωρείται τοξική και για άλλους τύπους κυττάρων [70] ενώ ιδιαίτερα για την α-αιμολυσίνη έχει αποδειχτεί η τοξικότητά της στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα κύτταρα των ουροφόρων σωληναρίων του νεφρού [71]. Παρά ταύτα, η υπόθεση ότι η εντεροαιμολυσίνη εμπλέκεται ενεργά, όπως οι βεροτοξίνες στην παθογένεια των εντεροαιμορραγικών *E. coli*, δεν έχει ακόμα αποδειχτεί με απευθείας χρήση της εντεροαιμολυσίνης *in vivo* [72].

Ο κυριότερος λόγος που η εντεροαιμολυσίνη προσελκύει την επιστημονική έρευνα δεν έχει να κάνει τόσο με τον τρόπο δράσης της, όσο με τη στενή σχέση που φαίνεται να υπάρχει ανάμεσα στην παραγωγή της και στην παραγωγή των βεροτοξινών, ιδιαίτερα στα στελέχη O157 [73]. Ο Scmidt και οι συνεργάτες του, το 1995, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της PCR για την ανίχνευση της

εντεροαιμολυσίνης σε διαρροϊκά στελέχη *E. coli* παρατήρησε ότι όλα, και τα 22 στελέχη O157, καθώς και 12 από τα 25 στελέχη STEC άλλων οροτύπων, ήταν θετικά στην παραγωγή εντεροαιμολυσίνης. Αντίθετα, τα μη βεροτοξινογόνα στελέχη της *E. coli* ήταν όλα αρνητικά. Το εύρημα αυτό μπορεί να θεωρηθεί ιδιαίτερης σημασίας καθώς μπορεί να αποτελέσει ένα γρήγορο τρόπο αναγνώρισης της παρουσίας των STEC [74]. Τα στελέχη εκείνα που προκαλούν αιμόλυση, τόσο σε πλυμένα ερυθρά αιμοσφαίρια (προϊόν αίματος μετά την αφαίρεση του πλάσματος, των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων μέσω φυκοκέντρωσης), όσο και σε μη πλυμένα ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου, παράγουν α-αιμολυσίνη, ενώ εκείνα που δρουν μόνο έναντι πλυμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων παράγουν μόνο εντεροαιμολυσίνη και επομένως τείνουν να θεωρηθούν ως βεροτοξινογόνα [75].

#### **2.4.2 Πρωτεάση της σερίνης (EspP).**

Η εξωκυτταρική αυτή πρωτεΐνη έχει μέγεθος, στην τελική της μορφή, 104kDa και κωδικοποιείται επίσης από το πλασμίδιο pO157 [76]. Αν και αναγνωρίστηκε πρόσφατα, οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν πως η πρωτεάση της σερίνης επιτείνει με την πρωτεολυτική της δράση την υπάρχουσα αιμορραγική κολίτιδα [77]. Η EspP είναι τοξική έναντι των βεροκυττάρων ενώ έχει βρεθεί ότι προκαλεί καταστροφή του ανθρώπινου παράγοντα πήξης V [78]. Να τονίσουμε ότι αν και η έκκρισή της δεν επιβεβαιώνεται σε όλα τα εντεροαιμορραγικά στελέχη της *E. coli*, ανιχνεύθηκε από τον Brunder και τους συνεργάτες του, το 1997, σε τέσσερα από τα έξι στελέχη O157 και σε ένα από τα δυο O126 [79]. Ειδικά αντισώματα ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 80% στον ορό των ασθενών με λοίμωξη από STEC [80].

### 2.4.3 Θερμοανθεκτική εντεροτοξίνη EAST1.

Η εντεροτοξίνη αυτή ανιχνεύθηκε αρχικά σε στελέχη των εντεροαθροιστικών EaggEC στελεχών, και βρέθηκε ότι διαφέρει από τη θερμοανθεκτική τοξίνη των STEC [81]. Θεωρείται ότι συμμετέχει στην πρόκληση της υδαρής διάρροιας που χαρακτηρίζει αρκετές φορές τα πρώτα στάδια της λοίμωξης και κωδικοποιείται από το γονίδιο *astA* [80]. Πρόσφατα παρουσιάστηκε η δημιουργία ενός ειδικού *astA* μοριακού ανιχνευτή, ο οποίος έδωσε θετική αντίδραση υβριδισμού σε όλα τα στελέχη O157 που εξετάστηκαν και με τα περισσότερα από τα υπόλοιπα STEC στελέχη [82].

### 2.5 Το γονιδίωμα της *E. coli* O157:H7

Η γονιδιακή ακολουθία δυο επιδημικών στελεχών της *E. coli* O157:H7, του EDL 933 [83] και του Sakai [84] έχουν ήδη δημοσιευθεί, και αντίστοιχες έρευνες που αφορούν στη γονιδιακή ακολουθία του O157 είναι έτοιμες να δημοσιευθούν στο εγγύς μέλλον. Το EDL και το Sakai γονιδιώματα έχουν μέγεθος της τάξης του 5.5 Mb, σε σύγκριση με τα 4.6Mb του μεγέθους της *E. coli* K-12 στελέχους MG1655, και τα τρία γονιδιώματα μοιράζονται έναν κοινό σκελετό της τάξης των 4.1 Mb. Τα O157 γονιδιώματα διαθέτουν περίπου 1.34 εκατομμύρια ζευγάρια βάσεων περισσότερα από ότι το K-12 γονιδίωμα, ενώ το K-12 γονιδίωμα περιέχει περίπου μισό εκατομμύριο βάσεις που δεν υπάρχουν στο O157 γονιδίωμα. Στο EDL 933 γονιδίωμα, για παράδειγμα, τα 1.34 Mb του DNA τα οποία δεν υπάρχουν στο K-12 γονιδίωμα, περιέχουν 1387 γονίδια τα οποία οργανώνονται σε 177 κασσετικά γένη μεγαλύτερα από 50 bp σε μέγεθος (γνωστά ως O- islands) τα οποία αποκτήθηκαν πιθανότατα από οριζόντια μεταφορά. Πολλά από τα O-island, τα οποία είναι βακτηριοφαγικής αρχής, περιέχουν μολυσματικά γονίδια, τα οποία περιλαμβάνουν τις VT μετατροπείς βακτηριοφάγων και το LEE το οποίο κωδικοποιεί τα δομικά, συμπληρωματικά και τελικά μόρια του τύπου III εκκριτικού συστήματος (TTTS), του οποίου η δράση έχει ως αποτέλεσμα την προσκόλληση στο εντερικό κύτταρο και την εξάλειψη των μικρολαχνών των εντερικών λαχνών.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ *E. COLI* O157:H7 ΚΑΙ NON-O157 STEC**

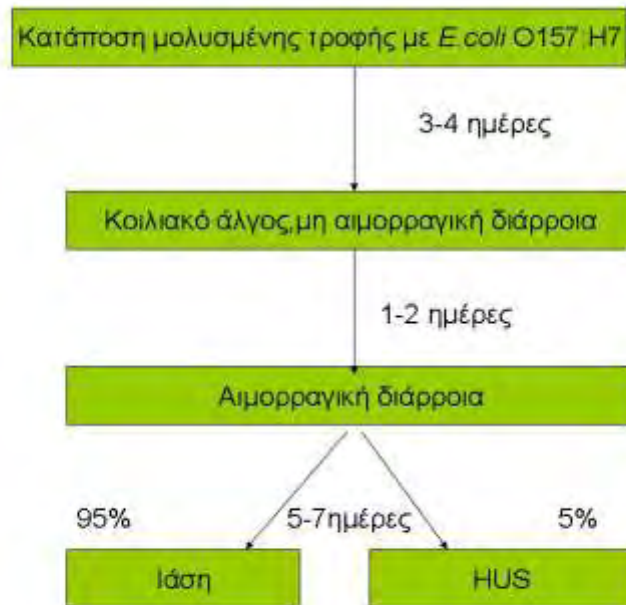
### **3.1 Κλινική εικόνα λοίμωξης από *E. coli* O157:H7**

Η λοίμωξη από *E. coli* O157:H7 εμφανίζει μεγάλο φάσμα κλινικών εκδηλώσεων, από ασυμπτωματική προσβολή, διάρροια, αιμορραγική κολίτιδα μέχρι την εμφάνιση συστηματικής νόσου. Σοβαρές επιπλοκές όπως το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο, η θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα και εκδηλώσεις από το νευρικό και το καρδιαγγειακό σύστημα μπορεί να ακολουθήσουν μετά τη λοίμωξη από *E. coli* O157:H7. Ιδιαίτερη ευαισθησία παρατηρείται σε ασθενείς μικρής ηλικίας, σε υπερήλικες και σε άτομα με ανοσοκαταστολή, στα οποία η νόσος μπορεί να είναι θανατηφόρος.

Ο μέσος χρόνος μεταξύ της έκθεσης και της εκδήλωσης των συμπτωμάτων είναι 3 ημέρες, ο χρόνος επώασης κυμαίνεται από 1-8 ημέρες. Οι περισσότεροι ασθενείς με αιμορραγική κολίτιδα αναρρώνουν εντός μιας εβδομάδας (σχήμα 2).

Η νόσος τυπικά εμφανίζεται με κοιλιακό άλγος και μη αιμορραγική διάρροια. Οι αιμορραγικές κενώσεις μπορεί να εμφανιστούν μετά από 1-2 ημέρες, με την ποσότητα του αίματος να είναι από μερικές σταγόνες αίματος έως αιμορραγία. Περίπου το 70% των ασθενών αναφέρει αιμορραγική διάρροια [54]. Εμετός παρουσιάζεται στο 30-60% των περιπτώσεων και χαμηλός πυρετός στο 30% συνήθως των περιπτώσεων. Η απουσία πυρετού μπορεί να οδηγήσει τους κλινικούς στη διαφοροδιάγνωση με αίτια μη λοιμώδους αιτιολογίας, όπως ο εγκολεασμός, η ισχαιμική κολίτιδα, η αιμορραγία ή η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου.

Το ποσοστό των περιπτώσεων που καταλήγουν σε αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS) κυμαίνεται από 3-7% στις σποραδικές περιπτώσεις [85] και σε 20% ή παραπάνω στις επιδημίες [86]. Το HUS διαγιγνώσκεται έξι ημέρες μετά την εμφάνιση της διάρροιας [87].



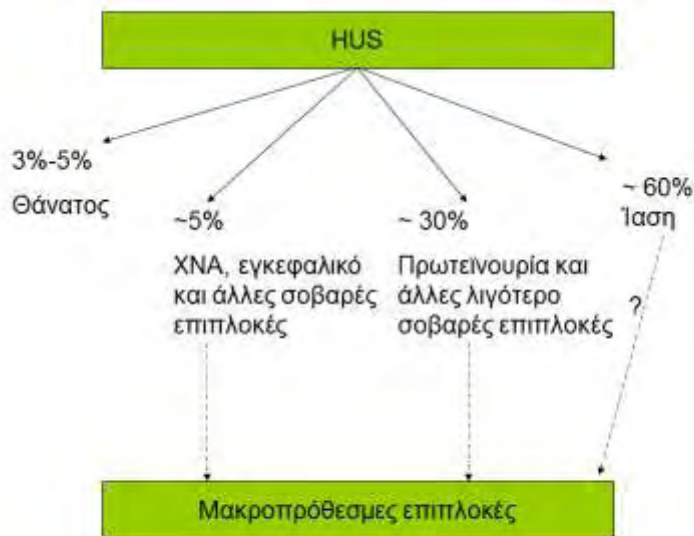
**Σχήμα 2.** Κλινική πορεία της λοίμωξης από *E. coli* O157:H7 (Mead και Griffin, 1998).

Το HUS ορίζεται ως εμφάνιση οξείας νεφρικής ανεπάρκειας που εκδηλώνεται με ολιγουρία ή ανουρία και υψηλές συγκεντρώσεις ουρίας και κρεατινίνης στο αίμα, χαμηλά αιμοπετάλια λιγότερα από  $15 \times 10^9 / L$  και μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία με αιμοσφαιρίνη  $< 10 \text{ gr/dL}$  και κατατμημένα ερυθρά αιμοσφαίρια στο περιφερικό αίμα. Οι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης HUS είναι η χρήση αντιδιαρροϊκών, η αιμορραγική διάρροια, ο πυρετός, ο εμετός, τα αυξημένα λευκά αιμοσφαίρια, οι ακραίες ηλικίες, ιδιαίτερα τα παιδιά κάτω των πέντε ετών και το θήλυ φύλο [88-90].

Περίπου το 50% των ασθενών με HUS θα χρειαστεί αιμοκάθαρση και το 75% θα χρειαστεί μετάγγιση αίματος. Αιφνίδιες νευρολογικές επιπλοκές όπως το εγκεφαλικό, οι σπασμοί και το κώμα αναπτύσσονται στο 25% των ασθενών. Σπάνιες επιπλοκές περιλαμβάνουν την παγκρεατίτιδα, το σακχαρώδη διαβήτη, την πλευριτική και την περικαρδιακή συλλογή υγρού. Μεταξύ των ασθενών με HUS, περίπου το 3-5% θα πεθάνει και παρόμοιο ποσοστό θα αναπτύξει νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Πολλοί από τους ασθενείς που ανακτούν τη νεφρική τους λειτουργία παρουσιάζουν χρόνια



πρωτεϊνουρία και μερικοί αναπτύσσουν τελικά αρκετά χρόνια αργότερα χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. (σχήμα 3)



**Σχήμα 3.** Κλινική πορεία του μεταδιαρροϊκού αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου. (Mead και Griffin, 1998).

Αναφέρονται περιπτώσεις στις οποίες οι ασθενείς με *E. coli* O157:H7, διαγιγνώσκονται με θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα (TTP), μια κατάσταση παρόμοια με το HUS, αλλά με πιο έντονη νευρολογική συμπτωματολογία και μικρότερη σε έκταση νεφρική βλάβη. Χαρακτηρίζεται από μια πεντάδα συμπτωμάτων όπως η θρομβοπενία, η μικροαγγειακή αιμολυτική αναιμία, ο πυρετός, η νεφρική ανεπάρκεια και τα νευρολογικά συμπτώματα. Ουσιαστικά, πρόκειται για μια πιο ευρεία κλινική εικόνα της αγγειακής βλάβης που προκαλούν οι βεροτοξίνες σε σχέση με το HUS, με το οποίο άλλωστε είναι δύσκολη η διαφοροποίησή τους.

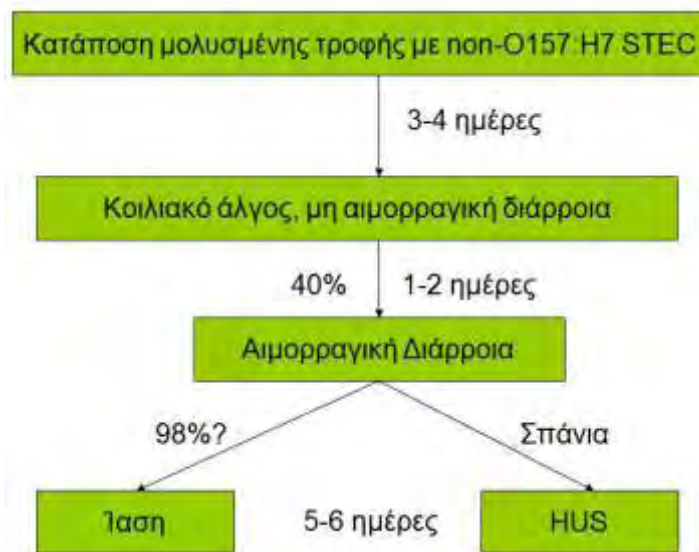
### 3.2 Παθογένεια και κλινική εικόνα λοίμωξης από non-O157 STEC

Ο σημαντικότερος λοιμογόνος παράγοντας που συμβάλλει στην παθογένεια των non-O157 όπως και στην *E. coli* O157:H7 είναι η παραγωγή Stx1, Stx2, ή και των δυο [91]. Τα στελέχη τα οποία παράγουν μόνο Stx2 ή Stx1 και Stx2 προκαλούν σοβαρότερη νόσο συγκριτικά με εκείνα που παράγουν μόνο Stx1 [66]. Η τοξική δράση οφείλεται στη σύνδεση της τοξίνης στα κύτταρα του ξενιστή, διευκολύνοντας έτσι τη μεταφορά των τοξινών ενδοκυττάρια. Μόλις η τοξίνη εισέλθει στα κύτταρα του ξενιστή η A-υποομάδα της τοξίνης, με ενζυμική δραστηριότητα, αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή και ξεκινά η απάντηση στο λοιμώδη παράγοντα. Εκτός των Shiga τοξινών, τα λοιμογόνα STEC στελέχη που απομονώθηκαν από κλινικές περιπτώσεις συχνά περιέχουν την ιντιμίνη (*eae*), μια πρωτεΐνη σημαντική για την προσκόλληση και την πρόκληση βλάβης στα επιθηλιακά κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα, και την εντεροαιμολυσίνη (*hly*). Σε αρκετές βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις περιγράφεται η δράση των λοιμογόνων παραγόντων σε μεγαλύτερο βάθος [52]. Μερικά στελέχη των non-O157 STEC παρότι δεν φέρουν τα γονίδια για την ιντιμίνη και την εντεροαιμολυσίνη είναι ικανά να προκαλέσουν νόσο στον άνθρωπο [92]. Για το λόγο αυτό προτάθηκε κάθε STEC στέλεχος να θεωρείται εν δυνάμει EHEC [93].

Η λοίμωξη από non-O157 STEC περιλαμβάνει ήπιες εκδηλώσεις όπως το κοιλιακό άλγος και η διάρροια μπορεί όμως να οδηγήσει και σε σοβαρές επιπλοκές όπως η αιμορραγική κολίτιδα, το HUS και ο θάνατος (σχήμα 4). Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η λοίμωξη αποδράμει χωρίς σοβαρές επιπλοκές.

Σε μια μελέτη σειράς διάρκειας δυο ετών στον Καναδά όπου μελετήθηκαν 5415 σποραδικές περιπτώσεις διάρροιας, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην κλινική εικόνα μεταξύ των ασθενών με λοίμωξη από non-O157 STEC και αυτών με λοίμωξη από O157 [94]. Οι ασθενείς με λοίμωξη από non-O157 παρουσίαζαν διάρροια για περισσότερες ημέρες 9.1 έναντι 5.7 ημέρες, ήταν όμως λιγότερο συχνά αιμορραγική με ποσοστό 42% έναντι 97% των ασθενών με λοίμωξη από O157, αποδεικνύοντας παρόλα αυτά ότι η αιμορραγική διάρροια δεν αποτελεί αποκλειστικό

χαρακτηριστικό των O157 αλλά και των non-O157 STEC λοιμώξεων. Αντίθετα, το κοιλιακό άλγος, ο εμετός και ο πυρετός πάνω από 38 °C δεν διέφεραν στις δυο κατηγορίες ασθενών.



Σχήμα 4. Κλινική πορεία της λοίμωξης από *E. coli* O157:H7

### 3.3 Σύγκριση της κλινικής εικόνας από λοίμωξη με *E. coli* O157:H7 και non-O157 STEC

Μια σειρά από μελέτες υπογραμμίζουν το γεγονός ότι οι κλινικές εκδηλώσεις της λοίμωξης από non-O157 STEC είναι λιγότερο σοβαρές σε σχέση με αυτές που προκαλεί η *E. coli* O157:H7 [95, 96]. Στους ασθενείς με λοίμωξη από *E. coli* O157:H7 απαιτείται νοσηλεία σε ποσοστό 46.2%, αναπτύσσεται αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο σε ποσοστό 6.3% και η θνητότητα υπολογίζεται στο 0.5%, τα ποσοστά για τη λοίμωξη από non-O157 STEC είναι 12.8%, 1.7% και 0.3% αντίστοιχα [96,97]. Μεταξύ των λοιμώξεων από non-O157 STEC, οι πιο συνηθισμένοι ορότυποι που υποχρεώνουν τους ασθενείς σε εισαγωγή τους στο νοσοκομείο είναι ο O26, O45, O103, O111, O121 και O145 [98].

Μελέτες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε διάφορες χώρες αποδεικνύουν ότι η λοίμωξη από *E. coli* O157:H7 θεωρείται περισσότερο σοβαρή από τη λοίμωξη με non-O157 STEC, χωρίς όμως να υποτιμούν και τη δεύτερη. Σε μια αναδρομική μελέτη στην Ουγγαρία το 63% των ασθενών με λοίμωξη από *E. coli* O157:H7 παρουσίασε αιμορραγική διάρροια ή αιμορραγική κολίτιδα έναντι

46% αυτών με λοίμωξη από non-O157 STEC. Στην ίδια μελέτη, δυο ασθενείς με STEC O26:H111 εκδήλωσαν αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο [99]. Σε άλλη μελέτη στη Γερμανία, το 66.4% των ασθενών με λοίμωξη από *E. coli* O157:H7 ή *E. coli* O157:H-, παρουσίασε αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο. Το STEC O26 προκάλεσε αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο σε ποσοστό 13% [100]. Μεταξύ των λιγότερο σοβαρών περιπτώσεων, αυτών δηλαδή με διάρροια χωρίς HUS, η *E. coli* O157:H7 απομονώθηκε στο 35.5% των περιπτώσεων ενώ τα non-O157 STEC στο 64.5%. Παρόμοια σε μια μελέτη πασχόντων-μαρτύρων στην Αργεντινή, η *E. coli* O157:H7 απομονώθηκε στο 60% των περιπτώσεων με HUS [101].

Αντίθετα με τις προηγούμενες μελέτες, κάποιες άλλες έρευνες καταγράφουν τα non-O157 STEC ως συχνότερο αίτιο πρόκλησης σοβαρής λοίμωξης και HUS σε σχέση με την *E. coli* O157:H7. Για παράδειγμα σε μια μελέτη στη Γερμανία η λοίμωξη από non-O157 STEC οδήγησε σε αιμορραγική διάρροια και HUS το 39.2% και το 47.6% των περιπτώσεων αντίστοιχα, ποσοστά παρόμοια με αυτά της λοίμωξης από *E. coli* O157:H7 [102]. Στη Δανία, το 55.2% των περιπτώσεων με αιμορραγική διάρροια και το 47.6% με HUS, είχαν μολυνθεί από non-O157 STEC [103]. Στην Ελβετία, τα STEC απομονώθηκαν σε ποσοστό 60% όλων των περιπτώσεων με αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο, 75% ήταν non-O157 STEC [104]. Σε παλαιότερη μελέτη στην Αυστραλία, το STEC O111 αποδείχθηκε ως η κύρια αιτία ανάπτυξης αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου, ενώ η *E. coli* O157:H7 δεν είχε απομονωθεί σε καμία περίπτωση [105]. Σε πρόσφατες μελέτες οι ορότυποι που συναντούμε συχνότερα, είναι οι O157, O111, O26, O113, O55 και O86, με τον O157 να αποτελεί μακράν τον πιο συνηθισμένο [106].

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ *E. COLI* O157:H7 ΚΑΙ ΤΩΝ NON-O157 ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ**

### **4.1 Επιδημίες και εξάρσεις κρουσμάτων στους ανθρώπους**

#### **4.1.1 Επιδημίες και εξάρσεις κρουσμάτων από *E. coli* O157:H7 στην Ελλάδα και στον κόσμο**

Σύμφωνα με τα τελευταία δημοσιευμένα δεδομένα του Ευρωπαϊκού Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, η μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση της λοίμωξης από STEC για το χρονικό διάστημα 2004- 2011 ήταν 0,06 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμού στην Ελλάδα ενώ στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και στις χώρες της ΕΕΑ/ΕFTA (European Economic Area/European Free Trade Association) το 2009 ήταν 8,6 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμού. Επομένως, από τα μέχρι τώρα στοιχεία προκύπτει ότι η *E.coli* O157:H7 δεν φαίνεται να σχετίζεται με εξάρσεις κρουσμάτων και επιδημίες στη χώρα μας και οι περιπτώσεις που έχουν καταγραφεί είναι σποραδικές.

Τα πράγματα όμως είναι διαφορετικά στις υπόλοιπες χώρες. Κατά τη χρονική περίοδο από το 1982 έως και το 2002, καταγράφονται συνολικά 350 εξάρσεις κρουσμάτων σε 49 πολιτείες των ΗΠΑ που οφείλονται αποκλειστικά στην *E. coli* O157:H7. Από αυτές οι 183 (52%) ήταν τροφιμογενείς, οι 74 (21%) αγνώστου αιτιολογίας, οι 50 (14%) προήλθαν με μετάδοση από άτομο σε άτομο, οι 31 (9%) ήταν υδατογενείς, οι 11 (3%) προέρχονταν από επαφή με ζώο και μία (0.3%) συνδέθηκε με μόλυνση ενός εργαζόμενου στο εργαστήριο [107].

Τον Ιανουάριο του 1993 περιγράφεται μια μεγάλη επιδημία από *E. coli* O157, σε 4 πολιτείες της Αμερικής, μετά από κατανάλωση βόειου κιμά. Νόσησαν πάνω από 700 άτομα, κυρίως παιδιά, πάνω από το ένα τέταρτο αυτών χρειάστηκε νοσηλεία, αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο αναπτύχθηκε στο 7.5%, ενώ πέθαναν τέσσερα [80]. Το γεγονός συνδέθηκε με τη βρώση μη καλά μαγειρεμένου χάμπουργκερ από αλυσίδα εστιατορίων. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην ανάκληση πάνω από 250.000 χάμπουργκερ από την αγορά, ώστε να αποφευχθούν επιπλέον νοσηλείες και θάνατοι [108].

Την περίοδο Ιουλίου-Σεπτεμβρίου του 2007 ανακλήθηκαν περίπου 11 εκατομμύρια κιλά κατεψυγμένου μπιφτεκιού έπειτα από έρευνα της αμερικάνικης υπηρεσίας ελέγχου τροφίμων και ποτών σε μια επιδημία από *E. coli* O157:H7 σε 8 πολιτείες της Αμερικής. Τριάντα τρεις (89%) από τους 37 ασθενείς που εξετάστηκαν με αναλυτικό ερωτηματολόγιο ανέφεραν ως κοινό παράγοντα την κατανάλωση μπιφτεκιού. Από τα 33 άτομα 21 (64%) νοσηλεύτηκαν, δυο ανέπτυξαν αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο ενώ δεν αναφέρθηκαν θάνατοι [109]. Μια ακόμη επιδημία που οφείλονταν στην κατανάλωση μπιφτεκιού έλαβε χώρα στις ΗΠΑ την περίοδο Μαΐου-Ιουλίου του 2008, νόσησαν συνολικά 49 άτομα από τα οποία νοσηλεύτηκαν 27, ένα ανέπτυξε αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο, ενώ και σε αυτή την περίπτωση δεν αναφέρθηκαν θάνατοι [110].

Σε άλλη επιδημία στην Αμερική, το 1994, αυτή τη φορά από βρώση λουκάνικου μολυσμένου με *E. coli* O157:H7, νόσησαν 23 άτομα και στο 13% όσων μολύνθηκαν αναπτύχθηκε αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο [111]. Μετά την επιδημία αυτή το αμερικάνικο κράτος οδηγήθηκε στην καθιέρωση κανονισμών που αφορούσαν στα προϊόντα που υφίστανται ζύμωση πριν την κατανάλωση.

Την περίοδο Νοεμβρίου-Δεκεμβρίου του 1996 στη Σκωτία μετά από κατανάλωση μικρογεύματος σε μπαζάρ φιλανθρωπικού σκοπού, νόσησαν συνολικά 345 άτομα, 34 ανέπτυξαν αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο και 16 άνθρωποι πέθαναν. Ως υπεύθυνο για αυτή την επιδημία θεωρήθηκε το κρέας που είχε επιμολυνθεί με *E. coli* O157:H7 [112].

Πέρα από τα προϊόντα του κρέατος ένα προϊόν που έχει ερευνηθεί αρκετά και έχει θεωρηθεί υπεύθυνο για την εμφάνιση επιδημιών, είναι το γάλα. Το 1987 ξέσπασε στον Καναδά μια επιδημία γαστρεντερίτιδας και αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου η οποία αποδόθηκε για πρώτη φορά στην ανεπαρκή παστερίωση του γάλακτος. Το ίδιο στέλεχος απομονώθηκε τόσο από τους ασθενείς, όσο και από τις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες των ύποπτων εκτροφών [113]. Μια μεγάλη επιδημία με περισσότερα από 100 κρούσματα που οφειλόταν στην επιμόλυνση του γάλακτος μετά την παστερίωση σημειώθηκε στη Σκωτία το 1994, ενώ την ίδια χρονιά σε μια άλλη περίπτωση

ενοχοποιήθηκε το τυρί από νωπό αγελαδινό γάλα. Η κατανάλωση τυριού θεωρήθηκε υπεύθυνη και σε μια προγενέστερη επιδημία στη Γαλλία το 1992, κατά την οποία, από τα τρία παιδιά, που ανέπτυξαν HUS το ένα απεβίωσε τελικά [114].

Τα φυτικά προϊόντα σχετίζονται με επιδημίες από *E. coli* O157:H7 παγκοσμίως. Από το 1995 έως το 2006 καταγράφονται συνολικά 22 εξάρσεις κρουσμάτων που οφείλονται στην *E. coli* O157:H7 και σχετίζονται με την κατανάλωση μαρουλιών και άλλων λαχανικών. Μια μεγάλη επιδημία περιγράφηκε τον Ιούλιο του 1995 στη Μοντάνα των ΗΠΑ, η οποία επιβεβαιώθηκε και εργαστηριακά με την απομόνωση της *E. coli* O157:H7 σε 40 κατοίκους. Υπεύθυνος παράγοντας για την επιδημία αυτή θεωρήθηκε η κατανάλωση ωμού μαρουλιού [115]. Μετά από αυτή την επιδημία, σε τέσσερις ακόμη ανιχνεύθηκε η *E. coli* O157:H7 ως αιτιολογικός παράγοντας λοίμωξης μετά την κατανάλωση μαρουλιού [116-118]. Σε άλλη επιδημία το 1980 περιγράφεται συσχέτιση της εμφάνισης οξέος αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου με την κατανάλωση φρέσκου χυμού μήλου μολυσμένου με STEC [119]. Επίσης, ο μη παστεριωμένος χυμός μήλου αποτέλεσε το αίτιο σε μια άλλη έξαρση κρουσμάτων που περιγράφηκε το 1993 [15].

Η μεγαλύτερη επιδημία από προϊόντα φυτικής προέλευσης μολυσμένα με *E. coli* O157:H7 συνέβει τον Ιούλιο του 1996 σε ένα σχολείο στη Sakai της Ιαπωνίας. Στην επιδημία αυτή ασθένησαν περίπου 12.680 άτομα, 121 ασθενείς ανέπτυξαν αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο και τρία κορίτσια πέθαναν. Το τρόφιμο το οποίο συσχετίστηκε με την επιδημία ήταν τα ραπανάκια, το οποίο ταυτοποιήθηκε και εργαστηριακά [120].

Κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού του 2005, ανιχνεύθηκε μια μεγάλη επιδημία από *E. coli* O157 στις σκανδιναβικές χώρες και συγκεκριμένα στη Σουηδία. Συνολικά ασθένησαν 135 άτομα από τα οποία τα 11 ανέπτυξαν αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο, δεν αναφέρονται θάνατοι. Επιδημιολογικές έρευνες συσχετίζουν την επιδημία με την κατανάλωση μαρουλιού.

Την περίοδο Αύγουστου-Σεπτεμβρίου του 2006 περιγράφεται μια έξαρση κρουσμάτων στις ΗΠΑ, μετά από κατανάλωση προπαρασκευασμένου σπανάκι. Στην επιδημία αυτή, αναφέρονται

συνολικά 205 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις και τρεις θάνατοι που οφείλονται στην *E. coli* O157:H7. Μια ακόμη επιδημία από *E. coli* O157:H7 η οποία οφείλεται στην κατανάλωση ψιλικομμένου κατεψυγμένου μαρουλιού το οποίο σερβιρίστηκε σε εστιατόρια στις ΗΠΑ καταγράφεται την περίοδο Νοεμβρίου-Δεκεμβρίου του 2006. Στην επιδημία αυτή ασθένησαν 81 άτομα από τα οποία τα 26 νοσηλεύτηκαν και δύο παρουσίασαν αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο, δεν αναφέρθηκαν θάνατοι [121].

Οι επιδημίες αυτές υπογραμμίζουν τη σημασία των λαχανικών και των ωμών φρούτων ως πιθανά αίτια λοίμωξης από *E. coli* O157:H7 αλλά και ως πιθανούς σημαντικούς παράγοντες στην πρόκληση τροφιμογενών επιδημιών.

#### **4.1.2 Επιδημίες και εξάρσεις κρουσμάτων από non-O157 STEC**

Η σημασία των non-O157 STEC στη δημόσια υγεία διερευνάται περισσότερο τα τελευταία χρόνια. Το αμερικάνικο CDC κατέταξε πρόσφατα, το 2000, τη λοίμωξη από non-O157 STEC στα υποχρεωτικώς δηλούμενα νοσήματα. Τα non-O157 STEC στελέχη δεν αποτελούν νέα στελέχη της *E. coli* και οι λοιμώξεις που προκαλούνται από αυτά είναι διαδεδομένες με καταγραφή σε διάφορα μέρη του κόσμου [122]. Το χαμηλό ποσοστό των non-O157 STEC οφείλεται κυρίως στις μεθόδους καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται ως ρουτίνα από τα εργαστήρια για την απομόνωση των παθογόνων, με τις οποίες δεν ανιχνεύονται. Πρόσφατα, αναπτύχθηκαν ταχείες μέθοδοι για τη διαπίστωση της παρουσίας των STEC στελεχών μέσω της ανίχνευσης της παραγωγής Shiga τοξίνης ή των γονιδίων που κωδικοποιούν αυτές τις πρωτεΐνες.

Πάνω από 200 λοιμογόνοι non-O157 ορότυποι απομονώθηκαν από ασθενείς με κλινικές εκδηλώσεις όπως η σοβαρή διάρροια και το HUS, σε επιδημίες στις ΗΠΑ και σε άλλες χώρες. Οι ορότυποι O111, O103, O45, O145 και O26 είναι μεταξύ αυτών που ανιχνεύονται συχνότερα [123]. Ο ορότυπος O103 αποτέλεσε το πρώτο non-O157 STEC στέλεχος που απομονώθηκε ως πιθανή αιτία σποραδικών περιπτώσεων HUS, το 1975, στη Γαλλία [5]. Στην πρώτη επιδημία, που



αναφέρεται στη βιβλιογραφία ανιχνεύθηκε ο ορότυπος O145:NM και έλαβε χώρα στην Ιαπωνία το 1984, χωρίς να καθοριστεί τελικά το όχημα μετάδοσης αυτής [124]. Σε μια επιδημία στις ΗΠΑ το 2010 που προκλήθηκε από την κατανάλωση μπιφτεκιού ανιχνεύθηκε ο ορότυπος O26. Και άλλες επιδημίες περιγράφονται στη βιβλιογραφία. Στην Αυστραλία το 1995, 88 άτομα νόσησαν και 23 παρουσίασαν αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο από τον ορότυπο O111:NM [125], στη Νορβηγία το 2006, 18 άτομα προσβλήθηκαν, δέκα παρουσίασαν αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο και ένα πέθανε μετά τη βρώση πρόβειου λουκάνικου μολυσμένου με O103:H25 [126]. Στη Δανία, το 2007 σε μια επιδημία μετά την κατανάλωση μολυσμένου λουκάνικου απομονώθηκε το στέλεχος O26:H11, τα συμπτώματα των ασθενών ήταν ηπιότερα χωρίς να αναφερθούν περιπτώσεις αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου ή θανάτου [127]. Η διαφορά στη συμπτωματολογία δικαιολογήθηκε από το γεγονός ότι το O103:H25 στέλεχος παράγαγε μόνο Stx2, ενώ το O26:H11 παράγαγε μόνο Stx1. Η μεγαλύτερη επιδημία από non-O157 έχει περιγραφεί έως σήμερα έλαβε χώρα στη Γερμανία το χρονικό διάστημα από το Μάιο έως τον Ιούλιο του 2011 και αφορούσε στην κατανάλωση ωμών φύτρων. Νόσησαν συνολικά 3816 άτομα από τα οποία 845 εκδήλωσαν αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο και 54 πέθαναν. Το στέλεχος το οποίο ενοχοποιήθηκε για την επιδημία ήταν η *E. coli* O104:H4 [128].

Από το 1984 έως το 2009, οι πιο συνηθισμένοι ορότυποι που ανευρέθηκαν παγκοσμίως ήταν 37% O26, 31% O111, 6% O103, 5% O121, 5% O145, και 1% O45 (πίνακας 1), ενώ στις ΗΠΑ από το 1983 έως το 2002, τα ποσοστά αναλογίας των non-O157 STEC οροτύπων ήταν 22% O26, 16% O111, 12% O103, 8% O121, 7% O45, και 5% O145 [123]

**Πίνακας 1.** Κατανομή των πιο συνηθισμένων ορότυπων STEC σε επιδημίες ανα τον κόσμο

Έτη	O26	O45	O103	O111	O121	O145	Άλλοι
1984-1988	1	0	0	2	0	1	0
1989-1993	0	0	0	4	0	0	1
1994-1998	1	0	1	2	0	0	3
1999-2003	7	0	1	6	1	0	3
2004-2008	22	1	3	12	3	3	6
Total	31	1	5	26	4	4	13

Οι περιπτώσεις αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου και αιμορραγικής διάρροιας από non-O157 STEC με ορότυπους O26 και O111 είναι συνηθισμένοι στην Ευρώπη, στη Βόρεια Αμερική και στην Αυστραλία [129]. Παρόλα αυτά σε μια επιδημιολογική μελέτη στη Μινεσότα από το 2000 έως το 2006, 29 στελέχη O26 και 20 στελέχη O111 δεν προκάλεσαν αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο σε κανέναν από τους ασθενείς [130]. Επιπλέον ανάλυση έδειξε ότι τα O26 και O111 στελέχη έφεραν είτε μόνο *stx1* γονίδια είτε τουλάχιστον *stx2* γονίδια, εξηγώντας έτσι το γεγονός ότι η σοβαρότητα των παθήσεων που προκαλούνται από τα STEC δεν μπορεί να ερμηνευθεί μόνο από την παρουσία των Shiga τοξινών και πιθανότατα οφείλεται σε συνδυασμό λοιμογόνων παραγόντων που φέρουν τα STEC.

Οι επιδημίες από non-O157 STEC παρουσιάζουν σημαντική αύξηση παγκοσμίως από το 1984 έως το 2008 (πίνακας 2). Συγκεκριμένα, αυξήθηκαν από 129 το χρονικό διάστημα 1984–1988 σε 1770 το χρονικό διάστημα 2004–2008, υπογραμμίζοντας τόσο την αύξηση του δείκτη νοσηρότητας των non-O157 STEC όσο και τη χρήση πιο εξελιγμένων εργαστηριακών μεθόδων απομόνωσης των μικροοργανισμών [131].

Σε ένα πρόγραμμα επιδημιολογικής επιτήρησης για STEC στο Idaho φάνηκε ότι η καθημερινή εργαστηριακή ανάλυση των δειγμάτων αύξησε την επίπτωση των non-O157 STEC από μικρότερη της μονάδας σε έντεκα περιπτώσεις ανα έτος ανα 100.000 πληθυσμό και την επίπτωση των non-O157 STEC στο 56%.

**Πίνακας 2.** Επιδημίες ανα τον κόσμο από non-O157 STEC

Έτη	Περιπτώσεις	HUS	Θάνατοι
1984-1988	129	8	2
1989-1993	278	24	2
1994-1998	309	35	4
1999-2003	291	52	5
2004-2008	1770	68	3

Τα non-O157 STEC ως προς το σύνολο των STEC που απομονώθηκαν και δηλώθηκαν σε διάφορες χώρες είναι: 80% στο εθνικό δίκτυο επιτήρησης της Ολλανδίας [132], 82% στο

εργαστηριακό δίκτυο καταγραφής της Γερμανίας [133], 74% στο εθνικό δίκτυο επιδημιολογικής επιτήρησης της Δανίας [134] ,13% στις δηλώσεις HUS στη Γαλλία [135], 28% στην Ιρλανδία το 2008 [136], 42-61% στην Αυστραλία κατά τη διάρκεια του 2004-2006 [137] και 24% το 2007 και 35% το 2008 στην Ιαπωνία [134].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ *E. COLI* O157:H7 ΚΑΙ ΤΩΝ NON-O157 STEC ΣΤΑ ΖΩΑ

### 5.1 Επιπολασμός των STEC στα βοοειδή

#### 5.1.1 Επιπολασμός της *E. coli* O157:H7 στα βοοειδή

Από τις πρώτες κιόλας επιδημίες με λοίμωξη από *E. coli* O157:H7, τα βοοειδή θεωρήθηκαν ως η κύρια δεξαμενή του μικροοργανισμού. Ωστόσο, η πλειοψηφία των εντεροτοξινογόνων που σχετίζονται με νόσο στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένης και της *E. coli* O157:H7, δεν προκαλεί νόσο στα βοοειδή.

Ο επιπολασμός ποικίλλει και κυμαίνεται από 0.1% στις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην Ισπανία και στη Νορβηγία, 0.3% στη Γαλλία, 2.4% στην Ιρλανδία, 15% στη Σκωτία και 62% στον Καναδά [138]. Σε άλλες μελέτες στην Αυστραλία, ο επιπολασμός υπολογίστηκε στο 10% στα βοοειδή ελεύθερας βοσκής έναντι 15% αυτών που εκτρέφονταν σε κτηνοτροφικές μονάδες [139]. Στην Ολλανδία το ποσοστό κυμαίνεται από 0 έως 61% και στην Ιταλία απομονώθηκε στο 42% των κοπράνων και στο 24% των σφάγιων [140,141].

Οι πρώτες μελέτες παρουσίαζαν χαμηλά ποσοστά της *E. coli* O157:H7 στα κόπρανα των βοοειδών στις ΗΠΑ. Τα ποσοστά ήταν 0.28% στα γαλακτοπαραγωγά ζώα και 0.71% στα κρεατοπαραγωγά ζώα, ενώ το ποσοστό στις φάρμες ήταν 8.3% και 16% αντίστοιχα. Πρόσφατες μελέτες παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά της τάξης του 15.7% [142]. Η αύξηση του επιπολασμού πιθανότατα να οφείλεται στη χρήση πιο ευαίσθητων μεθόδων απομόνωσης του μικροοργανισμού.

### 5.1.2 Επιπολασμός των non-O157 STEC στα βοοειδή

Ο επιπολασμός των non-O157 STEC στα βοοειδή κυμαίνεται από 4.7 έως 44.8% στα βοοειδή ελευθέρως βοσκής και από 4.6 έως 55.9% στα βοοειδή εκτροφής [143]. Μελέτες σε φάρμες γαλακτοπαραγωγών βοοειδών στις ΗΠΑ εκτιμούν τον επιπολασμό των non-O157 STEC από 0 έως 19% [144], ενώ ο επιπολασμός στα κρεατοπαραγωγά βοοειδή κυμαίνεται από 19 έως 30% [145] και ο επιπολασμός στα σφάγια στο 56.3% [146]. Τα στελέχη O26, O111 περιγράφονται ως τα πιο ικανά να επιζήσουν στα κόπρανα για αρκετές εβδομάδες [147]. Ο επιπολασμός των non-O157 STEC στα σφάγια πριν τον εκσπλαχνισμό και τη χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων ήταν 58% και μειώθηκε σε 9% μετά τη χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων [146]. Παρόμοια, σε μια άλλη μελέτη το 53.9% των σφάγιων παρουσίαζε ένα τουλάχιστον στέλεχος των non-O157 πριν τον εκσπλαχνισμό, ενώ το ποσοστό αυτό μειώθηκε σε 8.3% μετά την εφαρμογή κατάλληλων μέτρων [148]. Οι ορότυποι O26 και O111 απομονώθηκαν και σε βοοειδή στην Κορέα [149].

Οι ορότυποι των STEC που απομονώνονται συχνότερα στα κόπρανα των βοοειδών παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Το ποσοστό των STEC οροτύπων στα κόπρανα των βοοειδών κυμαίνεται από 6% στις ΗΠΑ έως 70% στη Γαλλία.

**Πίνακας 3.** Ορότυποι των STEC που απομονώθηκαν από κόπρανα βοοειδών.  
(πίνακας τροποποιημένος από Blanco et al.,2001)

Αναφορές	Χώρα	Αριθμός θετικών δειγμάτων	Ποσοστό (%)	Επικρατούντες ορότυποι
Blanco et al., (1996, 1997, 2000) [150,151,152]	Ισπανία	334/1069	(31%)	O157:H7, O113:H21, O22:H8, O26:H11, O171:H2, O77:H41, O105:H18, O4:H4, O8:H2, O116:H21, O20:H19, O91:H21, O113:H4, OX3:H2, O2:H7, O82:H8, O103:H2, OX3:H21, OX3:H-, O2:H29, O128:H-
Pradel et al. (2000) [6]	Γαλλία	330/471	(70%)	O157:H7, O113:H21, OX3:H2, OX3:H21, OX178:H19, O113:H4, O6:H10, O171:H2, O46:H38, O172:H21, O91:H10, O22:H8, O22:H16, O109:H-, O74:H42
Beutin et al. (1993) [153]	Γερμανία	30/142	(21%)	O146:H21, O113:H21, O20:H19, O76:H21, O156:H21
Montenegro et al. (1990) [154]	Γερμανία	28/259	(11%)	O157:H7, O116:H21, O82:H8, O113:H21, O136:H12, O3:H-, O10:H21, O22:H8, O126:H20
Willshaw et al. (1993) [155]	Ηνωμένο Βασίλειο	31/180	(17%)	O113:H4, O172:H21, O163:H19, O168:H8, O46:H38
Wells et al. (1991) [144]	ΗΠΑ	45/322	(14%)	O157:H7, O25, O84:H-, O171:H2, O22:H8, O121:H7, O111:H-, OX3:H-, O15:H27, O45:H2, O45:H-, OX3:H21
Cray et al. (1996) [156]	ΗΠΑ	77/1305	(6%)	O157:H7, O26, O5, O111, O103, O84,
Wilson et al. (1992) [157]	Καναδάς	271/1790	(15%)	OX3:H-, O8:H-, O153:H-, OX3:H16, OX3:H21, O103:H39, O103:H-, O121:H-
Rahn et al. (1997) [158]	Καναδάς	105/406	(26%)	O157:H7, O26:H11, O153:H25, O156:H-
Parma et al. (2000) [159]	Αργεντινή	80/244	(33%)	O26:H11, OX3:H21, O5:H-, O39:H49, O171:H2, O20:H19, O20:H7, O103:H-, O117:H7, O141:H8
Cobbold and Desmarchelier (2000) [160]	Αυστραλία	98/588	(17%)	O157:H7, O26:H11
Miyao et al. (1998) [161]	Ιαπωνία	94/387	(24%)	O157:H7, O145:H-, O45:H-, O45:H8, O16:H21, O22:H-, O2:H29, O22:H8, O42:H25, O74:H19, O109:H16, O109:H-, O113:H21, O113:H-, O132:H2, O153:H25

Παρότι τα βοοειδή παραμένουν η πιο σημαντική δεξαμενή των STEC στο περιβάλλον, το τελευταίο διάστημα φαίνεται ότι το γονιδιακό προφίλ των στελεχών που απομονώνεται στα βοοειδή δεν ταιριάζει με το προφίλ αυτών που απομονώνεται στους ανθρώπους. Τα τελευταία χρόνια, άλλα ζώα όπως τα πρόβατα και οι αίγες παίζουν ολοένα και σημαντικότερο ρόλο στη μετάδοση των STEC στους ανθρώπους από αυτόν που τους είχε αρχικά αποδοθεί.

## **5.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τον αποικισμό της *E. coli* O157:H7 και των non-O157 στα βοοειδή**

Ο αποικισμός των βοοειδών από την *E. coli* O157:H7 επηρεάζεται από αρκετούς παράγοντες. Το παθογόνο παρουσιάζει εποχιακή κατανομή. Η αποβολή του μικροβίου παρατηρείται αυξημένη κατά τους θερινούς μήνες σε σχέση με τους χειμερινούς [162]. Έτσι, μπορεί να δικαιολογηθεί και η αύξηση των κρουσμάτων από *E. coli* O157:H7 τους θερινούς μήνες. Το παθογόνο παρουσιάζει εκτός από εποχιακή και γεωγραφική κατανομή, ακόμη και σε στενά γεωγραφικά πλαίσια. Οι ΗΠΑ, ο Καναδάς και το Ηνωμένο Βασίλειο είναι περιοχές στις οποίες η *E. coli* O157:H7 εμφανίζεται συχνότερα σε σχέση με άλλες περιοχές, και μάλιστα με προτίμηση στα βορειότερα τμήματα των περιοχών αυτών, για λόγους που δεν είναι ακόμη γνωστοί [54].

Ο αποικισμός των βοοειδών από την *E. coli* O157:H7 είναι δυναμικός και μεταβαλλόμενος, με αποτέλεσμα άλλοτε να παρουσιάζεται σε υψηλά ποσοστά και να απομονώνεται ο μικροοργανισμός στα ζώα και άλλοτε να είναι μηδενικός και να μην ανιχνεύεται το παθογόνο [163]. Κάποια ζώα αποικίζονται αμέσως μετά την επαφή τους με το παθογόνο και στη συνέχεια το αποβάλλουν, ενώ άλλα παραμένουν αποικισμένα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα [16]. Ακόμη, σε ορισμένες έρευνες αναφέρεται ότι κάποια από τα αποικισμένα ζώα παρουσιάζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις του μικροοργανισμού σε σχέση με άλλα. Οι υψηλές συγκεντρώσεις του μικροοργανισμού και η φορεία για μεγάλο χρονικό διάστημα σχετίζονται με τον αποικισμό του τελικού τμήματος του εντέρου των βοοειδών.

Ένας ακόμη από τους παράγοντες που επηρεάζουν τον αποικισμό των βοοειδών από την *E. coli* O157:H7 είναι η ηλικία. Τα νεαρής ηλικίας βοοειδή είναι περισσότερο ευαίσθητα στο παθογόνο και το αποβάλλουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα με τα κόπρανα [164]. Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ουάσινγκτον, ο μικροοργανισμός απομονώθηκε σε 17 από τα 604 νεαρά βοοειδή και σε μια μόνο από τις 664 αγελάδες των ίδιων εκτροφείων [144]. Η διαφορά είναι ιδιαίτερα μεγάλη αν σκεφθεί κανείς ότι τα νεαρά ζώα ήταν παράλληλα και ατομικά περιορισμένα κάνοντας έτσι ακόμα πιο δύσκολη την επαφή τους με άλλα ζώα φορείς. Το γεγονός ερμηνεύεται λαμβάνοντας υπόψη τη μειωμένη ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος των νεαρών βοοειδών που τα καθιστά πιο ευπαθή στη μόλυνση από *E. coli* O157:H7 ακόμη και σε μικρή δόση [165]

Άλλος ένας παράγοντας που φαίνεται να επηρεάζει τον αποικισμό του εντέρου των βοοειδών είναι ο τύπος της διατροφής τους. Τα απογαλακτισμένα νεαρά ζώα παρουσιάζουν μεγαλύτερα ποσοστά αποικισμού σε σχέση με τα μη απογαλακτισμένα και τα ενήλικα ζώα [166]. Η πλούσια σε άχυρα διατροφή, χαμηλή σε πρωτεΐνες αλλά πλούσια σε φυτικές ίνες φαίνεται να ευνοεί την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε σχέση με τη διατροφή που αποτελείται από μίγμα καλαμποκιού και λαχανικών, υψηλή σε πρωτεΐνες και χαμηλή σε φυτικές ίνες [163]. Η εξήγηση για αυτό είναι ότι μεγάλη ποσότητα της τροφής λόγω των αυξημένων ινών μπορεί να παραμείνει άπεπτη και να καταλήξει έτσι στο κόλον χωρίς να ζυμωθεί από την φυσιολογική μικροβιολογική χλωρίδα της μεγάλης κοιλίας.

Δεν έχουμε αρκετά στοιχεία σχετικά με τους παράγοντες που επηρεάζουν τον αποικισμό των non-O157 STEC στα βοοειδή. Σε μια μελέτη φαίνεται ότι ο επιπολασμός επηρεάζεται από την εποχή και είναι χαμηλός 49.2% το χειμώνα, την άνοιξη και το καλοκαίρι και υψηλός 77% το φθινόπωρο [149]. Η παρουσία των non-O157 STEC επηρεάζεται από τη χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων, η χρήση των οποίων φαίνεται ότι μειώνει σημαντικά τον επιπολασμό των non-O157 STEC στα σφάγια [146]. Παρόμοια, σε μια άλλη μελέτη το 53.9% των σφάγιων παρουσίαζε ένα



τουλάχιστον στέλεχος των non-O157 πριν τον εκσπλάχνισμό, ενώ το ποσοστό αυτό μειώθηκε σε 8.3% μετά την εφαρμογή κατάλληλων μέτρων [148].

### **5.3 Επιπολασμός των STEC στα μικρά μηρυκαστικά (πρόβατα και αίγες)**

#### **5.3.1 Επιπολασμός της *E. coli* O157:H7 στα μικρά μηρυκαστικά**

Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι και τα αιγοπρόβατα αποτελούν σημαντική δεξαμενή του μικροοργανισμού. Πράγματι, αρκετές εξάρσεις κρουσμάτων στο Ηνωμένο Βασίλειο αποδόθηκαν στην άμεση επαφή των ανθρώπων με κόπρανα προβάτων μολυσμένα από *E. coli* O157:H7. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η νόσηση μιας ομάδας αγοριών μετά από επίσκεψη σε χωράφι όπου προηγουμένως είχε βοσκήσει ένα κοπάδι προβάτων. Τα κόπρανα στο χωράφι και στα πρόβατα ήταν θετικά για *E. coli* O157:H7 και το ίδιο στέλεχος με αυτό που απομονώθηκε από τα παιδιά που νόσησαν [167].

Ο επιπολασμός της *E. coli* O157:H7 ήταν 4% σε 101 δείγματα κοπράνων προβάτων στην Ολλανδία [168], 0% σε 364 δείγματα κοπράνων προβάτων στη Νορβηγία [169] και 2% στην Αγγλία σε 1000 δείγματα κοπράνων προβάτων [13]. Στην Ισπανία σε μια μελέτη το 2000 ο επιπολασμός του παθογόνου ήταν 0.4% σε 1300 δείγματα. Στην Ελλάδα, η *E. coli* O157:H7 απομονώθηκε σε ένα από τα 81 δείγματα κοπράνων από αίγες που εξετάστηκαν στην περιοχή της Ηπείρου [170]. Η *E. coli* O157:H7 δεν απομονώθηκε σε 328 δείγματα από αίγες στην Κίνα [171]. Αντίθετα, ο Kudva και οι συνεργάτες του, το 1996, απομόνωσαν την *E. coli* O157:H7 σε υψηλό ποσοστό 31% σε κόπρανα προβάτων σε φάρμα στην Αμερική [172].

#### **5.3.2 Επιπολασμός των non-O157 STEC στα μικρά μηρυκαστικά.**

Τα μικρά μηρυκαστικά όπως τα πρόβατα και οι αίγες φέρουν μια μεγάλη ποικιλία από STEC, ενώ η *E. coli* O157:H7 απομονώνεται λιγότερο συχνά σε αυτά. Τα non-O157 STEC απομονώθηκαν στα αρνιά και στα ενήλικα πρόβατα σε διάφορες χώρες, όπως στην Αυστραλία, στη Βραζιλία, στην

Ινδία, στην Ιορδανία, στη Νέα Ζηλανδία, στη Νορβηγία, στην Ισπανία, στην Ελβετία και στις ΗΠΑ [173-181]. Ορισμένοι ορότυποι όπως ο O5:H-, ο O91:H-, ο O128:H2, ο O146:H8 και ο O146: H21 που απομονώθηκαν στα κόπρανα προβάτων διαφορετικών χωρών ήταν κοινοί, αποδεικνύοντας έτσι ότι το έντερο των προβάτων αποικίζεται από τα ίδια non-O157 STEC στελέχη. Ο κυρίαρχος ορότυπος στη Γερμανία, στην Ισπανία, στην Αυστραλία και στις ΗΠΑ ήταν ο O91:H-.

Οι αίγες αποτελούν ακόμη μια δεξαμενή μετάδοσης των non-O157 STEC. Σε 13 συνολικά κοπάδια που μελετήθηκαν στην Ιρλανδία, τα non-O157 STEC απομονώθηκαν από τα φίλτρα του γάλακτος τριών διαφορετικών κοπαδιών. Οι ορότυποι O157 και O26 απομονώθηκαν δυο φορές ο καθένας [182]. Σε μια άλλη μελέτη στην Ισπανία, καταγράφηκε χρόνιος αποικισμός από non-O157 STEC στα ενήλικα ζώα και σποραδικός στα νεαρά ζώα. Οι ορότυποι που κυρίως απομονώθηκαν ήταν O33, O76, O126, O146 και O166. Κανένα από τα στελέχη δεν παρήγαγε ιντιμίνη και όλα ήταν ικανά να αποικίσουν το έντερο των ζώων [1]. Non-O157 στελέχη απομονώθηκαν επίσης σε αίγες στην Ιορδανία [176], στο Μπαγκλαντές [183] και στο Βιετνάμ [184].

## 5.4 Επιπολασμός των STEC στους χοίρους

### 5.4.1 Επιπολασμός της *E. coli* O157:H7 στους χοίρους

Η *E. coli* O157:H7 έχει απομονωθεί από τα κόπρανα χοίρων, αλλά ο επιπολασμός της είναι μικρός σε σχέση με τα άλλα παραγωγικά ζώα. Αυτό το οποίο αξίζει να επισημάνουμε είναι το ποσοστό 0.16% [163] στη Μεγάλη Βρετανία το οποίο έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες όπου το ποσοστό ήταν μηδενικό [185, 13]. Επίσης, το παθογόνο απομονώθηκε σε κόπρανα χοίρων που προέρχονταν από το τελικό τμήμα του εντέρου στις Ηνωμένες Πολιτείες σε ποσοστό 2% (6/305) [186]. Επιπλέον, η *E. coli* O157:H7 απομονώθηκε σε ποσοστό 1.4% (3/220) σε κόπρανα χοίρων στην Ιαπωνία [187], 0.1% (2/1976) στη Νορβηγία [169] και 0.7% (1/145) στη Δανία [138]. Ένα άλλο στοιχείο που αξίζει να επισημάνουμε είναι το υψηλό ποσοστό 16% της *E. coli* O157:H7 στους χοίρους στη Χιλή [188] αλλά και την παρουσία της *E. coli* O157:H7 στα κόπρανα χοίρων σε

ποσοστό υψηλότερο σε σχέση με αυτό που υπολογίστηκε σε κόπρانا βοοειδών στη Νότια Αφρική [189].

#### **5.4.2 Επιπολασμός των non-O157 STEC στους χοίρους**

Συχνά, οι non-O157 STEC ορότυποι που απομονώνονται από τους χοίρους παρατηρούνται σε ζώα που παρουσιάζουν διάρροια απογαλακτισμού, ή οιδηματώδη νόσο [190]. Οι ορότυποι O138, O139, O141, O149 και O157 συνήθως συνδέονται με οιδηματώδη νόσο. Μολονότι οι ορότυποι των non-O157 STEC που απομονώθηκαν στους χοίρους ήταν οι ίδιοι με αυτούς που απομονώθηκαν και στους ανθρώπους, φαίνεται να παρουσιάζουν διαφορές, ως προς τα λοιμογόνα στελέχη που έφεραν τα οποία δεν ήταν παθογόνα για τον άνθρωπο αλλά και ως προς τις αλληλεπιδράσεις τους στο εντερικό επιθήλιο των χοίρων [191]. Πάντως υπάρχουν και μελέτες όπου αναφέρεται ότι ορισμένα στελέχη είναι δυνητικά παθογόνα για τον άνθρωπο. Σε μια μελέτη στη Χιλή περιγράφεται ότι το 69% των χοίρων ήταν θετικά για *E. coli* O157, O111 και O26 [192]. Μη δημοσιευμένες έρευνες τονίζουν την παρουσία των non-O157 στα σφάλια κατά τα αρχικά στάδια της επεξεργασίας [193].

### **5.5 Επιπολασμός των STEC στα πουλερικά**

#### **5.5.1 Επιπολασμός της *E. coli* O157:H7 στα πουλερικά**

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η απομόνωση του μικροοργανισμού στα πουλερικά και ιδιαίτερα στις αυγοπαραγωγικές όρνιθες. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση στη Βόρεια Ιταλία, το 1993, σε μια έρευνα πέντε μηνών, όπου παρουσιάστηκαν 15 περιπτώσεις αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου, που οφείλονταν στην *E. coli* O157 αλλά και σε άλλους ορότυπους [194]. Όλες οι περιπτώσεις προέρχονταν από μικρές κωμοπόλεις μιας ευρύτερης περιοχής με μικρή φαινομενικά σύνδεση μεταξύ τους. Έπειτα από επιδημιολογικές έρευνες θεωρήθηκε ως πιθανή πηγή της

λοίμωξης η επαφή με τα πουλερικά ή με το πτηνοτροφείο, παρότι δεν ανιχνεύθηκαν εντεροτοξινογόνα στελέχη στα κόπρανα των πουλερικών.

Σε άλλη πρόσφατη πειραματική μελέτη αποδείχθηκε ότι ενοφθαλμίζοντας *E. coli* O157:H7 στελέχη σε πουλερικά μιας ημέρας ζωής, αυτά αποικίζονταν ταχύτατα και γίνονταν χρόνιοι φορείς του μικροοργανισμού (απέβαλλαν τον μικροοργανισμό για πάνω από 11 μήνες). Το παθογόνο ανιχνεύθηκε και στο κέλυφος των αυγών τους [195].

Τέλος, αναφέρεται απομόνωση του μικροοργανισμού στα εντόσθια πουλερικών σε έρευνα στην Κόστα Ρικα. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν 2% θετικά δείγματα σε σύνολο 150 δειγμάτων από εντόσθια πουλερικών που εξετάστηκαν.

### **5.5.2 Επιπολασμός των non-O157 STEC στα πουλερικά**

Δεν αναφέρεται η απομόνωση των non-O157 STEC σε πουλερικά σε μελέτες που έγιναν έως σήμερα στην Ολλανδία και στο Ηνωμένο Βασίλειο. Υπάρχει όμως ένα σημαντικός αριθμός ερευνών που αναφέρεται στην απομόνωση των non-O157 STEC σε περιστέρια τόσο εκτρεφόμενα που προορίζονται για αγώνες όσο και σε ελεύθερα, άγρια περιστέρια που ζούν στην εξοχή [196]. Η Stx2f που απομονώθηκε σε περιστέρια [197], απομονώθηκε και από κόπρανα ανθρώπων με διάρροια [198].

## **5.6 Επιπολασμός των STEC σε άλλα ζώα**

### **5.6.1 Επιπολασμός της *E. coli* O157:H7 σε άλλα ζώα**

Πολλά ακόμη ζώα μπορούν να λειτουργήσουν ως πηγή μετάδοσης της *E. coli* O157:H7. Πηγή του παθογόνου μπορούν να αποτελέσουν τα ασπόνδυλα, όπως τα έντομα και τα μαλάκια αλλά και τα αμφίβια και τα ψάρια. Σε ψάρια που εξετάστηκαν κοντά σε σφαγείο βοοειδών (*Bos indicus*) στην κεντρική Αφρική αλλά και σε φρύνους (*Rana catesbeiana*) στην Αμερική αποδείχθηκε ότι μπορούν

να αποτελέσουν κατάλληλο ξενιστή για τον μικροοργανισμό. Η *E. coli* O157:H7 επιβίωσε για 14 ημέρες σε σαλιγκάρι, απομονώθηκε σε σκαθάρια αλλά και σε μύγες σε σπίτια που βρίσκονταν κοντά σε εκτροφές βοοειδών και εκτροφές με γαλοπούλες [199].

Ο μικροοργανισμός απομονώθηκε σε ποσοστό 1.1% (1/90) στα άλογα και 3.1% (2/65) στους σκύλους στις Ηνωμένες Πολιτείες [200]. Η *E. coli* O157:H7 απομονώθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες από άγρια ελάφια, από white-tailed ελάφια και από κόπρανά άγριων πουλιών στο Ηνωμένο Βασίλειο. Η παρουσία του μικροοργανισμού στα πουλιά υπογραμμίζει τη δυνατότητα μεταφοράς της *E. coli* O157:H7 από το ένα περιβάλλον στο άλλο.

### **5.6.2 Επιπολασμός των non-O157:H7 STEC σε άλλα ζώα**

Εκτός από τα μηρυκαστικά, και σε άλλα είδη ζώων απομονώθηκαν non-O157 STEC χωρίς όμως να αποτελούν σημαντική πηγή μετάδοσης τους στον άνθρωπο.

Ο ορότυπος O145:H- απομονώθηκε από μια γάτα στη Γερμανία η οποία απέκκρινε τον μικροοργανισμό για αρκετούς μήνες, το ίδιο στέλεχος απομονώθηκε και σε ένα κοριτσάκι δυο ετών με αιμορραγική διάρροια το οποίο ερχόταν σε επαφή με τη γάτα [201]. Σε σκύλους, στη Βραζιλία, απομονώθηκαν επίσης non-O157 STEC [202]. Τα τροφικά, όπως τα ποντίκια και οι αρουραίοι θεωρούνται ξενιστές των non-O157 STEC. Σε μια έρευνα στη Δανία απομονώθηκε ο ορότυπος O136:H12 από έναν αρουραίο σε μια φάρμα βοοειδών [203]. Τέλος, non-O157 STEC απομονώθηκαν σε άλογα [204] αλλά και σε κουνέλια [205].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup>. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ *E. COLI* O157:H7 ΚΑΙ ΤΩΝ NON-O157 STEC ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

### 6.1 Επιπολασμός της *E. coli* O157:H7 στα τρόφιμα

#### 6.1.1 Επιπολασμός της *E. coli* O157:H7 σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης.

Η ανίχνευση της *E. coli* O157:H7 στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης συνήθως είναι αποτέλεσμα της επιμόλυνσής τους με ζωικά κόπρανα ή εντερικό περιεχόμενο στους χώρους επεξεργασίας των τροφίμων. Το κρέας μολύνεται κατά κύριο λόγο στο σφαγείο, συνήθως κατά τη διάρκεια της εκδοράς και του εκπλαγνισμού των σφάγιων, ή κατά τη διάρκεια του πλυσίματος και της επεξεργασίας των σφάγιων, ή μετά την επεξεργασία κατά τον τεμαχισμό τους [206]. Το κρέας με τη μορφή του κιμά, αποτελεί ιδιαίτερο κίνδυνο, διότι διευκολύνει την ενσωμάτωση και την εξάπλωση των μικροοργανισμών, γι' αυτό και απαιτούνται υψηλές θερμοκρασίες μαγειρέματος του κρέατος με τη μορφή αυτή για την απενεργοποίηση του παθογόνου.

Δευτερευόντως, η επιμόλυνση του κρέατος μπορεί να προέλθει από τη χρήση ακάθαρτου νερού ή μέσω της επαφής του με μολυσμένες επιφάνειες [207]. Το κρέας μπορεί να επιμολυνθεί κατά τη συσκευασία του ή και κατά τους χειρισμούς του στην προετοιμασία του φαγητού. Τα λουκάνικα που έχουν υποστεί ζύμωση και καταναλώνονται ωμά καθώς και άλλα είδη κρέατος που δεν μαγειρεύονται σε υψηλές θερμοκρασίες φαίνεται να αποτελούν προϊόντα αυξημένου κινδύνου.

Για την επιμόλυνση των τροφίμων και την πρόκληση λοίμωξης από *E. coli* O157:H7 αρκεί μικρή δόση του παθογόνου, περίπου 10 μικροοργανισμοί θεωρούνται ότι είναι αρκετοί [92]. Σε μια έξαρση κρουσμάτων στην Ουαλία, το 1993, μετά από κατανάλωση βοδινού μπιφτεκιού, εκτιμήθηκε η ελάχιστη απαραίτητη ποσότητα του παθογόνου στα μπιφτέκια ώστε να προκαλέσουν λοίμωξη, λιγότεροι από δύο μικροοργανισμοί ανά 25 gr δείγματος κρέατος ήταν αρκετοί [208].

Τα αποτελέσματα σχετικά με την παρουσία των STEC στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές. Σύμφωνα με τον Griffin και τους συνεργάτες του σε μια μελέτη που δημοσιεύθηκε το 1991, το ποσοστό επιμόλυνσης βόειου κρέατος από *E. coli* O157 στις ΗΠΑ

εκτιμάται στο 0.12% [209]. Σε άλλες μελέτες το αντίστοιχο ποσοστό σε τεμάχια κιμά ήταν πολύ μεγαλύτερο από 1.3% έως 2.8% [210, 211]. Σε μια μελέτη στο Σηάτλ, τα STEC ανιχνεύθηκαν στο 23%, 63%, 48% και 18% των δειγμάτων από βόειο κρέας, μόσχου, προβάτου και χοίρου αντίστοιχα. Η ίδια έρευνα έδωσε θετικά αποτελέσματα με ποσοστά 12% για τα κοτόπουλα, 7% στις γαλοπούλες, 10% στα ψάρια και 5% στα οστρακοειδή [212].

Αντίθετα, σε μια από τις μεγαλύτερες ερευνητικές προσπάθειες του USDA, σε έλεγχο 5000 δειγμάτων σε διάφορα τρόφιμα ζωικής προέλευσης το ποσοστό των μολυσμένων τροφίμων από *E. coli* O157:H7 ήταν πολύ μικρό. Η ανίχνευση του οροτύπου *E. coli* O157:H7 πραγματοποιήθηκε με μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο (dipstick assay). Από τα 5000 δείγματα που εξετάστηκαν μόνο τρία ήταν θετικά [213]. Στο ίδιο αποτέλεσμα κατέληξε και μια έρευνα του Υπουργείου Γεωργίας των ΗΠΑ όπου η *E. coli* O157:H7 ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.07% στο σύνολο των 10.265 δειγμάτων τροφίμων που εξετάστηκαν.

Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζουν και έρευνες στην Ευρώπη. Στο Ηνωμένο Βασίλειο σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε τρόφιμα και εργαλεία κρεοπωλείων και εστιατορίων, εξετάστηκαν 2330 δείγματα νωπού κρέατος, 2192 ψημένου κρέατος και 4635 δείγματα από το περιβάλλον και τα εργαλεία. Η παρουσία της *E. coli* O157:H7 διαπιστώθηκε σε οκτώ από τα 1400 (0.6%) καταστήματα που εξετάστηκαν και συγκεκριμένα σε τρία μόλις δείγματα κρέατος και σε πέντε σημεία ή εργαλεία των χώρων παρασκευής [214].

Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν σήμερα ότι ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν σημαίνει και απουσία του μικροβίου. Πιθανόν η ανομοιόμορφη κατανομή των μικροβίων στο τρόφιμο ή η πολύ μικρή λοιμογόνος δόση (η οποία δεν μπορεί να ανιχνευθεί με καμία διαθέσιμη μέθοδο) να δίνουν κάποιες εξηγήσεις γι' αυτά τα αποτελέσματα [215].

Όσον αφορά στην παρουσία της *E. coli* O157:H7 στο νωπό γάλα, ο μικροοργανισμός μπορεί να ανιχνευθεί όταν υπάρχει σε υψηλά επίπεδα σε μια εκτροφή. Η επιμόλυνση του νωπού γάλακτος συμβαίνει συνήθως κατά τη διάρκεια του αρμέγματος. Στον έλεγχο 115 δειγμάτων νωπού γάλακτος

από τις δεξαμενές συλλογής του γάλακτος στις φάρμες ανιχνεύθηκε *E. coli* O157:H7 στις 11 (10%) από αυτές όταν χρησιμοποιήθηκαν ευαίσθητες εργαστηριακές μέθοδοι. Η μαζική συλλογή του γάλακτος των εκτροφών συμβάλλει στη διασπορά της μόλυνσης [216]. Το παθογόνο μπορεί και επιβιώνει στο γάλα ακόμη και κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του αλλά και σε προϊόντα ζύμωσης του όπως τα τυριά και το γιαούρτι.

Η ικανότητα επιβίωσης του παθογόνου σε μαλακά τυριά από ωμό γίδινο γάλα, σε ώριμο τυρί τσένταρ από μη παστεριωμένο γάλα, σε τυρί φέτα αλλά και σε γιαούρτι είναι καλά καταγεγραμμένη στη βιβλιογραφία [217]. Ιδιαίτερος κίνδυνος φαίνεται να υπάρχει για τα υψηλής υγρασίας μαλακά τυριά καθώς και για τα τυριά που παρασκευάζονται σε αγροτικές περιοχές από μη παστεριωμένο γάλα [218].

Γενικότερα, σε ό,τι αφορά στα γαλακτοκομικά προϊόντα όλα τα STEC βακτήρια καταστρέφονται κατά την παστερίωση. Θέρμανση στους 72 °C για 16,2 δευτερόλεπτα προκαλεί το θάνατο περισσότερων από 104 κυττάρων ανά ml. Η *E.coli* O157:H7 μπορεί να πολλαπλασιάζεται σε ωμό ή παστεριωμένο γάλα στους 15 °C και 7 °C αντίστοιχα, ενώ στους 5 °C παρουσιάζει μικρή μόνο μείωση μετά από 28 ημέρες [219].

### **6.1.2 Επιπολασμός της *E.coli* O157:H7 σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης.**

Τα φρούτα και τα λαχανικά έχουν εμπλακεί σε αρκετές περιπτώσεις επιδημιών από *E. coli* O157:H7. Σε όλες τις περιπτώσεις καταγράφεται η επαφή με κόπρανα βοοειδών, είτε απευθείας με χρήση κοπριάς ως λίπασμα, είτε από μολυσμένα νερά άρδευσης ή μέσω του πλυσίματος των προϊόντων φυτικής προέλευσης με μολυσμένο νερό.

Η κατανάλωση λαχανικών από κήπο στον οποίο χρησιμοποιήθηκε κοπριά ως λίπασμα στο Μείν, των ΗΠΑ, είχε ως αποτέλεσμα τη λοίμωξη από *E. coli* O157:H7. Το ίδιο στέλεχος απομονώθηκε από τους ασθενείς και από την κοπριά του λαχανόκηπου [220]. Το 1991, ανιχνεύθηκε μια επιδημία από *E. coli* O157:H7 μετά την κατανάλωση μη παστεριωμένου χυμού



μήλου. Τα μήλα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για το χυμό, συλλέχθηκαν από το έδαφος το οποίο είχε πιθανότατα επιμολυνθεί με κοπριά [15]. Η επεξεργασία ωμής πατάτας από χωράφι που είχε χρησιμοποιηθεί κοπριά βοοειδών ως λίπασμα οδήγησε σε μια ακόμη επιδημία από *E. coli* O157:H7 [221].

Η *E. coli* O157:H7 αντέχει για μεγάλο χρονικό διάστημα στο έδαφος στο οποίο εισχωρεί είτε μέσω της κοπριάς είτε μέσω του νερού. Οι συγκεντρώσεις του μικροοργανισμού στο έδαφος και ο χρόνος παραμονής του σε αυτό είναι σημαντικά. Υψηλές συγκεντρώσεις του μικροοργανισμού στο έδαφος αυξάνουν την πιθανότητα επιμόλυνσης του φυτικού προϊόντος. Ενώ, όσο αυξάνει το διάστημα που μεσολαβεί από τη στιγμή της επιμόλυνσης του εδάφους μέχρι τη συλλογή των προϊόντων τόσο μειώνεται η πιθανότητα επιμόλυνσης του προϊόντος. Η παρουσία της *E. coli* O157:H7 στα προϊόντα εξαρτάται και από παράγοντες, όπως την απόσταση από το έδαφος του βρώσιμου τμήματος του φυτικού προϊόντος (π.χ καρότα, κρεμμύδια κτλ) και την απόσταση της ρίζας του φυτού από το έδαφος (π.χ λάχανα, μαϊντανός, κτλ). Είναι πιο πιθανή η επιμόλυνση των προϊόντων που βρίσκονται κοντά στο έδαφος σε σχέση με αυτά που αναπτύσσονται αρκετούς πότους πάνω από το έδαφος (π.χ ντομάτες, πιπεριές κτλ). Τέλος, ο τύπος της κοπριάς επηρεάζει την ανάπτυξη του παθογόνου.

Σε πειράματα, η *E. coli* O157:H7 επιβίωσε για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε έδαφος με κοπριά από όρνιθες από ό,τι σε αυτό με κοπριά από βοοειδή [222]. Η *E. coli* O157:H7 αναπτύσσεται λιγότερο συχνά σε έδαφος με κοπριά από χοίρους από ότι σε έδαφος με κοπριά από βοοειδή ή πρόβατα [223].

Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από επιδημιολογικές μελέτες με στόχο να καθορίσουν τον επιπολασμό της *E. coli* O157:H7 στις βιολογικές καλλιέργειες. Οι μελέτες αυτές δεν αποδεικνύουν ότι ο κίνδυνος επιμόλυνσης των προϊόντων βιολογικής καλλιέργειας είναι μεγαλύτερος σε σχέση με τις συμβατικές αλλά ούτε και την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της κατανάλωσης βιολογικών προϊόντων και της λοίμωξης από *E. coli* O157:H7 [224].

## 6.2 Επιπολασμός των non-O157 STEC στα τρόφιμα

### 6.2.1 Επιπολασμός των non-O157 STEC σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης

Ο επιπολασμός των non-O157 STEC στα τρόφιμα σε διάφορες χώρες κυμαίνεται. Οι διαφορές οφείλονται στις διαφορετικές πρακτικές επεξεργασίας των τροφίμων και επηρεάζονται από την εποχή, τις διαφορετικές κλιματολογικές συνθήκες, αλλά και τη γεωγραφία της κάθε περιοχής. Οι μεγαλύτερες διαφορές όμως αφορούν στο σχεδιασμό της μελέτης και στις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και απομόνωση των non-O157 STEC. Οι πιο αξιόπιστες εκτιμήσεις για τον επιπολασμό των non-O157 STEC στα τρόφιμα στηρίζονται σε μεθόδους ανίχνευσης των *stx* γονιδίων ή της παραγωγής Shiga τοξίνης [225].

Τα non-O157 STEC ανιχνεύονται συχνότερα από την *E. coli* O157:H7 στα τρόφιμα βόειας προέλευσης. Σε μελέτες, η *E. coli* O157:H7 O157 παρουσιάζεται σε ποσοστό 1% στα ωμά προϊόντα βόειας προέλευσης ενώ τα non-O157 σε ποσοστό από 2.4 έως 49.6% [143].

Στον Καναδά, στις ΗΠΑ και στο Ηνωμένο Βασίλειο, όπου χρησιμοποιήθηκαν αξιόπιστες μέθοδοι για την ανίχνευση των Shiga τοξινών σε ωμό βοδινό κρέας το ποσοστό κυμαίνεται από 5 έως 40% [124]. Στις ΗΠΑ, ανιχνεύθηκαν με την PCR *stx* γονίδια σε ποσοστό 5.7 έως 26.2% των εγχώριων βοδινών κρεάτων και στο 1.8 έως 15.6% των εισαγόμενων βοδινών κρεάτων [226]. Με τη χρήση παρόμοιων μεθόδων ο επιπολασμός στα βοδινά κρέατα κυμαίνεται από 15.5 έως 33.3% στον Καναδά [227], στην Αυστραλία [228], στη Γαλλία [229] και στη Σουηδία [230]. Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο επιπολασμός συμπεριλαμβανομένης και της *E. coli* O157:H7 σε βοδινό κρέας οκτώ ευρωπαϊκών χωρών ήταν χαμηλός από 0 έως 5.9% [231].

Η παρουσία των non-O157 STEC στα πρόβατα καθιστά πιθανή και την παρουσία τους στα αντίστοιχα προϊόντα τους. Ο επιπολασμός των *stx* γονιδίων σε πρόβεια κρέατα στις ΗΠΑ και στην Αυστραλία κυμαίνεται από 47.6% έως 75% [228], ενώ στο Βέλγιο το ποσοστό ήταν 6% [232] και στην Ευρώπη μηδενικό το 2005 [231].

Ο επιπολασμός των non-O157 STEC στα χοιρινά προϊόντα ήταν επίσης χαμηλός, στο Βέλγιο ήταν μηδενικός, ενώ στις άλλες χώρες της Ευρώπης κυμαίνεται από 0 έως 6.2%, στον Καναδά υπολογίζεται στο 15.3% και στις ΗΠΑ στο 18%. Ο επιπολασμός στα προϊόντα πουλερικών ήταν μικρότερος από 1% γι' αυτό και θεωρούνται μειωμένου κινδύνου στη μετάδοση των non-O157 STEC [225].

Το γάλα και τα υπόλοιπα γαλακτοκομικά προϊόντα από τα βοοειδή και τα άλλα γαλακτοπαραγωγά μηρυκαστικά αποτελούν πηγές μετάδοσης των non-O157 STEC καθώς έχουν συνδεθεί με επιδημίες [231]. Το γάλα επιμολύνεται από τις θηλές του μαστού του ζώου ή από το περιβάλλον της γαλακτοπαραγωγικής μονάδας κατά τη διάρκεια του αρμέγματος. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ορισμένα στελέχη STEC προκαλούν μαστίτιδα στις γαλακτοπαραγωγικές αγελάδες, με αποτέλεσμα την επιμόλυνση του γάλακτος [331]. Τα non-O157 STEC είναι ευαίσθητα στην παστερίωση, επομένως το νωπό γάλα και τα νωπά γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία κυρίως σε περιοχές όπου τα προϊόντα δεν παστεριώνονται. Ο επιπολασμός των STEC σε νωπά γαλακτοκομικά προϊόντα από βοοειδή, πρόβατα και αίγες ποικίλλει και κυμαίνεται από 0 έως 16.7% [233]. Η διακύμανση αυτή αντανακλά τόσο τις διαφορές στη μεθοδολογία όσο και τις διαφορές σε πρακτικές σε τοπικό αλλά και σε πολιτιστικό επίπεδο.

### **6.2.2 Επιπολασμός των non-O157 STEC σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης.**

Τα φρούτα και τα λαχανικά φαίνεται ότι αποτελούν σημαντική πηγή μετάδοσης non-O157 STEC στους ανθρώπους. Σε μια μελέτη επιδημιών του CDC στις ΗΠΑ το χρονικό διάστημα από 1973-1997 ανιχνεύθηκαν επιδημίες από non-O157 που σχετιζόνταν με την κατανάλωση καρότων και ανανά [234]. Παρότι οι λοιμώξεις από non-O157 STEC δεν καταγράφονταν στα υποχρεωτικώς δηλούμενα νοσήματα έως και το 2000, μια ανάλυση επιδημιών από το 1990-2004 κατέληξε στο συμπέρασμα ότι 27 από τις 84 οφείλονταν σε παθογόνο *E. coli* [235]. Το χρονικό διάστημα μεταξύ 1990-2007 καταγράφηκαν 11 τροφιμογενείς επιδημίες που αποδόθηκαν σε λοίμωξη από non-O157

στις ΗΠΑ [236]. Στις πέντε από αυτές δεν αναγνωρίστηκε η πηγή μετάδοσης, ενώ στις υπόλοιπες έξι ενοχοποιήθηκαν το salad bar, η σαλάτα, τα βατόμουρα, το γάλα και ο πάγος.

Η μεγαλύτερη επιδημία από non-O157 έως σήμερα ανιχνεύθηκε στη Γερμανία το 2011, αφορούσε στην κατανάλωση ωμών φύτρων και οφείλονταν στον ορότυπο O104:H4 [128].

### **6.3 Επιπολασμός της *E. coli* O157:H7 σε σφάγια και τρόφιμα φυτικής και ζωικής προέλευσης στην Ελλάδα.**

Δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες που να αφορούν στην απομόνωση της *E. coli* O157:H7 σε σφάγια, και προϊόντα φυτικής και ζωικής προέλευσης στην Ελλάδα. Μια πρόσφατη μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 1200 σφάγια. Τα δείγματα προέρχονταν 620 από βοοειδή, 130 από αίγες, 230 από πρόβατα και 220 από χοίρους, από διάφορα σφαγεία σε διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας. Δώδεκα στο σύνολο των 1200 δειγμάτων ήταν θετικά για την *E. coli* O157. Συγκεκριμένα 1.3% (8/620) προέρχονταν από βοοειδή, 0.8% (1/130) από αίγες, 1.3% (3/330) από πρόβατα και κανένα (0/220) από χοίρους. Τα θετικά δείγματα προέρχονταν από διαφορετικά σφαγεία και η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε διαφορετικές ημέρες [237].

Σε άλλη μελέτη, το 2003, διερευνήθηκε η παρουσία της *E. coli* O157:H7 σε διάφορα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων μερικών παραδοσιακών ελληνικών τροφίμων. Τα δείγματα ελήφθησαν από διαφορετικές κτηνοτροφικές μονάδες παραγωγής γάλακτος, σούπερ μάρκετ, καταστήματα λιανικής πώλησης και καντίνες κατά τη διάρκεια μιας περιόδου δυο ετών (2000-2001). Τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν σε τρεις κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία συμπεριλήφθηκαν 300 δείγματα γάλακτος, 100 δείγματα μη παστεριωμένου πρόβειου γάλακτος, 100 αγελαδινού γάλακτος και 100 αίγειου γάλακτος. Η δεύτερη κατηγορία περιελάμβανε προϊόντα κρέατος που δεν είχαν υποβληθεί σε θερμική επεξεργασία, 50 χάμπουργκερ βόειου κρέατος, 61 σάντουιτς που περιείχαν ζαμπόν, μαγιονέζα και μαρούλι και 64 νωπά τεμαχισμένα δείγματα βόειου κρέατος. Η τρίτη κατηγορία περιείχε παραδοσιακά ελληνικά προϊόντα, 75 νωπά λουκάνικα και 50

ακατέργαστα έντερα χοίρων προοριζόμενα για το παραδοσιακό ελληνικό κοκορέτσι. Τα δείγματα από το άψητο κοκορέτσι και του μη παστεριωμένου γάλακτος προέρχονταν από την περιοχή της Ηπείρου, ενώ τα δείγματα των προϊόντων κρέατος συμπεριλαμβανομένων των λουκάνικων προέρχονταν από τις αγορές της Αθήνας, της Θεσσαλονίκης και των Ιωαννίνων. Απομονώθηκαν τρία στελέχη *E. coli* O157:H7. Συγκεκριμένα, σε ένα (1.0%) από τα 100 δείγματα πρόβειου γάλακτος, σε ένα (1.3%) από τα 75 δείγματα νωπού παραδοσιακού λουκάνικου και σε ένα (2.0%) από τα 50 έντερα χοίρων που εξετάστηκαν και προορίζονταν για κοκορέτσι. Σε κανένα από το προσωπικό της κτηνοτροφικής μονάδας που εκτέθηκε στη μολυσμένη προβατίνα και και στο γάλα της δεν παρουσιάσθηκαν συμπτώματα λοίμωξης. Επίσης, δεν αναφέρθηκε καμία περίπτωση λοίμωξης από *E. coli* O157:H7 κατά τη διάρκεια της έρευνας στην κάθε περιοχή αλλά ούτε και αλλού στην Ελλάδα [238].

Η Kansouzidou και οι συνεργάτες της, το 1994 ερεύνησαν την παρουσία της *E. coli* O157 σε δείγμα κιμά στη Βόρεια Ελλάδα. Εξετάσθηκαν συνολικά 87 δείγματα από νωπό και κατεψυγμένο κιμά. Όλα τα δείγματα ήταν αρνητικά για *E. coli* O157:H7[239].

Σε άλλη μελέτη στην Ελλάδα για την απομόνωση της *E. coli* O157:H7 στο γάλα, συλλέχθηκαν συνολικά 2005 δείγματα νωπού γάλακτος. Η προέλευση των δειγμάτων ήταν: 950 από βοοειδή, 460 από αίγες και 595 από πρόβατα από διαφορετικές περιοχές της χώρας. Ο μικροοργανισμός απομονώθηκε από 29 (1.4%) δείγματα από τα οποία 21 (2.2%) προέρχονταν από νωπό βόειο γάλα, τρία (0.7%) από νωπό αίγειο γάλα και πέντε (0.8%) από πρόβειο γάλα [217]

Ο Lekkas και οι συνεργάτες του, το 2005, σε μελέτη που αφορούσε την επιβίωση της *E. coli* O157 στο γαλοτύρι απέδειξαν ότι η επιβίωση του μικροοργανισμού εξαρτάται από τον τύπο του τυριού, παρά το γεγονός ότι οι δύο τύποι που αναλύθηκαν, ένας βιομηχανικός και ο άλλος χειροποίητος, είχαν παρόμοιο pH, αλατότητα και συγκέντρωση γαλακτικού οξέος. Η *E. coli* O157:H7 επιβίωσε για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο χειροποίητο γαλοτύρι σε σχέση με το βιομηχανοποιημένο σε παρόμοιες συνθήκες [240]. Τέλος, σε μια μελέτη του Γκόβαρη και των

συνεργατών του παρουσιάζεται η συμπεριφορά του παθογόνου στο τυρί φέτα και τελεμέ που παρασκευάζονται από πρόβειο και αγελαδινό γάλα αντίστοιχα κατά τη διάρκεια της δέμηνης ωρίμανσής τους. Η μελέτη έδειξε ότι το παθογόνο δεν επιβιώνει πέραν του χρόνου ωρίμανσης των τυριών αυτών [332]. Σε μια άλλη μελέτη παρουσιάζεται η επιβίωση του παθογόνου σε τυρί φέτα και στην άλμη της [333] καθώς επίσης και σε βούτυρο βιολογικής ωρίμανσης κατά τη διάρκεια της συντήρησής του [334].

Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν έρευνες στις οποίες να εκτιμάται ο επιπολασμός σε φρούτα και σε λαχανικά στην Ελλάδα.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7<sup>ο</sup>. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΗΣ *E. COLI* O157:H7**

### **7.1 Καλλιέργεια και ορολογικές εξετάσεις για την ανίχνευση της *E. coli* O157:H7 σε κόπρανα ανθρώπων και ζώων.**

Οι τυποποιημένες δοκιμές, σύμφωνα με τα πρότυπα του Διεθνούς Οργανισμού Πιστοποίησης (ISO 16654/2001) για την παρουσία της *E. coli* O157:H7 στα περιττώματα των βοοειδών συνήθως περιλαμβάνουν την απομόνωση των βακτηρίων σε επιλεκτικά υποστρώματα για την παρουσία αποικιών που δε ζυμώνουν τη σορβιτόλη, την υποβολή τους σε ορολογικές και βιοχημικές δοκιμές (API 20E test), την ανίχνευση της δραστηριότητας της β-γλυκουρονιδάσης σε Chromocult Coliform agar, καθώς επίσης τον προσδιορισμό των αντιγόνων O (χρήση O157 αντιορού) και H (χρήση όλου του φάσματος αντιορρών H- από H1 έως H56) για την επιβεβαίωση της ταυτότητάς του.

### **7.2 Ταχείες μέθοδοι ανίχνευσης (screening)**

Αρκετές μέθοδοι screening είναι πλέον διαθέσιμες. Η ανοσολογική μέθοδος της ELISA (ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδος προσδιορισμού) ανιχνεύει την παρουσία Shiga τοξίνης στα κόπρανα, είτε άμεσα είτε μετά από καλλιέργεια, σε ειδικό θρεπτικό υλικό εξετάζοντας μόνο τις καθαρές απομονωμένες αποικίες. Η PCR (αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης) ανιχνεύει ένα ή περισσότερα κύρια γονίδια παθογένειας της *E. coli* O157:H7 (*fliC* γονίδιο ειδικό για το H7 αντιγόνο, *rfb* γονίδιο ειδικό για το O157 αντιγόνο, *eae* γονίδιο ειδικό για την ιντιμίνη και τα γονίδια των βεροτοξινών *stx1* και *stx2*) και χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση του στελέχους.

### **7.3 Μέθοδοι τυποποίησης**

Η τυποποίηση και υποτυποποίηση των στελεχών είναι μια πολύτιμη βοήθεια στη διερεύνηση επιδημιών να ανιχνευθούν σε ένα πρώιμο στάδιο, να βρεθούν οι πηγές της λοίμωξης, και να αυξηθεί η ειδικότητα του ορισμού της περίπτωσης. Οι κύριες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για

την τυποποίηση και την υποτυποποίηση είναι η Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) [241], η φαγοτυπία [242] και η Multiple Loci VNTR Analysis (MLVA) [243].

## **7.4 Μέθοδοι ανίχνευσης της *E. coli* O157:H7 στα τρόφιμα**

### **7.4.1 Προεμπλουτισμός και καλλιέργεια του δείγματος**

Η απομόνωση της *E. coli* O157:H7 στα τρόφιμα γίνεται με προεμπλουτισμό των δειγμάτων σε ειδικό εμπλουτιστικό ζωμό, επώαση στους 37 °C για 24 ώρες και στη συνέχεια καλλιέργεια του δείγματος με κατάλληλα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα. Οι διαδικασίες αυτές θεωρούνται απαραίτητες γιατί η λοιμογόνος δύναμη της *E. coli* O157:H7 είναι χαμηλότερη έναντι των υπόλοιπων εντεροβακτηρίων του δείγματος και έτσι επικράτησή της.

Τόσο ο εμπλουτιστικός ζωμός όσο και το θρεπτικό υπόστρωμα ενδείκνυται να εμπλουτίζονται με διάφορα αντιμικροβιακά σκευάσματα τα οποία καταστέλουν αποτελεσματικά την ανάπτυξη της ανταγωνιστικής χλωρίδας. Η χρήση του novobiocin [244] ή acriflavin [210] αφορά στην καταστολή των Gram αρνητικών μικροοργανισμών, ενώ η χρήση των vancomycin, cefsulodin και cefixime [245] αφορά στην καταστολή της *Aeromonas* spp. και του *Proteus* spp.

### **7.4.2 Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός**

Ο επιπλέον εκλεκτικός εμπλουτισμός μέσω του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού (IMS) είναι χρήσιμος για τα τρόφιμα, ειδικά για περιπτώσεις ύπαρξης μεγάλου αριθμού ανταγωνιστικών μικροβίων και μικρού αριθμού κυττάρων της *E. coli* O157:H7 χρησιμοποιώντας ειδικά μαγνητικά σφαιρίδια, επικαλυμμένα με ειδικά O157 αντισώματα. Η τεχνική του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού έχει βελτιώσει την δυνατότητα απομόνωσης του μικροοργανισμού από δείγματα τροφίμων, αυξάνοντας την ευαισθησία της μεθόδου από 10 μέχρι και 100 φορές [246].



Όλες οι υπόλοιπες μέθοδοι που περιγράφηκαν παραπάνω στην απομόνωση της *E. coli* O157:H7 στα κόπρανα ανθρώπων και ζώων μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την εργαστηριακή απομόνωση της *E. coli* O157:H7 στα τρόφιμα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8<sup>ο</sup>. ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ *E. COLI* O157:H7

### 8.1 Θεραπεία

Οι βασικοί στόχοι της θεραπευτικής αγωγής θα πρέπει να είναι η ανακούφιση του ασθενή με αιμορραγική κολίτιδα, η μείωση της διάρκειας των συμπτωμάτων, η πρόληψη των επικίνδυνων επιπλοκών (αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο και θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα) και ο περιορισμός της δευτερογενούς μετάδοσης της νόσου από άτομο σε άτομο.

Η χορήγηση μεγάλης ποσότητας υγρών, από το στόμα ή παρεντερικώς, εμφανίζεται αναγκαία σε περιπτώσεις αφυδατωμένων ασθενών με ολιγουρία. Από την άλλη, η χορήγηση υγρών σε ολιγουρικά παιδιά με αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο μπορεί να είναι επικίνδυνη, αφού μπορεί εύκολα να οδηγήσει σε υπερβολική ενυδάτωση, υπονατριαιμία και κόμμα.

Η χρήση αντιβιοτικών ακόμη και σήμερα αμφισβητείται από αρκετούς ερευνητές, ιδιαίτερα όταν δίνεται στα αρχικά στάδια της κολίτιδας από *E. coli* O157:H7 [247]. Η πλειοψηφία των μελετών συμφωνεί ότι η χορήγηση αντιβιοτικής αγωγής είτε δεν συνοδεύεται από ουσιαστική βελτίωση της κλινικής εικόνας του ασθενή είτε εντείνει τον κίνδυνο εμφάνισης αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου. Οι παρατηρήσεις βασίζονται στη χορήγηση διαφόρων τύπων αντιβιοτικών κατά τη διάρκεια επιδημιών και αφορούν διάφορα στάδια εξέλιξης της νόσου [89, 90, 248].

Πέρα από τις επιστημονικές ανακοινώσεις, υπάρχει και θεωρητικό υπόβαθρο ενάντια στη χρήση τους. Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες με τη λύση του βακτηριακού κυττάρου στην οποία καταλήγουν τελικά, προκαλούν αύξηση της ελεύθερης τοξίνης στον εντερικό αυλό, προκαλώντας συχνότερα συστηματική νόσο, και είναι πιο έντονη με τη χρήση αντιβιοτικών που αναστέλλουν τη βακτηριακή σύνθεση, όπως η σιπροφλοξασίνη και ο συνδυασμός τριμεθοπρίμης-σουλφοναμίδων. Η αύξηση αυτή έχει επιβεβαιωθεί και *in vitro* [249, 250]. Επιπλέον, αρκετά βακτήρια της ομάδας των STEC εμφανίζουν αντίσταση τουλάχιστον στα συνηθισμένα αντιβιοτικά, με αποτέλεσμα να ευνοούνται και να επικρατούν έναντι της υπόλοιπης μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου [251].

Η χρήση αντιδιαρροϊκών φαρμάκων και ειδικότερα αυτών που αναστέλλουν την κινητικότητα του εντέρου, φαίνεται και αυτή να αντενδείκνυται καθώς παρατείνει το χρόνο παραμονής του μικροβίου στον εντερικό σωλήνα και κατά συνέπεια την έκθεση του οργανισμού στις Shiga τοξίνες [252]. Στις περισσότερες περιπτώσεις επιδημιών η χορήγηση τέτοιων σκευασμάτων είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη διάρκεια αιμορραγικής διάρροιας και μεγαλύτερα ποσοστά με HUS και αλλοιώσεις από το κεντρικό νευρικό σύστημα [253]

Τέλος, θα πρέπει πάντα να υπάρχει η δυνατότητα χορήγησης παραγώγων αίματος, σταθεροποίησης των ηλεκτρολυτών, και αν χρειαστεί αιμοκάθαρσης [254]. Η θνητότητα που προκαλεί το HUS στα παιδιά έχει μειωθεί από 100% το 1955, σε 2.6% το 1998, τουλάχιστον για τον Καναδά, συνεχίζει όμως να αποτελεί ιδιαίτερα επικίνδυνη και σοβαρή νόσο [255]. Στοιχεία της ίδιας χώρας στην οποία παρουσιάζονται και τα υψηλότερα ποσοστά περιστατικών με HUS, αναφέρεται ότι στο 50% των παιδιών με HUS απαιτείται περιτοναϊκή κάθαρση ή αιμοκάθαρση για ένα διάστημα έως και δυο εβδομάδων περίπου. Η ίδια θεραπεία σε ολιγουρικά παιδιά με αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο μπορεί να είναι επικίνδυνη, αφού μπορεί εύκολα να οδηγήσει σε υπερβολική ενυδάτωση, υπονατρίαμια και κώμα

Η πρόληψη και ο έλεγχος των STEC θα πρέπει να αποτελεί μέρος ενός γενικότερου σχεδιασμού για την πρόληψη των τροφιμογενών λοιμώξεων και να αφορά όλα τα στάδια παραγωγής και επεξεργασίας των τροφίμων από το αγρόκτημα έως το πιάτο του καταναλωτή. Η προσπάθεια θα πρέπει να συνοδεύεται με την εισαγωγή νέων πρακτικών και μεθόδων, οι οποίες θα αντικαταστήσουν αρκετές από τις σημερινές συνήθειες και αντιλήψεις. Ο περιορισμός της *E. coli* O157:H7 αποτελεί νέα πρόκληση τόσο για τις βιομηχανίες τροφίμων όσο και για τις υπηρεσίες δημόσιας υγείας και μπορεί να επιταχύνει τη θεσμοθέτηση νέων συστημάτων ελέγχου, όπως το HACCP.

Οι βασικοί άξονες στους οποίους μπορεί να βασιστεί ένα πρόγραμμα εξάλειψης του μικροοργανισμού είναι ο περιορισμός της μόλυνση στο περιβάλλον του αγροκτήματος, στην κύρια

δεξαμενή του μικροοργανισμού, αλλά και στη διάθεση και στην κατανάλωση των προϊόντων που κινδυνεύουν να επιμολυνθούν.

### **8.1.1 Σύγχρονες Θεραπευτικές στρατηγικές έναντι της *E. coli* O157:H7 στους ανθρώπους.**

Το μεγαλύτερο ποσοστό HUS παρουσιάζεται στην παιδική ηλικία [256]. Η επίπτωση στη συνέχεια φαίνεται να μειώνεται καθώς αυξάνει η ηλικία, αλλά φαίνεται να παρουσιάζει μια νέα κορύφωση στα ηλικιωμένα άτομα [257]. Οροεπιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι τα αντισώματα της ανοσοσφαιρίνης G έναντι των Stx1 και Stx2 κυμαίνονται αντιστρόφως ανάλογα με την ειδική ηλικιακή προτίμηση του HUS ενισχύοντας την υπόθεση έτσι ότι αυτά τα αντισώματα συνδέονται ισχυρά με την άμυνα έναντι των τοξινών [258].

Μελέτες *in vitro* και *in vivo* έδειξαν ότι η δημιουργία αντισωμάτων έναντι των Shiga τοξινών αποτελεί έναν σημαντικό μηχανισμό άμυνας, παρόλα αυτά μικρή εξέλιξη πραγματοποιήθηκε σε αυτόν τον τομέα [259]. Το *E. coli* O157 O-ειδικό πολυσακχαριδικό συζευγμένο εμβόλιο στο οποίο ο O-ειδικός πολυσακχαρίτης συνδέεται με την *Pseudomonas aeruginosa exotoxin A*, βρέθηκε να είναι ασφαλές σε μικρά παιδιά [260].

Μια άλλη προσπάθεια στοχεύει στο να «μπλοκάρει» τη διείσδυση των τοξινών μέσα στα εντερικά κύτταρα χορηγώντας πολυσθενή ανάλογα υποδοχέων τοξίνης. Οι μελέτες αυτές παραμένουν ακόμη σε πειραματικό επίπεδο σε ζώα [261].

## 8.2 Πρόληψη

Η πρόληψη και ο έλεγχος των STEC θα πρέπει να αποτελεί μέρος ενός γενικότερου σχεδιασμού για την πρόληψη των τροφιμογενών λοιμώξεων και να αφορά όλα τα στάδια παραγωγής και επεξεργασίας των τροφίμων από τον πρωτογενή τομέα μέχρι το πιάτο του καταναλωτή. Ο περιορισμός της *E. coli* O157:H7 αποτελεί νέα πρόκληση τόσο για τις βιομηχανίες τροφίμων όσο και για τις υπηρεσίες δημόσιας υγείας και μπορεί να επιταχύνει τη θεσμοθέτηση νέων συστημάτων ελέγχου, όπως το HACCP.

Ο μεγάλος αριθμός των διαφορετικών οροτύπων STEC που απομονώνεται από τα κόπρανα των βοοειδών αλλά και των άλλων μηρυκαστικών περιορίζει τις ελπίδες για την ανάπτυξη μιας και μοναδικής στρατηγικής η οποία θα μπορούσε να λύσει το πρόβλημα. Για το λόγο αυτό οι περισσότερες μελέτες στον έλεγχο των STEC στο αγρόκτημα εστιάζουν το ενδιαφέρον τους στον ορότυπο *E. coli* O157:H7.

Οι βασικοί άξονες πάνω στους οποίους θα μπορούσε να βασιστεί ένα πρόγραμμα εξάλειψης του μικροοργανισμού περιγράφονται παρακάτω.

### 8.2.1 Μέτρα πρόληψης στο περιβάλλον εκτροφής

Η παρέμβαση στο περιβάλλον εκτροφής προσφέρει τη δυνατότητα μείωσης του μικροβιακού φορτίου των ζώων πριν αυτά εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα. Τα κόπρανα των βοοειδών αποτελούν πηγή μετάδοσης της *E. coli* O157:H7 τόσο στους ανθρώπους όσο και στο περιβάλλον. Η επιμόλυνση του περιβάλλοντος και της τροφής από το παθογόνο μπορεί να προληφθεί μέσω ελέγχου του μικροβιακού φορτίου στα βοοειδή και μέσω της κατάλληλης χρήσης και επεξεργασίας της κοπριάς που προέρχεται από τα ζώα αυτά [41]. Όπως έχει αποδειχθεί, ο χαμηλός επιπολασμός της *E. coli* O157:H7 στα βοοειδή, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της επιμόλυνσης του κρέατος και κατά συνέπεια τη μείωση της επίπτωσης στους ανθρώπους [262].

Η αναστολή της ανάπτυξης και της επιβίωσης της *E. coli* O157 στα βοοειδή μπορεί να πραγματοποιηθεί αυξάνοντας την αντοχή του ζώου έναντι του μικροοργανισμού μέσω των προβιοτικών. Τα προβιοτικά είναι συμβιωτικά βακτήρια με προορισμό να μειώσουν τα παθογόνα βακτήρια του γαστρεντερικού σωλήνα μέσω συναγωνιστικής αναστολής [263]. Τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν τα προϊόντα αυτά είχαν ποικίλλα αποτελέσματα [264]. Σε μικρές μονάδες εκτροφής βοοειδών όπου χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός της *L.acidophilus* NP51 και της *P.freudenreichii* παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στον επιπολασμό της *E. coli* O157, ενώ αντίθετα ο ίδιος συνδυασμός δεν οδήγησε σε σημαντική μείωση του παθογόνου σε μια μεγάλη μονάδα εκτροφής. Ο συνδυασμός αυτός των προβιοτικών έχει προσφάτως αδειοδοτηθεί από τις ΗΠΑ ως Bovamine Culture Complex Probiotic ( Nutrition Physiology Corp) [265].

Ένας άλλος τρόπος που μπορεί να εμποδίσει την επιβίωση της *E. coli* O157:H7 στο έντερο των βοοειδών είναι η χρήση αντιβιοτικών. Τα αντιβιοτικά δρουν άμεσα στα βακτήρια του γαστρεντερικού σωλήνα. Η χρήση της νεομυκίνης μειώνει σημαντικά τον αποικισμό των βοοειδών από *E. coli* O157:H7 [266]. Όμως η χρήση αντιβιοτικών σε ζώα που προορίζονται για κατανάλωση έρχεται σε αντίθεση με τις απόψεις σχετικά με την ανάπτυξη αντιβιοαντοχής και για το λόγο αυτό η νεομυκίνη δεν εγκρίθηκε για τη χρήση στα βοοειδή, ως παρέμβαση στην αντιμετώπιση της *E. coli* O157:H7.

Άλλοι τρόποι που προτείνονται για τη μείωση του μικροβιακού φορτίου της *E. coli* O157:H7 είναι η χρήση χλωριούχου νατρίου είτε στην τροφή είτε στο νερό μέσω της οποίας μειώνεται σημαντικά η *E. coli* O157 [264]. Τέλος, έχει προταθεί η χρήση βακτηριοφάγων έναντι της *E. coli* O157:H7 [267], όμως η δραστηκότητα τους σε φυσικές συνθήκες ποικίλλει και για το λόγο αυτό απαιτούνται επιπλέον έρευνες για να καθορίσουν αν τελικά η χρήση τους θα αποτελέσει στρατηγική παρέμβασης στα μηρυκαστικά [268].

Προς το παρόν, οι έλεγχοι και τα μέτρα πρόληψης για την *E. coli* O157:H7 στο αγρόκτημα είναι εθελοντικά και αποτελούν μέρος της ήδη υπάρχουσας τακτικής που εφαρμόζεται έως σήμερα χωρίς να επικεντρώνονται αποκλειστικά στον έλεγχο των STEC [269].

### 8.2.2 Ανάπτυξη εμβολίων στα βοοειδή

Η πρόοδος στην κατανόηση της βιολογίας του αποικισμού των STEC στα βοοειδή δημιούργησε νέες προοπτικές στην ανοσοποίηση έναντι των STEC [270]. Το LEE είναι υπεύθυνο για τον αποικισμό του τελικού τμήματος του εντέρου των βοοειδών από την *E. coli* O157:H7. Τα εμβόλια που χρησιμοποιούν το τμήμα του βακτηριακού χρωμοσώματος LEE, που κωδικοποιεί τις TSS πρωτεΐνες (Tir, EspA, and EspB), αξιολογήθηκαν θετικά στη χρήση τους στα βοοειδή. Τα εμβόλια που διατίθενται είναι τα εξής: type III secreted proteins vaccine (Bioniche® Life Sciences Inc., Belleville, Ontario, Canada) and a siderophore receptor and porin protein (SRP) vaccine (Eritorix®, LLC, Wilmar, MN, USA). Η δράση τους στηρίζεται στη δυνατότητά τους να περιορίζουν την ανάπτυξη της *E. coli* O157:H7 στον πεπτικό σωλήνα των ζώων, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη πιθανότητα μετάδοσης του παθογόνου στα τρόφιμα, στο νερό και στους ανθρώπους.

Πρόσφατα, μια ομάδα ερευνητών στο Guelph του Ontario, πραγματοποίησε μια μεταανάλυση αξιολογώντας και αναλύοντας τις ήδη υπάρχουσες μελέτες σχετικά με το πώς μπορούν να λειτουργήσουν τα εμβόλια στα βοοειδή σαν στρατηγική πρόληψης πριν αυτά οδηγηθούν στα σφαγεία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο εμβολιασμός έναντι της *E. coli* O157:H7 στα βοοειδή φαίνεται να αποτελεί ένα σημαντικό μέτρο παρέμβασης. Για παράδειγμα στις μελέτες όπου εξετάστηκαν βοοειδή πριν και μετά τη χορήγηση εμβολίου παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της *E. coli* O157:H7 της τάξης του 47% μετά τη χορήγηση δυο δόσεων του εμβολίου σε σχέση με αυτά που δεν έκαναν το εμβόλιο [271]. Σημαντική μείωση της *E. coli* O157:H7 στα κόπρανα των βοοειδών παρατηρήθηκε και σε μια τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή όταν το εμβόλιο χορηγήθηκε

τρεις φορές. Υπάρχουν όμως και μελέτες στις οποίες δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του επιπολασμού του μικροοργανισμού μετά τη χορήγηση του εμβολίου [272].

### 8.2.3 Μέτρα πρόληψης και έλεγχος στο περιβάλλον επεξεργασίας του κρέατος

Τα σφάγια μολύνονται από STEC είτε μέσω άμεσης επαφής με τα κόπρανα του ζώου κατά τη διάρκεια της σφαγής, είτε με τη μεταφορά κοπρανόδους περιεχόμενου κατά την εκδορά του ζώου, είτε μέσω άμεσης επαφή με εργαζόμενους ή εργαλεία που έχουν επιμολυνθεί. Καθώς η *E. coli* O157:H7 έχει απομονωθεί στα κόπρανα, στο έντερο και στα σφάγια, η πρόληψη της μόλυνσης των σφάγιων στα σφαγεία αποτελεί σημαντικό παράγοντα στον έλεγχο της λοίμωξης στους ανθρώπους.

Για την απομάκρυνση του κοπρανόδους περιεχόμενου από το δέρμα των ζώων εφαρμόζεται το πλύσιμο των ζώων με εκτοξευτήρες νερού ή με λουτρά, με την προϋπόθεση να μην στάζουν νερό κατά την έναρξη της εκδοράς. Πλύσιμο των βοοειδών για τρία λεπτά μείωσε το μικροβιακό φορτίο της *E. coli* O157:H7 στα σφάγια, αλλά όχι και την πιθανότητα επιμόλυνσής τους [273]. Πέρα από το πλύσιμο του ζώου, εφαρμόζεται και το πλύσιμο του σφάγιου με στόχο την απομάκρυνση των ρινισμάτων των οστών και του πηγμένου αίματος. Το πλύσιμο του σφάγιου μπορεί να γίνει με καθαρό νερό ή με τη χρήση κατάλληλων χημικών ουσιών μέσα σε αυτό. Παραδείγματα τέτοιων ουσιών είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (5%), το φωσφορικό νάτριο (8-12%), το οξικό οξύ (2%), το όζον (0.5%) και το γαλακτικό οξύ [274]. Άλλες μέθοδοι οι οποίες χρησιμοποιούνται είναι η χρήση υψηλής θερμοκρασίας, είτε μέσω του πλυσίματος του σφάγιου σε ζεστό νερό είτε μέσω της αποστείρωσης του με ατμό. Η χρήση σε συνδυασμό των τεχνικών καθαρισμού και απολύμανσης του σφάγιου είναι αποτελεσματικότερες στην εξάλειψη της *E. coli* O157:H7, από ό,τι καθεμιάς χωριστά [274].

Η *E. coli* O157:H7 είναι ευαίσθητη στην ακτινοβολία [274]. Μια δόση ακτινοβολίας γ της τάξης των 2-3 kGy θεωρείται κατάλληλη να απομακρύνει οποιοδήποτε παθογόνο, ακόμη και την *E. coli* O157:H7 από το ωμό κρέας [275]. Ένα από τα πλεονεκτήματα της ακτινοβολίας είναι ότι



μπορεί να εφαρμοστεί ακόμη και σε προπαρασκευασμένα προϊόντα κρέατος, ακόμη και σε εκείνα που είναι κατεψυγμένα. Η δόση που απαιτείται σε αυτές τις περιπτώσεις εξαρτάται από τη θερμοκρασία του προϊόντος (π.χ φρέσκο, κατεψυγμένο) κατά τη διάρκεια της ακτινοβολίας και επιπλέον από τη φυσική κατάσταση του μικροοργανισμού (π.χ παρουσία όξινου περιβάλλοντος). Η χρήση όμως ιονίζουσών ακτινοβολιών στα τρόφιμα δεν επιτρέπεται με την ισχύουσα νομοθεσία στην ΕΕ.

Η τρέχουσα τάση του συστήματος για μαζική παραγωγή και ταχεία διανομή των τροφίμων σε διευρυμένη γεωγραφική κλίμακα οδήγησε στη συσσώρευση μεγάλου αριθμού προϊόντων σε καθημερινή βάση [276]. Η τάση αυτή μπορεί να φανεί επικίνδυνη και να οδηγήσει σε περιπέτειες τη δημόσια υγεία αν δεν τηρηθούν οι κατάλληλες συνθήκες στην επεξεργασία, στη διάθεση και στην κατανάλωση των προϊόντων. Η ασφάλεια των τροφίμων στον τομέα της επεξεργασίας στηρίζεται στην ανάλυση κινδύνου (hazard analysis) και στον έλεγχο των κρίσιμων σημείων (Hazard Analysis Critical Control Points, HACCP) [277]. Η προσέγγιση αυτή δεν είναι ειδική για τον έλεγχο των STEC μόνο, αλλά αφορά γενικότερα τους υπάρχοντες βιολογικούς, χημικούς και φυσικούς κινδύνους. Επομένως το HACCP μπορεί να εφαρμοστεί στις γραμμές επεξεργασίας των τροφίμων ανάλογα με τις ανάγκες και την ιδιαίτερη επιδημιολογία της *E. coli* O157:H7 για τον περιορισμό της λοίμωξης από το παθογόνο.

#### **8.2.4 Μέτρα πρόληψης και ελέγχος στη διάθεση και στην κατανάλωση των προϊόντων**

Το μαγείρεμα του κρέατος στην κατάλληλη θερμοκρασία είναι ο πιο ασφαλής τρόπος αποφυγής των τροφιμογενών λοιμώξεων, συμπεριλαμβανομένης και της λοίμωξης από *E.coli* O157:H7 [274]. Συστήνεται η χρήση κατάλληλου θερμόμετρου για τον έλεγχο της θερμοκρασίας του φαγητού, το οποίο θα πρέπει να δείχνει τουλάχιστον 71°C σε όλα τα τμήματα του φαγητού. Αν δεν είναι δυνατή η χρήση θερμόμετρου συστήνεται στους καταναλωτές να αποφεύγουν τη βρώση κρέατος που δεν έχει ψηθεί καλά και είναι ακόμη ωμό (ροζ χρώμα) στο μέσο του.

Η επιμόλυνση των υπόλοιπων τροφίμων από μολυσμένο κρέας αποτελεί έναν σημαντικό τρόπο μετάδοσης της *E. coli* O157:H7. Για να το αποφύγουμε, θα πρέπει το ωμό κρέας να διατηρείται ξεχωριστά από τα άλλα έτοιμα για κατανάλωση τρόφιμα. Τα χέρια, τα δοχεία και τα εργαλεία θα πρέπει να πλένονται με ζεστό νερό και σαπούνι μετά την επαφή τους με ωμό κρέας. Τα μαγειρεμένα κρέατα δεν θα πρέπει να τοποθετούνται σε πιάτα στα οποία υπήρχαν προηγουμένως τα ωμά κρέατα, χωρίς αυτά να έχουν πλυθεί.

Τα άτομα με συμπτώματα γαστρεντερίτιδας αποτελούν υψηλό κίνδυνο για τη μετάδοση της λοίμωξης. Ιδιαίτερα για όσους ετοιμάζουν, σερβίρουν φαγητά ή διαχειρίζονται καθαρά πιάτα και μαχαιροπίρουνα για το σερβίρισμα, το πλύσιμο των χεριών με σαπούνι και νερό είναι απαραίτητο πριν ακουμπήσουν τα τρόφιμα ή άλλα αντικείμενα.

Η αλλαγή στις διατροφικές συνήθειες είναι σημαντική. Συστήνεται η κατανάλωση μόνο παστεριωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων και χυμών. Τα φρούτα και τα λαχανικά, ιδιαίτερα αυτά που καταναλώνονται ωμά, θα πρέπει να πλένονται σχολαστικά. Το κατάλληλο πλύσιμο και το καθάρισμα του προϊόντος πριν την κατανάλωση του δεν εξαλείφει τον κίνδυνο μετάδοσης αλλά μειώνει σημαντικά τον πληθυσμό του παθογόνου στην τροφή [275].

Προγράμματα τα οποία στοχεύουν στην ενημέρωση των καταναλωτών έχουν αναπτυχθεί για το σκοπό αυτό, όπως το Fight Bac <sup>TM</sup> ([www.fightbac.org](http://www.fightbac.org)). Τα προγράμματα αυτά τονίζουν την ανάγκη συχνού πλυσίματος των χεριών και των επιφανειών που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα, το διαχωρισμό των τροφίμων κατά την αποθήκευση και την προετοιμασία έτσι ώστε να αποφευχθεί η επιμόλυνση, το μαγείρεμα σε κατάλληλες θερμοκρασίες έτσι ώστε να καταστρέφονται τα παθογόνα που μπορεί να υπάρχουν καθώς και την άμεση ψύξη των τροφίμων.

Σε μια συστηματική ανασκόπηση των μέτρων πρόληψης και των προγραμμάτων που υπάρχουν σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων φαίνεται ότι η εκπαίδευση των χειριστών τροφίμων, οι τακτικοί έλεγχοι των χώρων παραγωγής και κατανάλωσης τροφίμων, και η εκπαίδευση της κοινότητας σχετικά με την ανάπτυξη τεχνικών σωστής διαχείρισης και προετοιμασίας των

τροφίμων στην οικία αποτελούν απαραίτητα συστατικά στη μείωση της έκθεσης του κοινού σε τροφιμογενή παθογόνα [278].

## **ΜΕΡΟΣ Β-ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### 1.1 Υλικά και μέθοδοι

#### 1.1.1 Δίκτυο πρωτοβάθμιας περίθαλψης για την καταγραφή των λοιμώξεων από *E. coli*

##### **O157:H7**

Για την καταγραφή της γαστρεντερίτιδας και κυρίως για την εκτίμηση της επίπτωσης των λοιμώξεων από *E. coli* O157, εγκαταστάθηκαν τρία επιδημιολογικά δίκτυα καταγραφής. Το δίκτυο πρωτοβάθμιας περίθαλψης, το δίκτυο δευτεροβάθμιας περίθαλψης και το δίκτυο των εργαστηρίων.

Στο δίκτυο πρωτοβάθμιας περίθαλψης συμμετείχαν συνολικά 22 ιατροί. Συγκεκριμένα: τρεις παθολόγοι, πέντε παιδίατροι, τρεις γενικοί γιατροί και τέσσερις αγροτικοί γιατροί από το Ν. Λάρισα, ένας παθολόγος και ένας παιδίατρος από το Ν. Μαγνησίας, ένας παθολόγος και ένας παιδίατρος από το Ν. Τρικάλων και ένας παθολόγος, ένας παιδίατρος και ένας γενικός ιατρός από το Ν. Καρδίτσας.

Το δίκτυο λειτούργησε σε εβδομαδιαία βάση με τη χρήση ειδικού δελτίου καταγραφής γαστρεντερίτιδας το οποίο ήταν χωρισμένο σε τρεις στήλες, στην πρώτη στήλη συμπλήρωναν το σύνολο των ασθενών που εξετάστηκαν, στη δεύτερη τον αριθμό των ασθενών με πιθανή μικροβιακή γαστρεντερίτιδα και στην τρίτη στήλη τον αριθμό των ασθενών με πιθανή ιογενή γαστρεντερίτιδα. **(Παράρτημα 1)**.

Η διάκριση μεταξύ μικροβιακής και ιογενούς γαστρεντερίτιδας στηρίχθηκε στην κλινική εικόνα και για το λόγο αυτό στο κάτω μέρος του δελτίου υπήρχε διευκρινιστικός ορισμός της γαστρεντερίτιδας καθώς και των όρων «πιθανή βακτηριακή γαστρεντερίτιδα» και «πιθανή ιογενής γαστρεντερίτιδα». Συγκεκριμένα ορίστηκαν ως εξής:

Γαστρεντερίτιδα: Αιφνίδια εμφάνιση συχνών υδαρών κενώσεων άνω των δυο ημερησίως, με ενίοτε συνοδά συμπτώματα εμετό, κακουχία, καταβολή, πυρετό, κοιλιακό άλγος.

Πιθανή βακτηριακή γαστρεντερίτιδα: Εμφάνιση ενός ή περισσότερων από τα παρακάτω σημεία ή συμπτώματα. Πρόσμειξη αίματος στις κενώσεις ή υψηλός πυρετός ή κωλικοειδή άλγη ή τεινεσμός ή ορθική έπειξη ή έντονη κακουχία.

Πιθανή ιογενής γαστρεντερίτιδα: Αρχίζει συνήθως με εμετούς και ακολουθείται από ηπιότερες εκδηλώσεις. Χαμηλός ή καθόλου πυρετός, ήπιο ή καθόλου κοιλιακό άλγος και κενώσεις χωρίς πρόσμειξη αίματος ή τεινεσμός. Στις μικρότερες ηλικίες δεν αποκλείεται η εμφάνιση αφυδάτωσης και βαριάς κλινικής εικόνας.

Το δελτίο καταγραφής γαστρεντερίτιδας συμπληρωνόταν, είτε μετά από τηλεφωνική επικοινωνία με τον γιατρό που συμμετέχει στο δίκτυο, είτε μέσω φαξ που αποστέλλονταν στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας στο τέλος κάθε εβδομάδας, όπου εγκαταστάθηκε σύστημα παρακολούθησης των δηλώσεων. Για την καταχώρηση των δεδομένων σχεδιάστηκε και αναπτύχθηκε βάση δεδομένων στο επιδημιολογικό πρόγραμμα EPI-INFO καθώς και προτυποποιημένη ανάλυση. **(Παράρτημα 2).**

### **1.1.2 Δίκτυο δευτεροβάθμιας περίθαλψης και δίκτυο εργαστηρίων για την καταγραφή των λοιμώξεων από *E. coli* O157:H7**

Στο δίκτυο δευτεροβάθμιας περίθαλψης συμμετείχαν τα πέντε νοσοκομεία της Περιφέρειας. Συγκεκριμένα, το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας ( Π.Π.Γ.Ν.Λ), το Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας (Γ.Ν.Λ), το Γενικό Νοσοκομείο Βόλου (Γ.Ν.Β), το Γενικό Νοσοκομείο Τρικάλων (Γ.Ν.Τ) και το Γενικό Νοσοκομείο Καρδίτσας (Γ.Ν.Κ).

Η συλλογή των στοιχείων γινόταν αυτόματα είτε από το τμήμα μηχανογράφησης των νοσοκομείων εφόσον υπήρχε, είτε από το γραφείο κίνησης του εκάστοτε νοσοκομείου.

Η αναζήτηση πραγματοποιούνταν με βάση την διάγνωση που αναγράφονταν στα εισιτήρια ή στα εξιτήρια των ασθενών. Η κλινική διάγνωση η οποία αναζητήθηκε ήταν η διάρροια.

Στο δίκτυο των εργαστηρίων συμμετείχαν τα μικροβιολογικά τμήματα των δημόσιων νοσοκομείων αλλά και μικροβιολόγοι ιδιωτικών μικροβιολογικών εργαστηρίων. Συγκεκριμένα, δυο μικροβιολόγοι από το Π.Π.Γ.Ν.Λ, τέσσερις μικροβιολόγοι από το Γ.Ν.Λ, τρεις από ιδιωτικά μικροβιολογικά εργαστήρια στη Λάρισα, δυο μικροβιολόγοι από το Γ.Ν.Β, τρεις μικροβιολόγοι από το Γ. Ν.Τ και δυο μικροβιολόγοι από το Γ.Ν.Κ.

Τα εργαστήρια κατεγράφαν τις διάρροιες. Τα κόπρανα στη συνέχεια μεταφέρονταν, ανακαλλιεργούνταν και φυλάσσονταν στο μικροβιολογικό τμήμα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Ειδικά για την καλλιέργεια κοπράνων που αφορούσε στην απομόνωση της *E. coli* O157:H7 δόθηκε στις περιπτώσεις που ζητήθηκε έντυπο με ειδικές αναλυτικές οδηγίες. **(Παράρτημα 3).**

Για την καταγραφή των εργαστηριακών δειγμάτων συμπληρώνονταν ειδική κάρτα καταγραφής εργαστηριακών δειγμάτων από το μικροβιολόγο ή τον παρασκευαστή του τμήματος καλλιιεργειών του νοσοκομείου. **(Παράρτημα 4).**

### **1.1.3 Διερεύνηση περιπτώσεων (case investigation)**

Για τη διερεύνηση των περιπτώσεων σχεδιάστηκαν δυο ερωτηματολόγια γαστρεντερίτιδας. Το ένα αφορούσε αποκλειστικά την περίπτωση λοίμωξης από *E. coli* O157:H7 και το άλλο τα υπόλοιπα εντεροπαθογόνα.

Το ερωτηματολόγιο για ασθενή από τον οποίο απομονώθηκε *E. coli* O157:H7 είχε πέντε ενότητες. Στην πρώτη ενότητα περιλαμβάνονταν τα δημογραφικά στοιχεία, όπως το φύλο, η ηλικία, η διεύθυνση και η περιοχή κατοικίας, το επάγγελμα και ο τόπος καταγωγής, στη δεύτερη ενότητα υπήρχαν εργαστηριακές πληροφορίες για το δείγμα όπως τον τρόπο συλλογής του δείγματος (κόπρανα σε βαμβακοφόρο στυλεό ή κόπρανα σε αποστειρωμένο δοχείο), την ημερομηνία συλλογής του, το σημείο αναφοράς του κρούσματος, καθώς και κλινικές πληροφορίες, στην τρίτη ενότητα ο ασθενής καλούνταν να απαντήσει ερωτήσεις σχετικά με τα

συμπτώματα που μπορεί να παρουσιάσει όπως διάρροια, κοιλιακό άλγος, πονοκέφαλο, αδυναμία, αλλά και για την ύπαρξη αντικειμενικών ευρημάτων όπως ο πυρετός αλλά και η παρουσία αίματος στα κόπρανα. Στο τέλος της ενότητας υπήρχαν ερωτήσεις που σχετίζονταν με την εξέλιξη του νοσήματος, όπως την πιθανή εκδήλωση αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου, θρομβωτικής θρομβοπενικής πορφύρας, την ανάγκη αιμοκάθαρσης ή το θάνατο. Στην τέταρτη ενότητα υπήρχαν ερωτήσεις για θέματα που αφορούν στη δημόσια υγεία, όπως για παράδειγμα το αν ο ασθενής εργάζεται σε παιδικό σταθμό, αν είναι επαγγελματίας υγείας, αν εργάζεται ως χειριστής τροφίμων. Τέλος, στην πέμπτη ενότητα συλλέγονταν σημαντικές επιδημιολογικές πληροφορίες σχετικά με τη διατροφή, όπως την κατανάλωση ύποπτων τροφίμων ή ποτών και τον τόπο κατανάλωσης αυτών, αλλά και πληροφορίες που αφορούσαν στις δραστηριότητες που πραγματοποίησε το άτομο σε διάστημα έως και επτά ημέρες πριν από την έναρξη των συμπτωμάτων. Τέλος, ο ασθενής καλούνταν να απαντήσει αν γνωρίζει άλλα άτομα που να παρουσίασαν παρόμοια κλινική εικόνα με τη δική του το τελευταίο διάστημα.**(Παράρτημα 5).**

Το ερωτηματολόγιο των υπόλοιπων εντεροπαθογόνων είχε τρεις ενότητες. Στην πρώτη ενότητα περιλαμβάνονταν τα δημογραφικά στοιχεία, όπως το φύλο, η ηλικία, η διεύθυνση και η περιοχή κατοικίας, το επάγγελμα και ο τόπος καταγωγής. Η δεύτερη ενότητα αφορούσε τα κλινικά στοιχεία, όπως την έναρξη των συμπτωμάτων, τη διάρκειά τους, και την κλινική συμπτωματολογία τους. Στην τελευταία ενότητα περιλαμβάνονταν ερωτήσεις που σχετίζονταν με τους παράγοντες κινδύνου και το ιστορικό έκθεσης του ατόμου σε αυτούς, ενώ στο τέλος υπήρχε μια ανοιχτή ερώτηση στην οποία ο ασθενής καλούνταν να αναφέρει ο ίδιος ποια θεωρεί την πιο πιθανή αιτία της ασθένειάς του.

Και τα δυο ερωτηματολόγια, με τη μορφή ερωτήσεων πολλαπλής επιλογής, συμπληρώνονταν είτε με τη μορφή άμεσης συνέντευξης-λήψη ιστορικού του ασθενούς εφόσον αυτός νοσηλευόταν στο νοσοκομείο, είτε με τηλεφωνική συνέντευξη μετά την έξοδό του από το νοσοκομείο.**(Παράρτημα 6).**



Τα στοιχεία των ασθενών και κυρίως τον αριθμό τηλεφώνου τον προμηθευόμαστε από το γραφείο κίνησης ή το τμήμα μηχανογράφησης των νοσοκομείων έπειτα από άδεια της διοίκησης.

## **1.2 Συλλογή Δειγμάτων**

### **1.2.1 Συλλογή ανθρωπίνων δειγμάτων**

Στη μελέτη αυτή συλλέχθηκαν δείγματα κοπράνων από τα μικροβιολογικά εργαστήρια των πέντε νοσοκομείων της κεντρικής Ελλάδας. Συγκεκριμένα, τα δείγματα προέρχονταν από το μικροβιολογικό εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, του Γενικού Νοσοκομείου Βόλου, του Γενικού Νοσοκομείου Τρικάλων και του Γενικού Νοσοκομείου Καρδίτσας. Συνολικά συγκεντρώθηκαν 667 δείγματα κοπράνων από διαρροϊκούς ασθενείς [279, 280], κατά τη διάρκεια της περιόδου καταγραφής από το Μάρτιο του 2006 έως το Δεκέμβριο του 2008. Τα κόπρανα που εξετάστηκαν προέρχονταν από ασθενείς οι οποίοι νοσηλεύτηκαν στο νοσοκομείο με την κλινική διάγνωση της γαστρεντερίτιδας.

### **1.2.2 Συλλογή δειγμάτων από κόπρανα ζώων**

Συνολικά 1010 δείγματα κοπράνων υγιών ζώων συλλέχθηκαν από κτηνοτροφικές μονάδες και οικόσιτα ζώα, εγκατεστημένα στην περιοχή της κεντρικής Ελλάδας, τη χρονική περίοδο μεταξύ Μαρτίου και Οκτωβρίου 2008. Τα δείγματα προέρχονταν από το δάπεδο των κτηνοτροφικών μονάδων και η συλλογή έγινε χρησιμοποιώντας αποστειρωμένες σπάτουλες και αποστειρωμένους ουροσυλλέκτες, έτσι ώστε να αποευχθεί η επιμόλυνση. Τα δείγματα προέρχονταν 140 από βοοειδή, 178 από αίγες, 361 από πρόβατα, 106 από χοίρους και 225 από όρνιθες. Η επιλογή των ζώων ήταν τυχαία, και προέρχονταν από 14 μονάδες με βοοειδή, 18 μονάδες με αίγες, 36 μονάδες με πρόβατα, 10 μονάδες με χοίρους και 25 μονάδες με όρνιθες. Οι κτηνοτροφικές μονάδες των βοοειδών και των χοίρων που έλαβαν μέρος στη μελέτη ήταν μικρού μεγέθους (50 ζώα κατά μέσο όρο), ενώ οι μονάδες των αιγοπροβάτων ήταν μεγαλύτερες (100 ζώα

κατά μέσο όρο). Τα πτηνοτροφεία που έλαβαν μέρος στη μελέτη, ήταν κατά κύριο λόγο, μικρές οικόσιτες μονάδες (10 ζώα κατά μέσο όρο). Η επιλογή των μονάδων που συμμετείχαν στην έρευνα έγινε τυχαία χρησιμοποιώντας μια λίστα στην οποία καταγράφονταν όλες οι μονάδες της περιοχής. Τα δείγματα κοπράνων που συλλέγονταν, τοποθετούνταν σε ξεχωριστά, αποστειρωμένα δοχεία και μεταφέρονταν στο εργαστήριο εντός το λιγότερο δύο ωρών από τη συλλογή τους, στους 4 °C, χρησιμοποιώντας ειδικά ισοθερμικά δοχεία.

Παράλληλα, για τη συλλογή πιο ειδικών στοιχείων που αφορούσαν στα ζώα από όπου προέρχονταν τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε ερωτηματολόγιο, το οποίο περιελάμβανε ερωτήσεις για το είδος του ζώου (αν δηλαδή είναι γαλακτοπαραγωγό, αν εκτρέφεται για το κρέας του), την ηλικία του, το φύλο, τη φυλή, τη διατροφή του ζώου (τυποποιημένη τροφή ή ελευθέρως βοσκής), τις συνθήκες σταβλισμού, τον τόπο της εκμετάλλευσης, το μέγεθος του κοπαδιού, την περιοχή προέλευσης του ζώου (εξετάστηκαν μόνο ελληνικής προέλευσης ζώα και συγκεκριμένα μόνο από την περιοχή της Θεσσαλίας). Το ερωτηματολόγιο συμπληρώνει ο κτηνοτρόφος της μονάδας **(Παράρτημα 7)**.

### 1.2.3 Συλλογή προϊόντων ζωικής προέλευσης

Συνολικά εξετάστηκαν τριάντα δείγματα κρεατοσκευασμάτων και τριάντα δείγματα γάλακτος. Τα δείγματα κρεατοσκευασμάτων προέρχονταν από τοπικούς παραγωγούς κρεατοσκευασμάτων βόειου και χοιρινού κρέατος, από την περιοχή της κεντρικής Ελλάδας, την περίοδο από το Μάρτιο έως το Μάιο του 2008. Από το σύνολο των 30 δειγμάτων κρεατοσκευασμάτων, τα 20 δείγματα προέρχονταν από βόειο κρέας, τα 9 δείγματα από χοιρινό και ένα δείγμα από κοτόπουλο. Η επιλογή των παραγωγών έγινε τυχαία, και τα δείγματα συλλέχθηκαν συνολικά από 15 διαφορετικούς παραγωγούς κρέατος. Τα δείγματα των κρεατοσκευασμάτων τοποθετήθηκαν σε ειδικές αποστειρωμένες σακούλες και τοποθετήθηκαν σε ψυχόμενο δοχείο για τη μεταφορά τους από τον παραγωγό μέχρι το εργαστήριο.

Επιπλέον, εξετάστηκαν 25 δείγματα μη παστεριωμένου αγελαδινού γάλακτος και πέντε δείγματα μη παστεριωμένου πρόβειου γάλακτος. Τα δείγματα μη παστεριωμένου γάλακτος προέρχονταν από μεγάλη εταιρεία παραγωγής γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων της Ελλάδας. Το κάθε δείγμα του αγελαδινού γάλακτος αντιστοιχούσε σε συγκεκριμένη κτηνοτροφική μονάδα η οποία διέθετε κωδικό έγκρισης από την κτηνιατρική υπηρεσία. Το γάλα συγκεντρώνονταν στις παγολεκάνες της κάθε κτηνοτροφικής μονάδας σε θερμοκρασία μικρότερη από 4 °C, στη συνέχεια συγκεντρώνονταν από βυτίο ψυγείο της εταιρείας και πήγαινε στο σταθμό συγκέντρωσης γάλακτος. Τα πέντε δείγματα από πρόβειο νωπό γάλα προέρχονταν από μεμονωμένες κτηνοτροφικές γαλακτοκομικές μονάδες του νομού Λάρισας.

Όλα τα δείγματα γάλακτος που εξετάστηκαν, τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα, γυάλινα δοχεία και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο στους 4 °C, εντός 6-12 ώρες μετά τη δειγματοληψία. Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στο εργαστήριο, μέχρι την έναρξη των μικροβιολογικών αναλύσεων, η οποία ξεκινούσε συνήθως εντός 24ώρου από τη δειγματοληψία.

#### **1.2.4 Συλλογή προϊόντων φυτικής προέλευσης**

Συνολικά 60 δείγματα από 11 διαφορετικά είδη λαχανικών συλλέχθηκαν από σούπερ μάρκετ, λαϊκές αγορές και βιολογικές καλλιέργειες από την περιοχή της κεντρικής Ελλάδας τη χρονική περίοδο μεταξύ Μαρτίου και Ιουνίου του 2010.

Σε όλα τα λαχανικά που εξετάστηκαν πιθανολογείται ότι χρησιμοποιήθηκε κοπριά ως λίπασμα, καθώς ήταν βιολογικής παρασκευής, αν και συγκεκριμένες πληροφορίες δεν ήταν διαθέσιμες. Τα λαχανικά τα οποία επιλέξαμε να εξετάσουμε σε αυτή τη μελέτη ήταν αυτά τα οποία είτε βρίσκονται πολύ κοντά στο έδαφος είτε βρίσκονται σε άμεση επαφή με το έδαφος και μπορούν να καταναλωθούν χωρίς να μαγειρευθούν ή να υποστούν οποιαδήποτε άλλη διαδικασία εκτός από το πλύσιμο και/ή το ξεφλούδισμα. Συγκεκριμένα τα λαχανικά τα οποία εξετάστηκαν ήταν ρόκα, μαρούλι, μαιντανός, παντζάρια, σπανάκι, φρέσκο κρεμμυδάκι, άνηθος, σέλινο, καρότα, πράσσα και

σκόρδο. Τα δείγματα των λαχανικών μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένες σακούλες χωρίς να πλυθούν ή να απομακρυνθούν τα χρώματα από πάνω τους. Σε κάθε σακούλα αναγραφόταν το είδος του προϊόντος, ο αριθμός του δείγματος, η ημερομηνία συλλογής και ο τόπος συλλογής του δείγματος. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε δοχεία με παγοκύστεις και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο. Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στο εργαστήριο μέχρι την έναρξη των μικροβιολογικών αναλύσεων, η οποία ξεκινούσε συνήθως εντός 48 ωρών από τη δειγματοληψία.

## **ΚΕΦ 2<sup>ο</sup>. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ *E. COLI* O157:H7**

### **2.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση της *E. coli* O157:H7 σε ανθρώπινα κόπρανα και σε κόπρανα ζώων.**

Για την απομόνωση του μικροοργανισμού, όλα τα δείγματα ενοφθαλμίζονταν σε θρεπτικό υλικό MacConkey καθώς επίσης και σε θρεπτικό υλικό MacConkey με σορβιτόλη (SMAC) και επωάζονταν στους 35-37 °C για 16-24 ώρες. Οι αποικίες που δεν ζύμωναν τη σορβιτόλη επιλέγονταν από τρυβλίο με SMAC θρεπτικό υλικό (5 άχρωμες αποικίες/ τρυβλίο) και στη συνέχεια ταυτοποιούνταν με τη χρήση API 20E (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) και αντιορών με *E. coli* O157 Latex serotyping και συγκόλληση σε πλάκα (Oxoid, UK). Οι αποικίες αυτές εξετάζονταν επιπλέον για την ανίχνευση της Stx1 και/ή της Stx2 με τη χρήση ανοσολογικής μεθόδου ELISA (ELISA-Premier EHEC, Meridian Diagnostics, Nice Cedex 3, France). Στη συνέχεια, οι αποικίες που παρήγαγαν τοξίνη ταυτοποιούνταν γονιδιακά μέσω της PCR η οποία περιείχε primers για *rfbE<sub>o157</sub>*, *fliC<sub>h7</sub>*, *stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>* και *eae* γονίδια [281].

### **2.2 Απομόνωση και ταυτοποίηση της *E. coli* O157:H7 σε κρέατα και σε λαχανικά**

Η διαδικασία της μεθόδου που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω: Εικοσιπέντε γραμμάρια κάθε δείγματος προστίθεντο σε 225 mL ειδικού υποστρώματος (modified tryptone soya broth with novobiocin [MTSB+N]) και ακολουθούσε ομογενοποίηση σε Stomacher. Μετά την ομογενοποίηση σε Stomacher, τα δείγματα αρχικώς επωάζονταν στους 41.5 °C στην αρχή και στη συνέχεια επιπλέον για 12-16 ώρες στους 37 °C. Ο συνολικός χρόνος επώασης ήταν 18-24 ώρες.

Έπειτα, 100 μl από κάθε προεμπλουτισμένο δείγμα επιστρώνονταν σε δυο διαφορετικά υλικά (SMAC και MacConkey άγαρ). Τα τρυβλία επωάζονταν στους 37 °C για 18 με 24 ώρες. Οι άχρωμες αποικίες (δεν ζύμωναν τη σορβιτόλη, 5 αποικίες ανα δείγμα) εξετάζονταν για ταυτοποίηση και επανακαλλιεργούνταν σε Nutrient agar plates. Τα τρυβλία επωάζονταν για 18-24 ώρες στους 37 °C και ταυτοποιούνταν χρησιμοποιώντας API20E (Analytical Profile Index, bioMerieux, Marcy

l'Etoile, France). Όλες οι ύποπτες αποικίες ταυτοποιούνταν ορολογικά με έλεγχο συγκόλλησης με αντιγόνο O157. Οι αποικίες αυτές εξετάστηκαν για την ανίχνευση παραγωγής τοξίνης με τη χρήση ELISA καθώς επίσης και για την παρουσία των των *stx1*, *stx2* και *eae* γονιδίων με τη χρήση PCR.

### 2.3 Απομόνωση της *E. coli* O157:H7 στο γάλα

Για την απομόνωση της *E. coli* O157:H7 στο γάλα ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: 10 ml γάλακτος τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένη σακούλα που περιείχε 90 ml τροποποιημένου Tryptone Soya Broth με novobiocin (mTSB-n) προθερμασμένο στους 41.5 °C. Ακολουθούσε ομογενοποίηση του δείγματος σε Stomacher. Μετά την ομογενοποίηση σε Stomacher, τα εμπλουτισμένα δείγματα επωάζονταν στους 41.5 °C για 6 ώρες. Στη συνέχεια σε πλαστικό σωληνάριο Ependorf τοποθετούνταν 1ml από το υπερκείμενο της εμπλουτισμένης καλλιέργειας μαζί με 20 ml των ανοσομαγνητικών σφαιριδίων σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθούσε ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα με ρυθμό 15r/min για 10 λεπτά. Έπειτα πραγματοποιούνταν ανοσομαγνητικός διαχωρισμός και στη συνέχεια έκπλυση του συμπλέγματος σφαιριδίων-μικροβίων με αποστειρωμένο διάλυμα έκπλυσης phosphate buffered saline (PBS) για τρεις φορές. Στη συνέχεια ακολουθούσε επαναιώρηση σε 100 ml του προαναφερθέντος διαλύματος buffer. Έπειτα 50 ml των ξεπλυμένων επαναιωρημένων μαγνητικών σωματιδίων ενοφθαλμιζόνταν σε υπόστρωμα σορβιτόλης MacConkey άγαρ που περιείχε και κεφιζίμη (2.5 mg/L) και τελλουρίτη (0.05 mg/L) (CT-SMAC). Τα CT-SMAC τρυβλία επωάζονταν στους 37 °C για 24 ώρες. Οι καθαρές και άχρωμες αποικίες που είχαν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της *E. coli* στρώνονταν σε Tryptone Soy Agar (TSA) και ταυτοποιούνταν χρησιμοποιώντας API20E. Όλες οι ύποπτες αποικίες ταυτοποιούνταν ορολογικά με έλεγχο συγκόλλησης με αντιγόνο O157. Οι ύποπτες αποικίες εξετάζονταν για την ανίχνευση παραγωγής τοξίνης με τη χρήση ELISA και οι θετικές για την παραγωγή τοξίνης θα εξετάζονταν επιπλέον με PCR για την παρουσία των γονιδίων O157, H7, *stx1*, *stx2* και *eae*.

## **ΚΕΦ 3<sup>ο</sup>. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **3.1 Αποτελέσματα από τα δίκτυα επιδημιολογικής επιτήρησης**

#### **3.1.1 Αποτελέσματα από το δίκτυο πρωτοβάθμιας περίθαλψης για την καταγραφή των λοιμώξεων από *E. coli* O157:H7**

Το χρονικό διάστημα από το Μάρτιο του 2006 έως τον Απρίλιο του 2007 καταχωρήθηκαν συνολικά 617 δελτία, από τα οποία τα 156 στάλθηκαν με φαξ στο εργαστήριο υγιεινής και επιδημιολογίας, (μόνο πέντε από τους ιατρούς προτίμησαν αυτόν τον τρόπο επικοινωνίας), ενώ τα υπόλοιπα συμπληρώνονταν μετά από τηλεφωνική επικοινωνία μαζί τους.

Κατά τη διάρκεια της συλλογής των δεδομένων των δελτίων καταγραφής γαστρεντερίτιδας, αυτό το οποίο αξίζει να σημειωθεί ήταν η μεγάλη αύξηση κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας που παρατηρήθηκε στην περιοχή των Τρικάλων ιδιαίτερα τους μήνες Μάρτιο, Απρίλιο, Μάιο 2007 συγκριτικά με τους ίδιους μήνες του προηγούμενου έτους. Για το λόγο αυτό και έπειτα από κινητοποίηση των τοπικών αρχών πραγματοποιήθηκε επιδημιολογική διερεύνηση από το εργαστήριο υγιεινής και επιδημιολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε συνεργασία με το ΚΕΕΛΠΝΟ, χωρίς να ανευρεθεί τελικά το αίτιο στο οποίο οφείλονταν η αύξηση των κρουσμάτων.

#### **3.1.2 Αποτελέσματα από το δίκτυο δευτεροβάθμιας περίθαλψης και δίκτυο εργαστηρίων για την καταγραφή των λοιμώξεων από *E.coli* O157:H7**

Συγκεντρώθηκαν συνολικά 667 δείγματα από τα νοσοκομεία και τα δυο ιδιωτικά εργαστήρια στη Λάρισα. Συγκεκριμένα, τα δείγματα προέρχονταν: 287 από το μικροβιολογικό τμήμα του Π.Π.Γ.Ν.Λ, 236 από το Γ.Ν.Λ, 97 από το Γ.Ν.Β, 25 από το Γ.Ν.Τ, 11 από το Γ.Ν.Κ και 11 από ιδιωτικά εργαστήρια στη Λάρισα.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των ανθρώπινων δειγμάτων περιγράφονται παρακάτω στο κεφάλαιο αποτελέσματα εργαστηριακών δειγμάτων.

### 3.1.3 Αποτελέσματα από τη διερεύνηση περιπτώσεων με τη χρήση ερωτηματολογίου στους ασθενείς με διάρροια

Συμπληρώθηκαν συνολικά 180 ερωτηματολόγια. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων των ερωτηματολογίων προέκυψαν μια μεμονωμένη περίπτωση με πιθανή λοίμωξη από *E. coli* O157:H7 και δυο εξάρσεις κρουσμάτων, οι οποίες όμως δεν οφείλονταν στην *E. coli* O157:H7 αλλά σε άλλους παθογόνους παράγοντες.

Ως έξαρση κρουσμάτων ορίστηκε η παρουσία δύο ή περισσότερων κρουσμάτων με λοίμωξη από το ίδιο παθογόνο και τα οποία σχετίζονται με κοινό παράγοντα κινδύνου.

Συγκεκριμένα, η πρώτη έξαρση κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας εκδηλώθηκε στην Καλλιθέα Χαλκιδικής μετά από βρώση γεύματος σε ξενοδοχείο της περιοχής στις 13/05/06.

Οι ασθενείς που παρουσίασαν αιμορραγικές διάρροιες, υψηλό πυρετό, έντονο κοιλιακό άλγος, ναυτία και εμετούς ήταν συνολικά 16 μεταξύ των οποίων και πέντε Γερμανοί. Από αυτούς οκτώ άτομα μεταφέρθηκαν στο νοσοκομείο διότι παρουσίασαν βαρύτερη συμπτωματολογία. Ειδικότερα, έξι νοσηλεύτηκαν στο διαβαλκανικό νοσοκομείο Θεσσαλονίκης και δυο στο Γ.Ν.Α .

Για το περιστατικό αυτό το εργαστήριο υγιεινής και επιδημιολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας ειδοποίησε με έγγραφη επιστολή το ΚΕΕΛΠΝΟ για την περαιτέρω διερεύνηση και έλεγχο της κάθε περίπτωσης. Από τις καλλιέργειες κοπράνων των ασθενών που εισήχθησαν στα νοσοκομεία και τους δυο ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στο Γ.Ν.Α απομονώθηκε *Salmonella* Enteritidis όπως συνέβει και σε δυο από τους έξι ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στο διαβαλκανικό νοσοκομείο Θεσσαλονίκης.

Η δεύτερη έξαρση κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας έλαβε χώρα στο χωριό Νερόμυλοι Αγιάς της Λάρισας. Τα συμπτώματα των ασθενών με κυρίαρχα αυτά της διάρροιας και του εμετού, καθώς και χαμηλή πυρετική κίνηση ξεκίνησαν στις 30/06/07 συνεχίστηκαν για δυο ημέρες και αφορούσαν μεγάλο αριθμό ατόμων (>50). Από τα άτομα που παρουσίασαν τα συμπτώματα κανένα δεν χρειάστηκε να νοσηλευτεί στο νοσοκομείο, σε 32 από αυτά δόθηκαν οι πρώτες βοήθειες στο Κέντρο



Υγείας Αγιάς ενώ στα υπόλοιπα άτομα η νόσος αυτοπεριορίστηκε. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αυτής της επιδημίας ήταν το γεγονός ότι δυο ημέρες πριν είχε προηγηθεί μεγάλη φωτιά στην περιοχή της Αγιάς. Το κοινό σημείο μεταξύ των ασθενών ήταν η προέλευση του πόσιμου νερού από κοινό δίκτυο ύδρευσης. Αυτή η έξαρση κρουσμάτων δεν μπόρεσε να διερευνηθεί σε βάθος διότι ο αριθμός των δειγμάτων κοπράνων που συλλέχθηκαν ήταν πολύ περιορισμένος, μόλις τρία δείγματα κοπράνων, με αποτέλεσμα να μη γίνει γνωστό το πιθανό αίτιο της έξαρσης κρουσμάτων.

Η μεμονωμένη περίπτωση με πιθανή λοίμωξη από *E. coli* O157:H7 αφορούσε θήλυ άτομο ηλικίας 2,5 ετών με γνωστό ιστορικό Σ. Arnold-Chiari, το οποίο νοσηλεύόταν στην παιδιατρική κλινική του Π.Π.Γ.Ν.Α. Συγκεκριμένα, το παιδί κατά το 5<sup>ο</sup> εικοσιτετράωρο νοσηλείας του παρουσίασε αιμορραγικές διαρροϊκές κενώσεις 10 στον αριθμό και πυρετό ως 38 °C που διήρκησε 12 ώρες. Στο επόμενο εικοσιτετράωρο δεν εμφάνισε άλλες κενώσεις, τις βραδινές όμως ώρες, παρουσίασε ολιγουρία με προοδευτική εγκατάσταση ανουρίας και υπνηλίας. Από τις εργαστηριακές εξετάσεις το παιδί παρουσίασε αναιμία, αύξηση ουρίας και κρεατινίνης και αιμοπετάλια <150.000.

Το παιδί χρειάστηκε να μεταγιστεί και να νοσηλευτεί στη μονάδα αυξημένης φροντίδας της παιδιατρικής κλινικής του Π.Π.Γ.Ν.Α, από όπου στη συνέχεια διακομίστηκε στη Β΄ Παιδιατρική του νοσοκομείου Αγλαΐα-Κυριακού όπου τελικά υποβλήθηκε σε αιμοκάθαρση.

Στις καλλιέργειες κοπράνων της ασθενούς απομονώθηκαν *E. coli* και άχρωμες αποικίες στο MacConkey με σορβιτόλη. Στις αποικίες όμως που εξετάστηκαν δεν πιστοποιήθηκε η παρουσία του O157 ή του H7 αντιγόνου μετά από εξέταση με ειδικούς αντιορούς, που πραγματοποιήθηκε στο μικροβιολογικό τμήμα του Π.Π.Γ.Ν.Α. Από τα δεδομένα που συλλέχθηκαν δεν προέκυψε ότι το περιστατικό αυτό αποτελούσε μέρος επιδημίας, αλλά ότι επρόκειτο για μεμονωμένο κρούσμα.

## **3.2 Αποτελέσματα εργαστηριακών δειγμάτων.**

### **3.2.1 Ανθρώπινα δείγματα**

Τρία δείγματα (0.5%) από το σύνολο των 667 ανθρώπινων δειγμάτων που εξετάστηκαν, ήταν θετικά για την ανίχνευση των τοξινών, Stx1, Stx2 ή και των δυο μέσω της ELISA. Τα τρία θετικά στην ELISA δείγματα εξετάστηκαν περαιτέρω με τη χρήση της PCR και κανένα από αυτά τα στελέχη δεν βρέθηκε να εκφράζει τα *rfbE*<sub>O157</sub>, *fliC*<sub>h7</sub>, *stx1*, *stx2* και *eae* γονίδια.

### **3.2.2 Δείγματα από κόπρανα ζώων**

Η ανάλυση των δειγμάτων με τη μέθοδο της ELISA έδειξε ότι 80 από τα 1010 δείγματα που εξετάστηκαν ήταν θετικά για Stx1, Stx2 ή και για τις δυο τοξίνες. Τα δείγματα τα οποία ήταν θετικά στην ELISA εξετάστηκαν περαιτέρω με τη μέθοδο της PCR με την οποία ταυτοποιήθηκαν 51 STEC στελέχη στα κόπρανα των ζώων. Οκτώ (15.7%) από τα 51 PCR-θετικά στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *E. coli* O157:H7 και τα υπόλοιπα 43 PCR-θετικά στελέχη θεωρήθηκαν non-O157 STEC.

Ο επιπολασμός των non-O157 STEC ανα είδος ζώου φαίνεται στον πίνακα 4. Τα non-O157 STEC στελέχη απομονώθηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό από τα πρόβατα (30/361, 8.3%) και τις αίγες (11/178, 6.2%) σε σχέση με τα βοοειδή (2/140, 1.4%). Δεν απομονώθηκαν τοξινογόνα στελέχη *E. coli* από τους 106 χοίρους και τις 225 όρνιθες που εξετάστηκαν.

**Πίνακας 4.** Κατανομή της *E. coli* O157:H7 και των non-O157 STEC σε κόπρωνα ζώων μετά την εξέτασή τους με τη χρήση της ELISA και της PCR και εκτιμώμενος επιπολασμός τους.

Κόπρωνα ανα είδος ζώου που εξετάστηκαν	Αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν	Αριθμός (%) των θετικών δειγμάτων με ELISA	Αριθμός (%) των θετικών δειγμάτων με PCR	<i>E. coli</i> O157:H7	Non-O157 STEC
Αίγες	178	8 (4.5)	12 (6.7)	1 (0.6)	11 (6.2)
Χοίροι	106	0	0	0	0
Όρνιθες	225	0	0	0	0
Πρόβατα	361	68 (18.8)	37 (10.2)	7 (1.9)	30 (8.3)
Βοοειδή	140	4 (2.9)	2 (1.4)	0	2 (1.4)
Σύνολο	1010	80 (7.9)	51 (5)	8 (0.8)	43 (4.3)

*E. coli* O157:H7 στελέχη απομονώθηκαν από 7/361 (1.9%) πρόβατα και 1/178 (0.6%) αίγες. Από τα συνολικά επτά θετικά στελέχη στα κόπρωνα προβάτων, πέντε προέρχονταν από την ίδια κτηνοτροφική μονάδα, ενώ τα υπόλοιπα δυο προέρχονταν από διαφορετικές κτηνοτροφικές μονάδες. Όπως μπορούμε να δούμε στον πίνακα 4, η *E. coli* O157:H7 δεν απομονώθηκε σε κόπρωνα βοοειδών αλλά ούτε και σε κόπρωνα από χοίρους και από όρνιθες που εξετάστηκαν.

Η PCR για την ανίχνευση shiga toxin γονιδίων στα 43 non-O157 STEC έδειξε ότι 5 (11.6%) στελέχη φέρουν το *stx1* γονίδιο, 1 (2.3%) φέρει το *stx2* γονίδιο και 1 (2.3%) φέρει και τα δυο *stx1* και *stx2*. Γονίδια *eae* απομονώθηκαν από 28 (55%) των STEC στελεχών. Επιπλέον, 3 (7%) στελέχη φέρουν τα *stx1*, *stx2* και *eae* γονίδια, και 4 (9.3%) φέρουν τα *stx2* και *eae* γονίδια.

Η PCR στα *E. coli* O157:H7 στελέχη έδειξε ότι δυο στελέχη ήταν θετικά για *stx1*, *stx2* και *eae* γονίδια, και έξι στελέχη ήταν θετικά για *stx1* και *stx2* και αρνητικά για *eae* γονίδια. Τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνονται λεπτομερώς στον πίνακα 5.

**Πίνακας 5.** Κατανομή των λοιμογόνων γονιδίων μεταξύ των STEC.

Λοιμογόνα γονίδια	Κόπρανα προβάτων		Κόπρανα αιγών		Κόπρανα βοοειδών		Σύνολο		Σύνολο STEC (%)
	O157:H7	non-O157	O157:H7	non-O157	O157:H7	non-O157	O157:H7	Non-O157	
<i>stx1</i>	0	2	0	3	0	0	0	5	5 (9.8%)
<i>stx2</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	1 (2%)
<i>stx1</i> and <i>stx2</i>	5	1	1	0	0	0	6	1	7 (13.7%)
<i>eae</i>	0	20	0	6	0	2	0	28	28 (55%)
<i>stx1</i> , <i>stx2</i> and <i>eae</i>	2	2	0	1	0	0	2	3	5 (9.8)
<i>stx1</i> and <i>eae</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	1 (2%)
<i>stx2</i> and <i>eae</i>	0	3	0	1	0	0	0	4	4 (7.8%)
Total	7	30	1	11	0	2	8	43	51

### 3.2.3 Δείγματα από προϊόντα φυτικής προέλευσης

Συνολικά 60 δείγματα λαχανικών όπως η ρόκα, το μαρούλι, ο μαϊντανός, τα παντζάρια, το σπανάκι, το φρέσκο κρεμμυδάκι, ο άνηθος, το σέλινο, τα καρότα, τα πράσα και το σκόρδο συλλέχθηκαν από την περιοχή της κεντρικής Ελλάδας, το χρονικό διάστημα από 1 Μαρτίου έως και 30 Ιουνίου του 2010, για την ανίχνευση και απομόνωση της *E. coli* O157:H7.

Σε τρία από τα δείγματα απομονώθηκαν στελέχη *E. coli* τα οποία δεν μπορούσαν να ζυμώσουν τη σορβιτόλη σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό SMAC και ήταν θετικά για τα *rfbE*<sub>O157</sub> και *fliC*<sub>h7</sub> γονίδια, θετικά για O157 με το τεστ συγκολλητινοαντίδρασης, αλλά αρνητικά για την παραγωγή τοξίνης μέσω της ELISA και αρνητικά για τοξινογόνα γονίδια μέσω της PCR. Και τα τρία δείγματα προέρχονταν από βιολογική καλλιέργεια στην οποία πιθανολογείται ότι χρησιμοποιούνταν ως λίπασμα κοπριά. Τα θετικά δείγματα προέρχονταν από φυλλώδη λαχανικά και συγκεκριμένα δύο δείγματα από ρόκα και ένα δείγμα από σπανάκι.

### 3.2.4 Δείγματα από προϊόντα ζωικής προέλευσης (κρεατοσκευάσματα και γάλα)

Συνολικά εξετάστηκαν 30 δείγματα κρεατοσκευασμάτων. Συγκεκριμένα, 20 δείγματα ήταν βόειας προέλευσης και εννέα χοιρινής προέλευσης, ενώ μόνο ένα δείγμα προέρχονταν από κοτόπουλο. Επίσης, εξετάστηκαν 25 δείγματα μη παστεριωμένου αγελαδινού γάλακτος και πέντε δείγματα μη παστεριωμένου πρόβειου γάλακτος, το οποίο χρησιμοποιείται για τυροποίηση. Η δειγματοληψία τόσο για τα κρεατοσκευάσματα όσο και για το γάλα πραγματοποιήθηκε σε περιοχή της κεντρικής Ελλάδας, το χρονικό διάστημα από το Μάρτιο έως το Μάιο του 2008.

Σε κανένα από τα δείγματα των κρεατοσκευασμάτων δεν απομονώθηκε *E. coli* O157:H7. Αναλυτικότερα, σε δυο μόνο δείγματα κρεατοσκευασμάτων χοιρινής προέλευσης, απομονώθηκαν στελέχη *E. coli* τα οποία δεν μπορούσαν να ζυμώσουν τη σορβιτόλη σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό SMAC. Και τα δυο στελέχη ήταν αρνητικά για την παραγωγή τοξινών με την ELISA και αρνητικά για τοξινογόνα γονίδια μέσω της PCR.

Σε ότι αφορά στο γάλα και σε αυτή την περίπτωση δεν απομονώθηκε *E. coli* O157:H7 σε κανένα από τα δείγματα νωπού γάλακτος. Συγκεκριμένα, απομονώθηκε ένα στέλεχος *E. coli* σε αγελαδινό γάλα, το οποίο έδινε άχρωμη αποικία σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό SMAC. Το στέλεχος αυτό ήταν αρνητικό για την παραγωγή τοξινών με την ELISA και αρνητικό για τοξινογόνα γονίδια μέσω της PCR.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη αυτή συγκεντρώθηκαν δείγματα κοπράνων από 667 ασθενείς οι οποίοι παρουσιάστηκαν στο νοσοκομείο με οξεία διάρροια και άλλα συμπτώματα από το γαστρεντερικό και εξετάστηκαν για την παρουσία των STEC με ELISA και PCR, καθώς και της *E. coli* O157:H7 με συγκολλητινοαντίδραση και PCR. Η παραγωγή Stx ανιχνεύθηκε σε 3 (0.5%) δείγματα από το σύνολο των ανθρώπινων κοπράνων που εξετάστηκαν, αλλά η *E. coli* O157:H7 δεν ανιχνεύθηκε με συγκολλητινοαντίδραση και κανένα από αυτά τα στελέχη δεν εξέφραζε τα *rfbE*<sub>O157</sub>, *fliC*<sub>h7</sub>, *stx1*, *stx2* και *eae* γονίδια.

Η μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση των STEC τα τελευταία 8 χρόνια ήταν 0.06 ανά εκατομμύριο κατοίκους στην Ελλάδα (έξι περιπτώσεις συνολικά) σύμφωνα με στοιχεία από το Κέντρο Ελέγχου Ειδικών Λοιμώξεων στη Ελλάδα. Τα στοιχεία αυτά καταδεικνύουν ότι τα STEC αποτελούν μια σπάνια αιτία νόσησης στη χώρα μας. Υπάρχουν μόνο δυο μελέτες, στις οποίες αναφέρεται απομόνωση της *E. coli* O157:H7 στην Ελλάδα [279, 280]. Στην πρώτη μελέτη, ένα O157:H7 στέλεχος απομονώθηκε από τα κόπρανα ενός παιδιού 10 μηνών από τα 643 δείγματα που εξετάστηκαν συνολικά από ασθενείς με οξεία διάρροια στο Νοσοκομείο Λοιμωδών στη Θεσσαλονίκη [280]. Στη δεύτερη μελέτη, εξετάστηκαν συνολικά 1207 δείγματα κοπράνων από ασθενείς με διάρροια και μόνο ένα O157:H7 στέλεχος (0.46%) από ενήλικα ασθενή ταυτοποιήθηκε. Το στέλεχος αυτό δεν εξέφραζε τα *eae*, *stx1*, ή *stx2* γονίδια [279].

Ο ετήσιος δείκτης νοσηρότητας από STEC ανά εκατό χιλιάδες κατοίκους για το έτος 2009 στις υπόλοιπες χώρες της Ευρώπης ήταν 2.19% για το Ηνωμένο Βασίλειο, 5.33% για την Ιρλανδία, μικρότερο του 0.1% για την Ισπανία, 0.08% για την Ιταλία, 1.07% για τη Γερμανία, 1.9% για την Ολλανδία, 2.25% για τη Νορβηγία [312]. Η μέση ετήσια επίπτωση από το 1998-2007 ήταν 4.3% στη Σκωτία, από 0 έως 5.3% κυμαίνεται στις διάφορες πολιτείες των ΗΠΑ για το έτος 2009, 2.9% στον Καναδά για το έτος 2007 και η μέση ετήσια επίπτωση για τα έτη 2000-2010 ήταν 0.4% στην Αυστραλία [106].

Παρόμοια με τη δική μας μελέτη, τα non-O157 STEC έχουν απομονωθεί σε μεγαλύτερο ποσοστό στους ανθρώπους από ό,τι τα O157 STEC σε αρκετές μελέτες. Στη Γερμανία 7% έναντι 3% [282] και 1% έναντι 0.4% [283] για τα non-O157 STEC και τα O157 STEC, αντίστοιχα. Μελέτες σε ανθρώπινα δείγματα κοπράνων και από άλλες ευρωπαϊκές χώρες αναφέρουν παρόμοια αποτελέσματα: ο επιπολασμός των non-O157 έναντι των O157 STEC ήταν 3% έναντι 0% στη Γαλλία [6], 1% έναντι 0% στην Ελβετία [284] και 0.7% έναντι 0.2% στο Βέλγιο [285].

Σε ότι αφορά στα δείγματα κοπράνων που προέρχονται από τα ζώα, στην παρούσα μελέτη απομονώθηκαν STEC O157:H7 σε ποσοστό 0.8% του συνόλου των δειγμάτων από την κεντρική Ελλάδα για την περίοδο από το Μάρτιο έως και τον Οκτώβριο του 2008, ενώ τα non-O157 στελέχη απομονώθηκαν σε ποσοστό 4.2% των δειγμάτων. Ειδικότερα, ο επιπολασμός των O157 στελεχών ήταν 1.9% στα πρόβατα και 0.6% στις κατσίκες, ενώ ο επιπολασμός των non-O157 ήταν 8.3% στα πρόβατα, 6.2% στις αίγες και 1.4% στα βοοειδή. Η απομόνωση της *E. coli* O157:H7 στα μικρά μηρυκαστικά στη μελέτη μας, όπως και σε άλλες μελέτες, αποκαλύπτει ότι τα μηρυκαστικά μπορούν να αποτελέσουν πηγή μετάδοσης της *E. coli* O157 στους ανθρώπους [286].

Οι πληροφορίες που διαθέτουμε σχετικά με τον επιπολασμό της *E. coli* O157:H7 στην Ελλάδα δεν είναι αρκετές. Είναι η πρώτη φορά που απομονώνεται η *E. coli* O157:H7 σε πρόβατο στην Ελλάδα και η δεύτερη φορά που απομονώνεται σε κατσίκες. Η πρώτη μελέτη στην οποία απομονώθηκε *E. coli* O157 από αίγες πραγματοποιήθηκε στην περιοχή της Ηπείρου, όπου ένα στέλεχος O157:H7 απομονώθηκε από τα 351 δείγματα κοπράνων που εξετάστηκαν από ένα κοπάδι υγείων ζώων [170].

Σε ό,τι αφορά στα δείγματα κοπράνων από χοίρους και κότες που εξετάστηκαν στη μελέτη μας, η *E. coli* O157 ή άλλα STEC δεν απομονώθηκαν, αποτέλεσμα που συμφωνεί με άλλες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν [287,288], αλλά έρχεται σε αντίθεση με κάποιες άλλες στις οποίες απομονώθηκε STEC O157 από σφάγια χοίρων [45, 169]. Επιπλέον, πρόσφατα δημοσιεύτηκε μια

μελέτη στην οποία 26 από τα 720 συνολικά δείγματα κοπράνων που συλλέχθηκαν με βαμβακοφόρο στυλέο από όρνιθες ήταν θετικά για *E. coli* O157:H7 [289].

Παρότι τα βοοειδή θεωρούνται η κύρια πηγή του O157:H7 στον αναπτυγμένο κόσμο, στη μελέτη μας δεν απομονώθηκε *E. coli* O157:H7 από βοοειδή. Το αποτέλεσμα αυτό της μελέτης διαφέρει από εκείνα άλλων ευρωπαϊκών χωρών στις οποίες ο επιπολασμός της *E. coli* O157:H7 ήταν 6.7% στη Βόρεια Ισπανία [1], 7.9% στη Σκωτία [290], 10.7 % στην Ιταλία [291], 12.9% στην Αγγλία [306], 0.5% στην Ολλανδία [168], 8.9% στη Σουηδία [294], 2.4% στην Ιρλανδία [292], 10.2% στις ΗΠΑ [293], 12.4% στον Καναδά [318], 10% στην Αυστραλία [139], 0.5% στην Ολλανδία [168], και 0.19% στη Νορβηγία [169]. Η *E. coli* O157:H7 δεν απομονώθηκε στα κόπρανα βοοειδών σε μελέτες στη Γερμανία [319].

Ο επιπολασμός των θετικών για non-O157 STEC βοοειδών στη μελέτη μας υπολογίστηκε στο 1.4%. Πρέπει να σημειώσουμε ότι μέχρι σήμερα ο αριθμός των εργασιών που αφορούν τα non-O157 STEC είναι γενικά περιορισμένος, μιας και τα περισσότερα προγράμματα επιδημιολογικής επιτήρησης περιλαμβάνουν μόνο τον έλεγχο για την *E. coli* O157. Παρόλα αυτά, ο επιπολασμός των βοοειδών για non-O157 STEC είναι συνήθως υψηλότερος από τον επιπολασμό της *E. coli* O157. Το ποσοστό των κοπαδιών που είναι θετικά για τα non-O157 STEC είναι 49.5% στη Γερμανία [295], 95% στην Ισπανία [296] και κυμαίνεται από 3.8% έως 84.6% στη Βραζιλία [297].

Υπάρχει περιορισμένος αριθμός μελετών που να αφορούν στην απομόνωση των STEC σε άλλα ζώα εκτός από τα βοοειδή. Εξετάστηκαν συνολικά 1300 πρόβατα για STEC από 93 διαφορετικά κοπάδια προβάτων στην Ισπανία κατά τη διάρκεια του 1997, με το 68% αυτών να είναι θετικές για STEC ενώ η *E. coli* O157:H7 απομονώθηκε μόνο σε 5 (0.4%) πρόβατα [296]. Σε άλλη μελέτη στην Ισπανία, η *E. coli* O157:H7 απομονώθηκε στο 7.3% από τα κόπρανα προβάτων που εξετάστηκαν [1]. Στο Ηνωμένο Βασίλειο, σε μια έρευνα σε 7200 κόπρανα προβάτων η *E. coli* O157:H7 απομονώθηκε σε ποσοστό 7.4% [306]. Στη Σκωτία, το 40% των κοπαδιών που εξετάστηκαν ήταν θετικά όπως επίσης και το 6.5% των δειγμάτων κοπράνων που προέρχονταν από



τα προβάτα [298]. Στην Ολλανδία, η *E. coli* O157:H7 απομονώθηκε στο 4% των προβάτων που εξετάστηκαν [168], στην Ιρλανδία απομονώθηκε σε ποσοστό 5.8% [325]. Στη Νορβηγία, όμως, δεν απομονώθηκε *E. coli* O157:H7 στα 665 πρόβατα που εξετάστηκαν [169], ενώ στην Ιταλία απομονώθηκε σε ποσοστό 0.2% [313]. Οι αίγες πρωτοαναγνωρίστηκαν ως φορείς της *E. coli* O157:H7 το 1994, οπότε και θεωρήθηκαν υπεύθυνες για μια επιδημία της *E. coli* O157:H7 σε ανθρώπους στο Ηνωμένο Βασίλειο [299], και την επόμενη ακριβώς χρονιά, το 1995, για μια άλλη επιδημία σε ανθρώπους στην Τσεχία [300].

Στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκε αρχικά η μέθοδος της ELISA για τον καθορισμό των αποικιών που παράγουν Shiga τοξίνη και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε PCR για την ταυτοποίηση αυτών. Συγκεκριμένα, 80 δείγματα βρέθηκαν να είναι θετικά στην παραγωγή Shiga τοξίνης μέσω της ELISA, ενώ 51 (64%) από αυτά ήταν θετικά και με την PCR. Σε προηγούμενες μελέτες, η ειδική στην ανίχνευση Shiga τοξίνης ELISA φάνηκε να παρουσιάζει μικρότερη ευαισθησία, καθώς επίσης και να δημιουργεί ψευδώς θετικά αποτελέσματα [301].

Η χρήση της PCR στην ανίχνευση των τοξινογόνων γονιδίων στα non-O157 STEC απέδειξε ότι τα παθογόνα γονίδια διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων στελεχών, με το γονιδιακό προφίλ *stx1-stx2* να σχετίζεται με τα *E. coli* O157 στελέχη και το *eae* να ανιχνεύεται σε δυο στελέχη που έφεραν επίσης και τα *stx1* και *stx2* γονίδια. Στα non-O157 STEC στελέχη που απομονώθηκαν το ποσοστό του *eae* ήταν φανερά υψηλό (55%), γεγονός το οποίο μπορεί να σημαίνει ότι ένα σημαντικό ποσοστό των non-O157 STEC μπορεί να αποτελέσει έναν δυνητικό παράγοντα μόλυνσης για τους ανθρώπους. Η κατανομή αυτή διαφέρει από προηγούμενες μελέτες που περιγράφηκαν στη Βόρεια Ισπανία, όπου το *eae* απομονώθηκε στο 95.9% των *E. coli* O157:H7 στελεχών και μόνο στο 5.3% των non-O157 [1].

Όμως εκτός από τα ζώα, η *E. coli* O157:H7 απομονώθηκε σε φρούτα και λαχανικά. Η αναγνώριση των ωμών φρούτων και λαχανικών ως εν δυνάμει αιτίες τροφιμογενών νοσημάτων έχει αυξηθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες [302-304], και μάλιστα η *E. coli* O157:H7 αποτελεί

έναν από τους πιο κοινούς αιτιολογικούς παράγοντες σε επιδημίες που σχετίζονται με τρόφιμα [305]. Στη μελέτη μας, η *E. coli* O157:H7 απομονώθηκε σε δυο δείγματα ρόκας και σε ένα δείγμα από σπανάκι. Και τα δυο είδη λαχανικών, ήταν προϊόντα βιολογικής καλλιέργειας, από παραγωγό ο οποίος πιθανολογείται ότι χρησιμοποιούσε μη κομποστοποιημένη κοπριά από διαφορετικά είδη ζώων όπως αίγες, πρόβατα και βοοειδή, ως λίπασμα (αν και συγκεκριμένες πληροφορίες δεν ήταν διαθέσιμες). Η ανάλυση των δειγμάτων με PCR έδειξε ότι και τα τρία δείγματα που απομονώθηκαν παρουσίαζαν τον ίδιο ορότυπο O157:H7 άλλα δεν εξέφραζαν τα *stx1*, *stx2*, ή τα *eae* γονίδια. Παρότι η πηγή μετάδοσης του μικροοργανισμού στη ρόκα και στο σπανάκι είναι άγνωστη, η σύνθεση της κοπριάς που πιθανόν χρησιμοποίησε ο παραγωγός μπορεί να θεωρηθεί ως ο πιο πιθανός τρόπος μετάδοσης της *E. coli* O157:H7.

Η επιμόλυνση των λαχανικών με *E. coli* O157:H7 μπορεί να συμβεί όταν βοοειδή αλλά και άλλα ζώα όπως αίγες, πρόβατα, όρνιθες και χοίροι βοσκούν ελεύθερα σε μη περιφραγμένα χωράφια ή όταν ακατάλληλα κομποστοποιημένη κοπριά από τα ζώα αυτά έχει χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα από τους παραγωγούς [10]. Η αντοχή της *E. coli* O157:H7 στα κόπρανα και στην κοπριά αποδεικνύει ότι τα στοιχεία αυτά μπορούν να αποτελέσουν οχήματα μεταφοράς του μικροοργανισμού. Τα πρόβατα και οι αίγες είναι η πιο σημαντική πηγή της *E. coli* O157:H7 στην κεντρική Ελλάδα και η χρήση ακατάλληλης κοπριάς στο χώμα όπου καλλιεργούνται τα λαχανικά μπορεί να εξηγήσει την παρουσία του μικροοργανισμού σε αυτά. Λόγω του περιορισμένου αριθμού των δειγμάτων στη μελέτη μας, το θετικό αποτέλεσμα της παρουσίας της *E. coli* O157:H7 δεν μπορεί να θεωρηθεί αντιπροσωπευτικό για την παρουσία του μικροοργανισμού στα λαχανικά στην Ελλάδα, παρόλα αυτά η ανίχνευσή του δεν μπορεί να αγνοηθεί.

Στη μελέτη μας, δεν απομονώθηκε *E. coli* O157:H7 σε κανένα από τα δείγματα γάλακτος που εξετάστηκαν. Όμως, σε παρόμοια μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, και στην οποία εξετάστηκαν συνολικά 2500 δείγματα γάλακτος αγελαδινής, πρόβειας και γίδινης προέλευσης η *E. coli* O157:H7 απομονώθηκε σε ποσοστό 2.2% στο αγελαδινό

γάλα, 0.8% στο πρόβειο γάλα και 0.7% στο γίδινο γάλα [217]. Η *E. coli* O157:H7 απομονώθηκε σε αγελαδινό γάλα σε ποσοστό 5.7% στο Ηνωμένο Βασίλειο [329], 0.3% στην Ιρλανδία [319], σε ποσοστό 2% στο Tennessee στις ΗΠΑ [320] και 4.3% στο Wisconsin [144], 16.2% στον Καναδά [330], 0.7% σε μίγμα αγελαδινού και γίδινου γάλακτος στην Ιταλία [321], ενώ δεν απομονώθηκε σε έρευνες στην Ολλανδία [322] και στη Σκωτία [323]. Τέλος, απομονώθηκε σε ποσοστό 3.6% σε πρόβειο γάλα στην Ισπανία [324].

Η *E. coli* O157:H7 δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα κρεατοσκευάσματα που εξετάστηκαν στη μελέτη μας. Σε μια άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2010 στην Ελλάδα και στην οποία εξετάστηκαν 1200 σφάγια η *E. coli* O157:H7 απομονώθηκε σε ποσοστό 1.3% από βοδινό κρέας, 0.8% από γίδινο κρέας και 1.3% από πρόβειο κρέας, ενώ δεν απομονώθηκε σε κανένα από τα δείγματα χοιρινού κρέατος [237]. Ο επιπολασμός του βακτηρίου σε έρευνες άλλων χωρών σε σφάγια βόειας προέλευσης ήταν στο Ηνωμένο Βασίλειο 1.4% [306] και 1.2% σε άλλη έρευνα στις ΗΠΑ [146], 3.9% στην Ιρλανδία [325], 14.7% στην Ισπανία [326], 11% στην Ιταλία [141], 0.1% στην Αυστραλία [327] και 0% στην Ολλανδία [328]. Στα σφάγια χοιρινής προέλευσης ο επιπολασμός του παθογόνου ήταν 0% στη Γαλλία [307, 308], 0.2% στην Ιρλανδία [309] και 0.7% στην Ιταλία [310], ενώ παρόμοια χαμηλά ποσοστά παρατηρήθηκαν και στα σφάγια πρόβειας προέλευσης, όπου ο επιπολασμός της *E. coli* O157:H7 ήταν 0.7% στην Αυστραλία [311], 2.9% στην Ιρλανδία [325], 0.7% στο Ηνωμένο Βασίλειο [306] και 0.3% στην Ιταλία [313].

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, η *E. coli* O157:H7 απομονώθηκε σε κόπρανα από πρόβατα και από αίγες και σε φυλλώδη λαχανικά (ρόκα και σπανάκι), αλλά δεν απομονώθηκε σε ανθρώπινα κόπρανα. Σε προηγούμενες μελέτες που έγιναν στην Ελλάδα, με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων σφάγιων και γάλακτος η *E. coli* O157 απομονώθηκε τόσο στα σφάγια όσο και στο μη παστεριωμένο γάλα, όπως αναφέρεται παραπάνω. Στον πίνακα 6 παρουσιάζεται η επίπτωση των STEC λοιμώξεων στους ανθρώπους, καθώς και ο επιπολασμός της *E. coli* O157:H7 σε κόπρανα, σφάγια και γάλα από βοοειδή και πρόβατα στην Ελλάδα και σε άλλες χώρες. Η Ελλάδα συγκριτικά

με τις υπόλοιπες χώρες παρουσιάζει τη χαμηλότερη επίπτωση των λοιμώξεων από STEC στους ανθρώπους. Ο μικροοργανισμός δεν απομονώθηκε σε κόπρανα των βοοειδών (0%) παρόμοια με έρευνες στη Γερμανία και τη Νορβηγία αλλά απομονώθηκε σε κόπρανα προβάτων (1.9%). Το ποσοστό στα κόπρανα των προβάτων είναι το χαμηλότερο αμέσως μετά τη Νορβηγία (0%) και την Ιταλία (0.2%). Στα σφάγια η *E. coli* O157:H7 απομονώθηκε σε ποσοστό 1.3% στην Ελλάδα ποσοστό χαμηλό παρόμοιο με τις υπόλοιπες χώρες με εξαίρεση τον επιπολασμό στα σφάγια βοοειδών στην Ιταλία και στην Ισπανία όπου απομονώθηκε σε ποσοστό 11 και 14.7% αντίστοιχα. Το παθογόνο απομονώθηκε από το ελληνικό γάλα σε ποσοστό 2.2% στο αγελαδινό και 0.8% στο πρόβειο γάλα, χαμηλό ποσοστό παρόμοιο με των υπόλοιπων χωρών με εξαίρεση τον Καναδά στον οποίο η *E. coli* O157:H7 απομονώθηκε σε ποσοστό 16.2% στο αγελαδινό γάλα.

Παρότι οι μέχρι τώρα έρευνες υπογραμμίζουν την παρουσία της *E. coli* O157 στην Ελλάδα, η *E. coli* O157:H7 δεν εμπλέκεται έως σήμερα σε επιδημίες στη χώρα μας και οι περιπτώσεις οι οποίες παρουσιάστηκαν ήταν σποραδικές. Η χαμηλή επίπτωση της *E. coli* O157:H7 στους ανθρώπους οφείλεται σε δυο κυρίως λόγους: στην υποδιάγνωση και στην υποδήλωση του παθογόνου. Οι εξετάσεις για την απομόνωση της *E. coli* O157:H7 δεν αποτελούν μέρος της ρουτίνας των περισσότερων εργαστηρίων, με αποτέλεσμα η λοίμωξη να υποδιαγιγνώσκεται, γεγονός που οδηγεί τελικά και στην υποδήλωση του παθογόνου. Πέρα όμως από αυτό, πιστεύουμε ότι η επίπτωση της *E. coli* O157:H7 στην Ελλάδα είναι πραγματικά μικρότερη συγκριτικά με τις υπόλοιπες χώρες, όχι όμως και μηδενική όπως εμφανίζεται στον πίνακα 6. Η χαμηλή επίπτωση εξηγείται λαμβάνοντας υπόψη το χαμηλό επιπολασμό (0%) του παθογόνου στα βοοειδή, που αποτελούν έως σήμερα την κύρια δεξαμενή του μικροοργανισμού αλλά και τις διατροφικές συνήθειες του ελληνικού πληθυσμού, ο οποίος αν και παραδοσιακά καταναλώνει πρόβειο και γίδινο κρέας προτιμά τα κρέατά του καλά ψημένα [318]. Ένας ακόμη λόγος που μπορεί να εξηγήσει το χαμηλό επιπολασμό του παθογόνου σχετίζεται με τη συνήθεια των Ελλήνων να καταναλώνουν τυρί

φέτα και γιαούρτι, τα οποία είναι γαλακτοκομικά προϊόντα οξυγαλακτικής ζύμωσης, στο χαμηλό pH των οποίων δεν επιβιώνει εύκολα το παθογόνο [335].

Μια ακόμη πιθανή εξήγηση της χαμηλής επίπτωσης είναι ότι οι άνθρωποι μπορεί να έχουν αποκτήσει ανοσία κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας από προηγούμενη έκθεσή τους σε *eae* θετική *E. coli* λοίμωξη [6]. Η προσκόλληση στο εντερικό κύτταρο και η εξάλειψη των μικρολαχνών των εντερικών λαχνών μπορεί να μην είναι τα μόνα σημαντικά στοιχεία στην εξέλιξη των STEC λοιμώξεων στους ανθρώπους και επιπρόσθετοι παράγοντες, όπως η εντεροαιμολυσίνη, *hly*, μπορεί να εμπλέκονται. Έτσι, παρότι ορισμένοι ασθενείς είναι θετικοί για το *eae* αποικίζονται από το παθογόνο χωρίς όμως να παρουσιάζουν κλινικά συμπτώματα, ενώ άλλοι *eae* αρνητικοί να εκδηλώνουν HUS. Έως τώρα, υπάρχουν αρκετές αντικρουόμενες μελέτες σχετικά με το ρόλο του γονιδίου *eae* στην παθογένεια των ανθρώπινων λοιμώξεων [13, 316, 102]. Ακόμη, είναι πιθανή η απόκτηση αντισωμάτων έναντι της Stx2 κατά την παιδική ηλικία. Σε μελέτες οικογενειών όπου κάποιο παιδί είχε εκδηλώσει αιμορραγική κολίτιδα ή HUS βρέθηκε ότι οι φροντιστές τους είχαν αναπτύξει αντισώματα [314]. Οποσδήποτε, θα πρέπει να διεξαχθούν περισσότερες μελέτες έτσι ώστε να ξεκαθαριστεί ο ακριβής τρόπος ανάπτυξης των λοιμώξεων στον άνθρωπο.

Συμπερασματικά, θα λέγαμε ότι φαίνεται ξεκάθαρα η ανάγκη εφαρμογής μακροχρόνιων προγραμμάτων επιδημιολογικής επιτήρησης στα οποία να καταγράφεται ο επιπολασμός των παθογόνων που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα και ειδικότερα της *E. coli* O157:H7 και των non-O157 STEC. Η μελέτη αυτή παρουσιάζει την κατανομή της *E. coli* O157:H7 και των non-O157 στα μηρυκαστικά τα οποία αποτελούν μια σημαντική πηγή αυτών των παθογόνων και την παρουσία της *E. coli* O157:H7 στα φυλλώδη λαχανικά. Η χαμηλή επίπτωση στους ανθρώπους, έως τώρα, δείχνει τη χαμηλή διασπορά των παθογόνων STEC μέσω της τροφικής αλυσίδας. Κατάλληλες πρακτικές χειρισμού και στρατηγικές ελέγχου σε επίπεδο παραγωγής έτσι ώστε να αποφευχθεί πιθανή διασπορά του μικροοργανισμού, αλλά και συνεχή προγράμματα καταγραφής της

αποτελεσματικότητας αυτών, αποτελούν απαραίτητες πρακτικές για να μειωθεί η έκθεση του ανθρώπου στο λοιμογόνο παράγοντα.

**Πίνακας 6.** Επίπτωση των STEC λοιμώξεων στους ανθρώπους και επιπολασμός της *E. coli* O157:H7 σε κόπρωνα, σφάγια και γάλα βοοειδών και προβάτων σε διάφορες χώρες.

Χώρα	Επίπτωση των STEC στους ανθρώπους %/100.000	E.coli O157:H7 σε κόπρωνα ζώων		E.coli O157:H7 σε σφάγια ζώων		E.coli O157:H7 στο γάλα		References
		Βοοειδή	Πρόβατα	Βοοειδή	Πρόβατα	Βοοειδή	Πρόβατα	
Ηνωμένο Βασίλειο	2.19 %	12.9%	7.4%	1.4%	0.7%	5.7%	ΔΑ	[312], [306], [329]
Σκωτία	4.3%	7.9%	6.5%	ΔΑ	ΔΑ	0%	ΔΑ	[106], [290], [298], [323]
Ιρλανδία	5.33%	2.4%	5.8%	3.9%	2.9%	0.3%	ΔΑ	[312], [292], [325], [319]
<b>Ελλάδα</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>	<b>1.9%</b>	<b>1.3%</b>	<b>1.3%</b>	<b>2.2%</b>	<b>0.8%</b>	[312], [237], [217]
Ισπανία	<0.1%	6.7%	7.3%	14.7%	ΔΑ	ΔΑ	3.6%	[312], [1], [326], [324]
Ιταλία	0.08%	10.7%	0.2%	11.0%	0.3%	0.7%	ΔΑ	[312], [291], [313], [141], [237],[321]
Γερμανία	1.07%	0%	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	[312], [319]
Ολλανδία	1.9%	0.5%	4%	0%	ΔΑ	0%	ΔΑ	[312], [168], [328], [322]
Νορβηγία	2.25%	0.19%	0%	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	[312], [169], [106], [293],[146],
ΗΠΑ	0-5.3%	10.2%	ΔΑ	1.2%	ΔΑ	2-4,3%	ΔΑ	[320], [144]
Καναδάς	2.9%	12.4%	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	16,2%	ΔΑ	[106], [318], [330]
Αυστραλία	0.4%	10%	ΔΑ	0.1%	0.7%	ΔΑ	ΔΑ	[106], [139], [327], [311]

ΔΑ: δεν αναφέρεται

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ**

1. Oporto B, Esteban JI, Aduriz G, Juste RA, Hurtado A (2008) *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* in healthy cattle, sheep and swine herds in Northern Spain. *Zoonoses Public Health* 55:73–81
2. Johnson KE, Thorpe CM, Sears CL (2006) The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin –producing *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* 43:1587-1595.
3. World Health Organization (WHO).1998. Zoonotic non-O157 Shiga Toxin – producing *Escherichia coli* (STEC). W.H.O./CSR/APH/98.8, 1-33. World Health Organization Scientific Working Group, Berlin, Germany.  
[http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO\\_CSR\\_APH\\_98.8.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_CSR_APH_98.8.pdf)
4. Calderwood SB, Acheson DWK, Keusch GT, Barrett TJ, Griffin PM, Strockbine NA, Swaminathan B, Kaper JB, Levine MM, Kaplan BS, Karch H, O'Brien AD, Obrig TG, Takeda Y, Tarr PI, Wachsmuth IK (1996) Proposed new nomenclature for Shiga-like toxin (verotoxin) family. *ASM News* 62:118–119. [http:// newsarchive.asm.org/#3](http://newsarchive.asm.org/#3)
5. Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H (1985) The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 151:775–782
6. Pradel N, Livrelli V, De Champs C, Palcoux JB, Reynaud A, Scheutz F, Sirot J, Joly B, Forestier C (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
7. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, González EA, Bernárdez MI, Blanco J (2004) Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-xi). *J Clin Microbiol* 42(2):645– 651
8. Hancock D, Besser T, LeJeune J, Davis M, Rice D (2001) The control of VTEC in the animal reservoir. *Int J Food Microbiol* 66:71–78
9. Synge BA (2000) Veterinary significance of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157. *World J Microbiol Biotechnol* 16:725–732
10. World Health Organization (WHO) (1998) Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. WHO/FSF/FOS/98.2. Available online at:  
[http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/surface\\_decon.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/surface_decon.pdf)
11. Zepeda-Lopez H, Ortega-Rodriguez M, Quinonez-Ramirez EI, Vazquez-Salinas C (1995) Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from vegetables. *Annu Mtg Am Soc Microbiol* (abstracts), Washington, DC
12. Ministry of Health and Welfare of Japan, National Institute of Infectious Diseases and Infectious Disease Control Division (1997) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (enterohemorrhagic *E. coli*) infections, Japan, 1996–June 1997. *Infect Agents Surveill Rep* 18:153–154. <http://idsc.nih.go.jp/iasr/18/209/tpc209.html>
13. Chapman PA, Siddons CA, Gerdan Malo AT, Harkin MA (1997) A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiol Infect* 119:245–250
14. Grant J, Wendelboe AM, Wendel A, Jepson B, Torres P, Smelser C, Rolfs RT (2008) Spinach-associated *Escherichia coli* O157:H7 outbreak, Utah and New Mexico, 2006. *Emerg Infect Dis* 14:1633–1636



15. Besser RE, Lett SM, Weber JT, Doyle MP, Barrett TJ, Wells JG, Griffin PM (1993) An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA* 269(17):2217–2220
16. Pennington H (2010) Review E.coli O157. *Lancet* 376:1428-35
17. Konowalchuk J, Speir JI, Stavric S (1997) Vero response to a toxin of E.coli. *Infect Immun* 18:775-779
18. O'Brien AD, LaVeck GD, Thompson MR, Formal SB (1982) Production of Shigella dysenteriae type 1 like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 146:763-769
19. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML (1983) Haemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New Engl J Med.* 308: 681-685
20. Karmali MA, Petric M, Steele BT, Lim C (1983) Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 321:619-620
21. Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebenmann RE, Oechslin R (1955) Hamolytisch-uramische Syndrome: bilaterale niereniniden-nekrosen bei akuten erworbenen hamolytischen Anamien. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 85:905-909
22. Centers for Disease Control and Prevention (2009) Multistate outbreak of E. coli O157:H7 infections linked to eating raw refrigerated, prepackaged cookie dough. (<http://www.cdc.gov/ecoli/2009/0630.html>)
23. Snedeker KG, Shaw DJ, Locking ME, Prescott RJ (2009) Primary and secondary cases in *Escherichia coli* O157 outbreaks: a statistical analysis. *BMC Infect Dis* 9:144
24. Reida P, Wolff M, Pöhls HW, Kuhlmann W, Lehmacher A, Aleksić S, Karch H, Bockemühl J (1994) An outbreak due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination. *Zentralbl Bakteriologie* 281(4):534-43
25. Ludwig K, Ruder H, Bitzan M, Zimmermann S, Karch H (1997) Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in a large family. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16(3):238-41
26. Parry SM, Salmon RL (1998) Sporadic STEC O157 infection: secondary household transmission in Wales. *Emerg Infect Dis* 4(4): 657–661
27. Chapman PA, Siddons CA, Manning J, Cheetham C (1997) An outbreak of infection due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in four families: the influence of laboratory methods on the outcome of the investigation. *Epidemiol Infect* 119(2):113-9
28. Stephan R, Ragettli S, Untermann F (2000) Prevalence and characteristics of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in stool samples from asymptomatic human carriers working in the meat processing industry in Switzerland. *J Appl Microbiol* 88(2):335-41
29. The Walkerton Inquiry 2002
30. Cransberg K, van den Kerkhof JH, Bänffer JR, Stijnen C, Wernars K, van de Kar NC, Nauta J, Wolff ED (1996) Four cases of hemolytic uremic syndrome--source contaminated swimming water? *Clin Nephrol* 46(1):45-9
31. Ackman D, Marks S, Mack P, Caldwell M, Root T, Birkhead G (1997) Swimming-associated haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7 infection: evidence of prolonged contamination of a fresh water lake. *Epidemiol Infect* 119(1):1-8

32. Brewster DH, Brown MI, Robertson D, Houghton GL, Bimson J, Sharp JC (1994) An outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with a children's paddling pool. *Epidemiol Infect* 112(3): 441–447
33. Effler E, Isaacs M, Arntzen L, Heenan R, Canter P, Barrett T, Lee L, Mambo C, Levine W, Zaidi A, Griffin PM (2001) Factors contributing to the emergence of *Escherichia coli* O157 in Africa. *Emerg Infect Dis* 7(5):812-9
34. O'Connor DR (2002) Report of the Walkerton inquiry, part 1. Ontario Ministry of the Attorney General, Ontario, ON, Canada
35. Djuretic T (1997) Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection at rock festival in the south west of England, June 1997. *Euro Surveill* (13):pii=1073
36. Health Protection Agency (2010) Review of the major outbreak of E. coli O157 in Surrey, 2009. Report of the Independent Investigation Committee June 2010.  
[http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb\\_C/1317135762632](http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317135762632)
37. Spina N, Zansky S, Dumas N, Kondracki S (2005) Four Laboratory-Associated Cases of Infection with *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Microbiol* 43: 2938–39
38. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1996) Micro-organisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. London: Blackie Academic and Professional
39. Benjamin MM, Datta AR (1995) Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 61(4):1669-72
40. Govaris A, Solomakos N, Rodi A, Papageorgiou D (2004) Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in raw cow's milk in Greece. 3rd Greek Symposium of Hygiene and Technology of Foods, Legislation, Safety and, Hygiene quality of Foods, Veterinary Medical Society of Greece. Volume 2, 49-51
41. Wang G, Zhao T, Doyle MP (1996) Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* 62(7): 2567–2570
42. Bolton DJ, Byrne CM, Sheridan JJ, McDowell DA, Blair IS (1999) The survival characteristics of a non-toxigenic strain of *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol* 86(3):407-11
43. Conedera G, Chapman PA, Marangon S, Tisato E, Dalvit P, Zuin A (2001) A field survey of *Escherichia coli* O157 ecology on a cattle farm in Italy. *Int J Food Microbiol* 66(1-2):85-93
44. Ezawa A, Gocho F, Saitoh M, Tamura T, Kawata K, Takahashi T, Kikuchi N (2004) A three-year study of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 on a farm in Japan. *J Vet Med Sci* 66(7):779-84
45. Heuvelink AE, Zwartkruis-Nahuis JT, van den Biggelaar FL, van Leeuwen WJ, de Boer E (1999) Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *Int J Food Microbiol* 52(1-2):67-75
46. Yilmaz A, Gun H, Yilmaz H (2002) Frequency of *Escherichia coli* O157:H7 in Turkish cattle. *J Food Prot* 65(10):1637-40
47. Rasmussen MA, Cray WC Jr, Casey TA, Whipp SC (1993) Rumen contents as a reservoir of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 114(1):79-84
48. Neill MA, Tarr PI, Taylor DN, Wolf M (2000) *Escherichia coli*. In: Hui YH, Pierson MD, Gorham JR (eds). *Foodborne Disease Handbook*, 2nd ed. vol.1. Bacterial Pathogens. Marcel Dekker. New York 196

49. Αντιγόνη Αρσένη (1994) Κλινική μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση των λοιμώξεων. Ζήτα
50. Beutin L, Zimmermann S, Gleier K (1998) Human infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany. *Emerg Infect Dis* 4(4):635-9
51. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K, Kaper JB (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
52. Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11(1):142–201
53. Thomas A, Cheasty T, Frost JA, Chart H, Smith HR, Rowe B (1996) Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*, particularly serogroup O157, associated with human infections in England and Wales: 1992-4. *Epidemiol Infect* 117(1):1-10
54. Slutsker L, Ries AA, Greene KD, Wells JG, Hutwagner L, Griffin PM (1997) *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiologic features. *Ann Intern Med* 126(7):505-13
55. National Institutes of Infectious Diseases and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health and Welfare Japan (1996) Verotoxin-producing *Escherichia coli*, January 1991- November 1995, Japan. *Infectious Agents Surveillance Report* 17, 1-2
56. Waddell T, Head S, Petric M, Cohen A, Lingwood C (1988) Globotriosyl ceramide is specifically recognized by the *Escherichia coli* verocytotoxin 2. *Biochem Biophys Res Commun* 152(2):674-9
57. Sandvig K, van Deurs B (1996) Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol Rev* 76(4):949-66
58. Karch H, Heesemann J, Laufs R, O'Brien AD, Tacket CO, Levine MM (1987) A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infect Immun* 55(2):455-61
59. Toth I, Cohen ML, Rumschlag HS, Riley LW, White EH, Carr JH, Bond WW, Wachsmuth IK (1990) Influence of the 60-megadalton plasmid on adherence of *Escherichia coli* O157:H7 and genetic derivatives. *Infect Immun* 58(5):1223-31
60. Law D, Kelly J (1995) Use of heme and hemoglobin by *Escherichia coli* O157 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* serogroups. *Infect Immun* 63(2):700-2
61. Griffin PM, Olmstead LC, Petras RE (1990) *Escherichia coli* O157:H7-associated colitis. A clinical and histological study of 11 cases. *Gastroenterology* 99(1):142-9
62. Hall GA, Dorn CR, Chanter N, Scotland SM, Smith HR, Rowe B (1990) Attaching and effacing lesions in vivo and adhesion to tissue culture cells of Vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* belonging to serogroups O5 and O103. *J Gen Microbiol* 136(4):779-86
63. Knutton S, Baldwin T, Williams PH, McNeish AS (1989) Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 57(4):1290-8
64. Acheson D, M.D. *Escherichia coli*, Part II, Clinical Perspective. New England Medical Center in Boston (Food Safety Initiative)
65. Hecht G (1995) Bugs and barriers: enteric pathogens exploit yet another epithelial function. *News Physiol Sci* 10:160–166

66. Ostroff SM, Tarr PI, Neill MA, Lewis JH, Hargrett-Bean N, Kobayashi JM (1989) Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *J Infect Dis* 160(6):994-8
67. Schmidt H, Karch H, Beutin L (1994) The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the E. coli alpha-hemolysin family. *FEMS Microbiol Lett* 117(2):189–196
68. Schmidt H, Kernbach C, Karch H (1996) Analysis of the EHEC hly operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:h7. *Microbiology* 142 ( Pt 4):907-14
69. Bauer ME, Welch RA (1996) Association of RTX toxins with erythrocytes. *Infect Immun* 64(11): 4665–4672
70. Welch RA (1991) Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* 5:521-528
71. Keane WF, Welch R, Gekker G, Peterson PK (1987) Mechanism of *Escherichia coli* alpha-hemolysin-induced injury to isolated renal tubular cells. *Am J Pathol* 126(2): 350–357
72. Bauer ME, Welch RA (1996) Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 64(1): 167–175
73. Schmidt H, Karch H (1996) Enterohemolytic phenotypes and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 34(10): 2364–2367
74. Schmidt H, Beutin L, Karch H (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *Infect Immun* 63:1055–1061
75. 2nd International Symposium of the European Study Group on Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Brussels, Belgium, April 16-17, 1999. Abstracts. *Acta Clin Belg* 54(1):33-52
76. Ebel F, Deibel C, Kresse AU, Guzmán CA, Chakraborty T (1996) Temperature- and medium-dependent secretion of proteins by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* 64(11):4472-9
77. Brunder W, Schmidt H, Karch H (1997) EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol Microbiol* 24(4):767-78
78. Djafari S, Ebel F, Deibel C, Krämer S, Hudel M, Chakraborty T (1997) Characterization of an exported protease from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 25(4):771-84
79. Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, Takeda Y, Ogasawara T, Igarashi K (1988) Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur J Biochem* 171(1-2):45-50
80. Bell BP, Goldoft M, Griffin PM, Davis MA, Gordon DC, Tarr PI, Bartleson CA, Lewis JH, Barrett TJ, Wells JG, et al. (1994) A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *JAMA* 272(17):1349-53
81. Savarino SJ, Fasano A, Robertson DC, Levine MM (1991) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. *J Clin Invest* 87(4):1450-5

82. Savarino SJ, McVeigh A, Watson J, Cravioto A, Molina J, Echeverria P, Bhan MK, Levine MM, Fasano A (1996) Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *J Infect Dis* 173(4):1019-22
83. Perna NT, Plunkett G 3rd, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, Pósfai G, Hackett J, Klink S, Boutin A, Shao Y, Miller L, Grotbeck EJ, Davis NW, Lim A, Dimalanta ET, Potamousis KD, Apodaca J, Anantharaman TS, Lin J, Yen G, Schwartz DC, Welch RA, Blattner FR (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409(6819):529-33
84. Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K, Yokoyama K, Han CG, Ohtsubo E, Nakayama K, Murata T, Tanaka M, Tobe T, Iida T, Takami H, Honda T, Sasakawa C, Ogasawara N, Yasunaga T, Kuhara S, Shiba T, Hattori M, Shinagawa H (2001) Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* 8(1):11-22
85. Le Saux N, Spika JS, Friesen B, Johnson I, Melnychuck D, Anderson C, Dion R, Rahman M, Tostowarky W (1993) Ground beef consumption in noncommercial settings is a risk factor for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection in Canada. *J Infect Dis* 167(2):500-2
86. Wall PG, McDonnell RJ, Adak GK, Cheasty T, Smith HR, Rowe B (1996) General outbreaks of vero cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 in England and Wales from 1992 to 1994. *Commun Dis Rep CDR Rev* 6(2):R26-33
87. Griffin PM (1995) *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL, eds. *Infections of the gastrointestinal tract*. New York: Raven Press, Ltd., 739-61
88. Cimolai N, Basalyga S, Mah DG, Morrison BJ, Carter JE (1994) A continuing assessment of risk factors for the development of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin Nephrol* 42(2):85-9
89. Carter AO, Borczyk AA, Carlson JA, Harvey B, Hockin JC, Karmali MA, Krishnan C, Korn DA, Lior H (1987) A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7--associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *N Engl J Med* 317(24):1496-500
90. Pavia AT, Nichols CR, Green DP, Tauxe RV, Mottice S, Greene KD, Wells JG, Siegler RL, Brewer ED, Hannon D, et al. (1990) Hemolytic-uremic syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in institutions for mentally retarded persons: clinical and epidemiologic observations. *J Pediatr* 116(4):544-51
91. Scheutz F, Strockbine NA (2005) Genus I. *Escherichia* Castellani and Chalmers 1919, 941 TAL. In: Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*. Springer, New York, p. 607-625
92. Neill MA (1997) Overview of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Food Prot* 60:1444-1446
93. Bürk C, Braumiller IG, Becker H, Märtlbauer E (2002) Nuclease fluorescence assay for the detection of verotoxin genes in raw milk. *Lett Appl Microbiol* 35(2):153-6
94. Pai CH, Ahmed N, Lior H, Johnson WM, Sims HV, Woods DE (1988) Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: a two-year prospective study. *J Infect Dis* 157(5):1054-7

95. Centers for Disease Control and Prevention (2007) Laboratory-Confirmed Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* --- Connecticut, 2000--2005. *Morb Mortal Wkly Rep* 56(02):29-31
96. Gould H (2009) Update on the Epidemiology of Shiga toxin-producing E. coli in the United States. Capital Area Food Protection Association Meeting. September 14, 2009.
97. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, Jones JL, and Griffin PM (2011) Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. *Emerg Infect Dis*
98. Centers for Disease Control and Prevention( 2010b) [Letter from Dr. Patricia Griffin, Chief of Enteric Diseases Epidemiology Branch, Division of Foodborne, Waterborne and Environmental Diseases, CDC to Dr. Daniel Engeljohn, Assistant Administrator, Office of Policy and Program Development, Food Safety and Inspection Service, USDA.] Dated September 27, 2010
99. Mag T, Nogrady N, Herpay M, Toth I, Rozgonyi F (2010) Characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Hungary over a 7-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29(2):249-52
100. Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, Karch H (2002) *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* 185(1):74-84
101. Rivas M, Sosa-Estani S, Rangel J, Caletti MG, Vallés P, Roldán CD, Balbi L, Marsano de Mollar MC, Amoedo D, Miliwebsky E, Chinen I, Hoekstra RM, Mead P, Griffin PM (2008) Risk factors for sporadic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in children, Argentina. *Emerg Infect Dis* 14(5):763-71
102. Beutin L, Krause G, Zimmermann S, Kauffuss S, Gleier K (2004) Characterisation of shiga toxin- producing E.coli strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *Journal of Clinical Microbiology* 42:1099-1108
103. Ethelberg S, Olsen KE, Scheutz F, Jensen C, Schiellerup P, Enberg J, Petersen AM, Olesen B, Gerner-Smidt P, and Mølbak K (2004) Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark. *Emerg Infect Dis* 10(5):842-7
104. Schifferli A, von Vigier RO, Fontana M, Spartà G, Schmid H, Bianchetti MG, Rudin C, and Swiss Pediatric Surveillance Unit (2010) Hemolytic-uremic syndrome in Switzerland: a nationwide surveillance 1997-2003. *Eur J Pediatr* 169(5):591-8
105. Elliott EJ, Robins-Browne RM, O'Loughlin EV, Bennett-Wood V, Bourke J, Henning P, Hogg GG, Knight J, Powell H, Redmond D, Contributors to the Australian Paediatric Surveillance Unit (2001) Nationwide study of haemolytic uraemic syndrome: clinical, microbiological, and epidemiological features. *Arch Dis Child* 85(2):125–131
106. Vally, H, Hall G, Dyda A, Raupach J, Knope K, Combs B, Desmarchelier P (2012) Epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in Australia, 2000-2010. *BMC Public Health* 12:63
107. Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL (2005) Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis* 11(4):603-9
108. Tuttle J, Gomez T, Doyle MP, Wells JG, Zhao T, Tauxe RV, Griffin PM (1999) Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiol Infect* 122(2):185-92

109. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2007) Multistate Outbreak of *E. coli* O157 Infections Linked to Topp's Brand Ground Beef Patties
110. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2008) Investigation of Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections.
111. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (1995) *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami--Washington and California, 1994. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 44(9):157-60
112. Dundas S, Todd WT, Stewart AI, Murdoch PS, Chaudhuri AK, Hutchinson SJ (2001) The central Scotland *Escherichia coli* O157:H7 outbreak: risk factors for the hemolytic uremic syndrome and death among hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 33(7):923-31
113. Borczyk AA, Karmali MA, Lior H, Duncan LM (1987) Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 1(8524):98
114. ACMSF (Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food, UK) (1995) Report on verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. HMSO, London. ISBN 0 11 321909 1
115. Ackers ML, Mahon BE, Leahy E, Goode B, Damrow T, Hayes PS, Bibb WF, Rice DH, Barrett TJ, Hutwagner L, Griffin PM, Slutsker L (1998) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J Infect Dis* 177(6):1588-93
116. Hahn CG, Snell M, Jue B, et al. (1996) *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea outbreak due to contaminated salad—Idaho, 1995 [abstract] In: Abstracts of the 45th Annual Epidemic Intelligence Service Conference. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 18
117. Davidson R, Proctor P, Preston M, et al. (1996) Investigation of a lettuce-borne *Escherichia coli* O157:H7 outbreak in a hospital [abstract J106]. In: Program and abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (New Orleans). Washington, DC: American Society for Microbiology, 238
118. Hilborn ED, Mermin J, Mshar P, et al. (1997) A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with mesclun mix lettuce [abstract]. In: Abstracts of the 46th Annual Epidemic Intelligence Service Conference. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 33
119. Steele BT, Murphy N, Arbus GS, Rance CP (1982) An outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with ingestion of fresh apple juice. *J Pediatr* 101(6):963-5
120. Fukushima H, Hashizume T, Morita Y, Tanaka J, Azuma K, Mizumoto Y, Kaneno M, Matsuura M, Konma K, Kitani T (1999) Clinical experiences in Sakai City Hospital during the massive outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections in Sakai City, 1996. *Pediatr Int* 41(2):213-7
121. Mandrell RE (2007) Outbreak of enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 on leafy vegetables: Incidence, fitness on plants, and source – tracking. 11th Annual PulseNet Update Meeting, Providence, RI  
[http://www.aphl.org/conferences/proceedings/Documents/2007\\_11th\\_Annual\\_PulseNet\\_Update\\_Meeting/Ecoli.pdf](http://www.aphl.org/conferences/proceedings/Documents/2007_11th_Annual_PulseNet_Update_Meeting/Ecoli.pdf)
122. Kaspar C, Doyle ME, Archer J (2009) White paper on non-O157:H7 Shiga-toxin producing *E. coli* from meat and non-meat sources.  
[http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRI\\_Brief\\_NonO157STEC\\_4\\_10.pdf](http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRI_Brief_NonO157STEC_4_10.pdf)

123. Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, Hoekstra RM, Strockbine NA (2005) Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J Infect Dis* 192(8):1422-9
124. Johnson RP, Clarke RC, Wison JB, Read SC, Rahn K, Sandhu KS, Alves D, Karmali M., Lior H, McEwen SA, Spika JS, Gyles CL (1996) Growing concerns and recent outbreaks involving enterohemorrhagic *Escherichia coli* non-O157:H7 serotypes. *J Food Prot* 59:1112-1122
125. Cameron AS, Beers MY, Walker CC, Rose N, Aneer E, Manatakis Z, Kirke K, Calder I, Jenkins F, Goldwater PN, Paton A, Paton J, Jureidini K, Hoffman A, Henning P, Hansman D, Lawrence A, Miller R, Ratcliff R, Doyle R, Murray C, Davos D, Cameron P, Seymour-Murray J, Lim I, Lanser J, Selvey L, and Beaton S (1995) Community outbreak of hemolytic uremic syndrome attributable to *Escherichia coli* O111:NM-South Australia. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 44:550-551, 557,558
126. Schouten JM, van de Giessen AW, Frankena K, De Jong MC, Graat EA (2005) *Escherichia coli* O157 prevalence in Dutch poultry, pig finishing and veal herds and risk factors in Dutch veal herds. *Prev Vet Med* 70(1-2):1-15
127. Ethelberg S, Smith B, Torpdahl M, Lisby M, Boel J, Jensen T, Nielsen EM, Mølbak K (2009) Outbreak of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection from consumption of beef sausage. *Clin Infect Dis* 48(8):e78-81. doi: 10.1086/597502
128. Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, an der Heiden M, Bernard H, Fruth A, Prager R, Spode A, Wadl M, Zoufaly A, Jordan S, Kemper MJ, Follin P, Müller L, King LA, Rosner B, Buchholz U, Stark K, Krause G; HUS Investigation Team (2011) Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med* 365(19):1771-80. doi: 10.1056/NEJMoa1106483
129. Bettelheim KA (2007) The non-O157 shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. *Crit Rev Microbiol* 33(1):67-87
130. Hedican EB, Medus C, Besser JM, Juni BA, Koziol B, Taylor C, Smith KE (2009) Characteristics of O157 versus non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Minnesota, 2000-2006. *Clin Infect Dis* 49(3):358-64. doi: 10.1086/600302
131. Kalchayanand N, Arthur TM, Bosilevac JM, Wheeler TL. Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: Prevalence Associated with Meat Animals and Controlling Interventions. American Meat Science Association
132. Valcour JE, Michel P, McEwen SA, Wilson JB (2002) Associations between indicators of livestock farming intensity and incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Emerg Infect Dis* 8(3):252-7
133. Wells JG, Davis BR, Wachsmuth IK, Riley LW, Remis RS, Sokolow R, Morris GK (1983) Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J Clin Microbiol* 18(3):512-20
134. Anon (2009) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection in Japan as of April 2009. *Infect Agents Surveill Rep* 30:119-120
135. Espié E, Grimont F, Mariani-Kurkdjian P, Bouvet P, Haeghebaert S, Filliol I, Loirat C, Decludt B, Minh NN, Vaillant V, de Valk H (2008) Surveillance of hemolytic uremic syndrome in children less than 15 years of age, a system to monitor O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in France, 1996-2006. *Pediatr Infect Dis J* 27(7):595-601. doi: 10.1097/INF.0b013e31816a062f



136. Garvey P, McKeown P, Carroll A, McNamara E (2009) Epidemiology of verotoxigenic *E. coli* in Ireland, 2008. *Epi-Insight* 10:1–7
137. Anon (2003) OzFoodNet: Enhancing food-borne disease surveillance across Australia: quarterly report, July to September 2002. *Commun Dis Intell* 27(1):89-93
138. Duffy G (2003) Verocytotoxicogenic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. *J Appl Microbiol* 94 Suppl:94S-103S
139. Fegan N, Vanderlinde P, Higgs G, Desmarchelier P (2004) The prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *J Appl Microbiol* 97(2):362-70
140. Albonetti S, Trevisani M, Alonso Alvarez S, Rosmini R (2004) Detection of *Escherichia coli* serotype O157 in beef carcasses and faecal material. *Vet Res Commun* 28 Suppl 1:249-51
141. Alonso S, Mora A, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Ferreira MT, López C, Alberghini L, Albonetti S, Echeita A, Trevisani M, Blanco J (2007) Fecal carriage of *Escherichia coli* O157:H7 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. *Int Microbiol* 10(2):109-16
142. Hancock DD, Besser TE, Kinsel ML, Tarr PI, Rice DH, Paros MG (1994) The prevalence of *Escherichia coli* O157.H7 in dairy and beef cattle in Washington State. *Epidemiol Infect* 113(2):199-207
143. Hussein HS, Bollinger LM (2005) Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. *J Food Prot* 68(10):2224-41
144. Wells JG, Shipman LD, Greene KD, Sowers EG, Green JH, Cameron DN, Downes FP, Martin ML, Griffin PM, Ostroff SM, Potter ME, Tauxe RV, Wachsmuth IK (1991) Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J Clin Microbiol* 29(5):985-9
145. Renter DG, Morris JG Jr, Sargeant JM, Hungerford LL, Berezowski J, Ngo T, Williams K, Acheson DW (2005) Prevalence, risk factors, O serogroups, and virulence profiles of Shiga toxin-producing bacteria from cattle production environments. *J Food Prot* 68(8):1556-65
146. Barkocy-Gallagher GA, Arthur TM, Rivera-Betancourt M, Nou X, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M (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(11):1978-86
147. Fukushima H, Hoshina K, Gomyoda M (1999) Long-term survival of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* 65(11):5177-81
148. Arthur TM, Barkocy-Gallagher GA, Rivera-Betancourt M, Koohmaraie M (2002) Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. *Appl Environ Microbiol* 68(10):4847-52
149. Jeon BW, Jeong JM, Won GY, Park H, Eo SK, Kang HY, Hur J, Lee JH (2006) Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O26 and O111 from cattle in Korea. *Int J Food Microbiol* 110(2):123-6
150. Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Gonzalez EA, Mora A, Prado C, Fernández L, Rio M, Ramos J, Alonso MP (1996) Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle. *Epidemiol Infect* 117(2):251-7

151. Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Gonzalez EA, Mora A, Prado C, Alonso MP, Mourino M, Madrid C, Balsalobre C, Juarez A (1997) Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. *Veterinary Microbiology* 54, 309–319
152. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Gonzalez EA, Blanco J (2000) Serotypes and virulence genes of verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC) isolated from cattle in Spain. In *Pathogenicity and Virulence of Verocytotoxigenic E. coli (VTEC) in Europe Concerted Action* ed. Duffy G, Garvey P, Coia J, Wasteson Y and McDowell, D.A. p. 183. Teagasc, Dublin: The National Food Centre
153. Beutin L, Geier D, Steinrück H, Zimmermann S, Scheutz F (1993) Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol* 31(9):2483-8
154. Montenegro MA, Bülte M, Trumpp T, Aleksić S, Reuter G, Bulling E, Helmuth R (1990) Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle. *J Clin Microbiol* 28(6):1417-21
155. Willshaw GA, Cheasty T, Jiggle B, Rowe B, Gibbons D, Hutchinson DN (1993) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in a herd of dairy cattle. *Vet Rec* 132(4):96
156. Cray WC Jr, Thomas LA, Schneider RA, Moon HW (1996) Virulence attributes of *Escherichia coli* isolated from dairy heifer feces. *Vet Microbiol* 53(3-4):369-74
157. Wilson JB, McEwen SA, Clarke RC, Leslie KE, Wilson RA, Waltner-Toews D, Gyles CL (1992) Distribution and characteristics of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle. *Epidemiol Infect* 108(3):423-39
158. Rahn K, Renwick SA, Johnson RP, Wilson JB, Clarke RC, Alves D, McEwen S, Lior H, Spika J (1997) Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment. *Epidemiol Infect* 119(2):251-9
159. Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Viñas MR, Blanco M, Padola NL, Etcheverría AI (2000) Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. Importance in public health. *Eur J Epidemiol* 16(8):757-62
160. Cobbold R, Desmarchelier P (2000) A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. *Vet Microbiol* 71(1-2):125-37
161. Miyao Y, Kataoka T, Nomoto T, Kai A, Itoh T, Itoh K (1998) Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* harbored in the intestine of cattle in Japan. *Vet Microbiol* 61(1-2):137-43
162. Clarke RC, Wilson, JB, Read SC, Renwick S, Rahn K, Johnson RP, Alves D, Karmali MA, Lior H, McEwen SA, Spika J, Gyles CL (1994) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in the food chain: preharvest and processing perspectives, p. 17–24. In Karmali, M.A., and Goglio, A.G. (eds), *Recent advances in verocytotoxin-producing Escherichia coli infections*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands
163. Synge B, Paiba G (2000) Verocytotoxin-producing *E coli* O157. *Vet Rec* 147(1):27
164. Hancock D, Rice D, Herriott DE, Besser TE, Ebel ED, Carpenter LV (1997) Effects of farm manure-handling practices on *Escherichia coli* O157 prevalence in cattle. *J Food Prot* 60:363-366
165. Herriott DE, Hancock DD, Ebel ED, Carpenter LV, Rice DH, Besser TE (1998) Association of herd management factors with colonization of dairy cattle by Shiga toxin-positive *Escherichia coli* O157. *J Food Prot* 61(7):802-7

- 166.Hancock DD, Besser TE, Rice DH, Herriott DE, Tarr PI (1997) A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiol Infect* 118(2):193-5
- 167.Strachan NJ, Fenlon DR, Ogden ID (2001) Modelling the vector pathway and infection of humans in an environmental outbreak of *Escherichia coli* O157. *FEMS Microbiol Lett* 203(1):69-73
- 168.Heuvelink AE, van den Biggelaar FL, de Boer E, Herbes RG, Melchers WJ, Huis in 't Veld JH, Monnens LA (1998) Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. *J Clin Microbiol* 36(4):878-82
- 169.Johnsen G, Wasteson Y, Heir E, Berget OI, Herikstad H (2001) *Escherichia coli* O157:H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in the southwest part of Norway during 1998 and 1999. *Int J Food Microbiol* 65(3):193-200
- 170.Dontorou A, Papadopoulou C, Filioussis G, Apostolou I, Economou V, Kansouzidou A, Levidiotou S (2004) Isolation of a rare *Escherichia coli* O157:H7 strain from farm animals in Greece. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27(3):201-207
- 171.Wang H, Mao X, Ding H, Zou Q, Peng X (2008) Epidemiological survey on *Escherichia coli* O157 in Chongqing and Three-Gorge Reservoir Areas of China. *Vet Res Commun* 32(6):449-61. doi: 10.1007/s11259-008-9048-8
- 172.Kudva IT, Hatfield PG, Hovde CJ (1996) *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *J Clin Microbiol* 34(2):431-3
- 173.Djordjevic SP, Ramachandran V, Bettelheim KA, Vanselow BA, Holst P, Bailey G, Hornitzky MA (2004) Serotypes and virulence gene profiles of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from feces of pasture-fed and lot-fed sheep. *Appl Environ Microbiol* 70(7):3910-7
- 174.Venter P, Abraham M, Lues JF, Ivanov I (2006) The influence of sanitizers on the lipopolysaccharide composition of *Escherichia coli* O111. *Int J Food Microbiol* 111(3):221-7
- 175.Bhat MA, Nishikawa Y, and Wani SA (2008) Prevalence and virulence gene profiles of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli* from diarrhoeic and healthy lambs in India. *Small Rumin Res* 75:65-70
- 176.Notario R, Fain JC, Prado V, Ríos M, Borda N, Gambandé T (2000) Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in a cattle area of Argentina. Genotypic characterization of the strains of animal origin. *Rev Med Chil* 128(12):1335-41
- 177.Cookson AL, Taylor SC, Bennett J, Thomson-Carter F, Attwood GT (2006) Serotypes and analysis of distribution of Shiga toxin producing *Escherichia coli* from cattle and sheep in the lower North Island, New Zealand. *N Z Vet J* 54(2):78-84
- 178.Tkalcic S, Zhao T, Harmon BG, Doyle MP, Brown CA, Zhao P (2003) Fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in weaned calves following treatment with probiotic *Escherichia coli*. *J Food Prot* 66(7):1184-9
- 179.Blanco M, Blanco JE, Mora A, Rey J, Alonso JM, Hermoso M, Hermoso J, Alonso MP, Dahbi G, González EA, Bernárdez MI, Blanco J (2003) Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *J Clin Microbiol* 41(4):1351-6
- 180.Zhao T, Zhao P, West JW, Bernard JK, Cross HG, Doyle MP (2006) Inactivation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in rumen content- or feces-contaminated drinking water for cattle. *Appl Environ Microbiol* 72(5):3268-73

181. Hussein HS, Thran BH, Glimp HA (2003) Verotoxin-producing *Escherichia coli* in sheep grazing an irrigated pasture or arid rangeland forages. *Exp Biol Med* (Maywood 228(4):358-64
182. Murphy M, Buckley JF, Whyte P, O'Mahony M, Anderson W, Wall PG, Fanning S (2007) Surveillance of dairy production holdings supplying raw milk to the farmhouse cheese sector for *Escherichia coli* O157, O26 and O111. *Zoonoses Public Health* 54(9-10):358-65
183. Islam MA, Mondol AS, de Boer E, Beumer RR, Zwietering MH, Talukder KA, Heuvelink AE (2008) Prevalence and genetic characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from slaughtered animals in Bangladesh. *Appl Environ Microbiol* 74(17):5414-21. doi: 10.1128/AEM.00854-08
184. Vu-Khac H, Cornick NA (2008) Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam. *Vet Microbiol* 126(4):356-63
185. Synge BA, Hopkins GF (1994) Studies of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 in cattle in Scotland and association with human cases. In *Recent Advances in Verocytotoxin-producing Escherichia coli Infections*. Proceedings of second International Symposium and Workshop on Verocytotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* infections, Bergamo, eds. Karmali, MA, Goglio AG, pp. 65-68. Amsterdam: Elsevier
186. Feder I, Wallace FM, Gray JT, Fratamico P, Fedorka-Cray PJ, Pearce RA, Call JE, Perrine R, Luchansky JB (2003) Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from intact colon fecal samples of swine. *Emerg Infect Dis* 9(3):380-3
187. Nakazawa M, Akiba M (1999) Swine as a potential reservoir of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *Emerg Infect Dis* 5(6):833-4
188. Borie C, Monreal Z, Guerrero P, Sánchez M L, Martínez J, Arellano C, Prado V (1997) Prevalence and characterization of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolated from healthy cattle and pigs slaughtered in Santiago, Chile. *Arch Med Vet* 29:205–212
189. Atebaa CN, Mbewea, M, Bezuidenhoutb, C (2008) Prevalence of *Escherichia coli* O157 strains in cattle, pigs and humans in North West province, South Africa. *South African Journal of Science* Vol. 104 Issue 1/2, p7-8
190. Aarestrup FM, Jorsal SE, Ahrens P, Jensen NE, Meyling A (1997) Molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease. *J Clin Microbiol* 35(1):20-4
191. Sonntag AK, Bielaszewska M, Mellmann A, Dierksen N, Schierack P, Wieler LH, Schmidt MA, Karch H (2005) Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol* 71(12):8855-63
192. Fratamico PM, Bagi LK, Bush EJ, Solow BT (2004) Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine feces recovered in the National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 study. *Appl Environ Microbiol* 70(12):7173-8
193. Bosilevac M (US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Roman L. Hruska US Meat Animal Research Center, Clay Center, NE), personal communication.
194. Tozzi AE, Niccolini A, Caprioli A, Luzzi I, Montini G, Zacchello G, Gianviti A, Principato F, Rizzoni G (1994) A community outbreak of haemolytic-uraemic syndrome in children occurring in a large area of northern Italy over a period of several months. *Epidemiol Infect* 113(2):209-19

195. Schoeni JL, Doyle MP (1994) Variable colonization of chickens perorally inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and subsequent contamination of eggs. *Appl Environ Microbiol* 60(8):2958-62
196. Grossmann K, Weniger B, Baljer G, Brenig B, Wieler LH (2005) Racing, ornamental and city pigeons carry shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) with different Shiga toxin subtypes, urging further analysis of their epidemiological role in the spread of STEC. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 118(11-12):456-63
197. Schimmer B, Nygard K, Eriksen HM, Lassen J, Lindstedt BA, Brandal LT, Kapperud G, Aavitsland P (2008) Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by stx2-positive *Escherichia coli* O103:H25 traced to cured mutton sausages. *BMC Infect Dis* 8:41. doi: 10.1186/1471-2334-8-41
198. Pradel N, Bertin Y, Martin C, Livrelli V (2008) Molecular analysis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients and dairy samples in France. *Appl Environ Microbiol* 74(7):2118-28. doi: 10.1128/AEM.02688-07
199. Ferens WA, Hovde CJ (2011) *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathog Dis* 8(4):465-87. doi: 10.1089/fpd.2010.0673
200. Hancock DD, Besser TE, Rice DH, Ebel ED, Herriott DE, Carpenter LV (1998) Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. *Prev Vet Med* 35(1):11-9
201. Busch U, Hörmansdorfer S, Schraner S, Huber I, Bogner KH, Sing A (2007) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* excretion by child and her cat. *Emerg Infect Dis* 13(2):348-9
202. De Paula CJS, Marin JM (2008) Occurrence of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dogs with diarrhea. *Ciencia Rural* 38:1682-1686
203. Nielsen EM, Scheutz F, Torpdahl M (2006) Continuous surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by pulsed-field gel electrophoresis shows that most infections are sporadic. *Foodborne Pathog Dis* 3(1):81-7
204. Perelle S, Dilasser F, Grout J, Fach P (2004) Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol Cell Probes* 18(3):185-92
205. García A, Fox JG (2003) The rabbit as a new reservoir host of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 9(12):1592-7
206. Erickson MC, Doyle MP (2007) Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Food Prot* 70(10):2426-49
207. Doyle MP (1991) *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int J Food Microbiol* 12(4):289-301
208. Willshaw GA, Thirlwell J, Jones AP, Parry S, Salmon RL, Hickey M (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(5):304-7
209. Griffin PM, Tauxe RV (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

210. Kim MS, Doyle MP (1992) Dipstick immunoassay to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in retail ground beef. *Appl Environ Microbiol* 58(5):1764-7
211. Sekla L, Milley D, Stackiw W, Sisler J, Drew J, Sargent D (1990) Verotoxin-producing *Escherichia coli* in ground beef--Manitoba. *Can Dis Wkly Rep* 16(22):103-5
212. Samadpour M, Ongerth JE, Liston J, Tran N, Nguyen D, Whittam TS, Wilson RA, Tarr PI (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(3):1038-40
213. Johnson, JL, Rose BE, Sharar AK, Ransom GM, Lattuada CP, McNamara AM (1995) Methods Used for Detection and Recovery of *Escherichia coli* O157:H7 Associated with a Food-borne Disease Outbreak. *Journal of Food Protection* 58 (6):597-603
214. Little CL, de Louvois J (1998) The microbiological examination of butchery products and butchers' premises in the United Kingdom. *J Appl Microbiol* 85(1):177-86
215. Tarr PI, Neill MA (1996) Perspective: the problem of non-O157:H7 shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 174(5):1136-9
216. TarrPadhye NV, Doyle MP (1991) Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Appl Environ Microbiol* 57(9):2693-8
217. Solomakos N, Govaris A, Angelidis AS, Pournaras S, Burriel AR, Kritas SK, Papageorgiou DK (2009) Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from raw bovine, caprine and ovine milk in Greece. *Food Microbiol* 26(8):865-71. doi: 10.1016/j.fm.2009.06.002
218. Kasrazadeh M, Genigeorgis C (1995) Potential growth and control of *Escherichia coli* O157:H7 in soft hispanic type cheese. *Int J Food Microbiol* 25(3):289-300
219. Wang G, Zhao T, Doyle, MP (1997) Survival and Growth of *Escherichia coli* O157 : H7 in Unpasteurized and Pasteurized Milk. *Food Microbiology* 60(6):610-613
220. Cieslak PR, Barrett TJ, Griffin PM, Gensheimer KF, Beckett G, Buffington J, Smith MG (1993) *Escherichia coli* O157:H7 infection from a manured garden. *Lancet* 342(8867):367.
221. Morgan GM, Newman C, Palmer SR, Allen JB, Shepherd W, Rampling AM, Warren RE, Gross RJ, Scotland SM, Smith HR (1988) First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *Escherichia coli* O 157.H7 in the UK. *Epidemiol Infect* 101(1):83-91
222. Islam M, Doyle MP, Phatak SC, Millner P, Jiang X (2004) Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *J Food Prot* 67(7):1365-70
223. Avery SM, Moore A, Hutchison ML (2004) Fate of *Escherichia coli* originating from livestock faeces deposited directly onto pasture. *Lett Appl Microbiol* 38(5):355-9.
224. Mukherjee A, Speh D, Dyck E, Diez-Gonzalez F (2004) Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, Salmonella, and *Escherichia coli* O157:H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota farmers. *J Food Prot* 67(5):894-900
225. Johnson R, Harris J, Logue CM, Meng J, Sofos JN, Grant MS, Hedberg C, Dickson JS (2011) The significance of non-O157 shiga toxin producing *Escherichia coli* in food. *Food Protection Trends. Executive Summary*
226. Koohmaraie M (2007) Prevalence and control of non- O157 STEC in beef and lamb processing plants. Presented at The Public Health Significance of Non-O157 Shiga toxin-producing

- Escherichia coli* strains negative for locus of enterocyte effacement. *Emerg Infect Dis* 15:372–380
227. Atalla HN, Johnson R, McEwen S, Osborne RW, Gyles CL (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(9):1167-72
  228. Barlow RS, Gobius KS, Desmarchelier PM (2006) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and lamb cuts: results of a one-year study. *Int J Food Microbiol* 111(1):1-5
  229. Auvray F, Lecureuil C, Taché J, Leclerc V, Deperrois V, Lombard B (2007) Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail-minced beef using PCR-based techniques, immunoassays and colony hybridization. *Lett Appl Microbiol* 45(6):646-51
  230. Lindqvist R, Antonsson AK, Norling B, Persson I, Ekstrom ACL, Fager U, Eriksson E, Lofdahl S, Norberg P (1998) The prevalence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157:H7 in beef in Sweden determined by PCR assays and an immunomagnetic separation (IMS) method. *Food Microbiology* 15, 591–601
  231. European Food Safety Authority (2006) The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005. *The EFSA Journal*  
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/94r.htm>
  232. Piérard D, Van Damme L, Moriau L, Stevens D, Lauwers S (1997) Virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw meats. *Appl Environ Microbiol* 63(11):4585-7
  233. Hussein HS, Sakuma T (2005) Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *J Dairy Sci* 88(2):450-65
  234. Sivapalasingam S, Friedman CR, Cohen L, Tauxe RV (2004) Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J Food Prot* 67(10):2342-53
  235. Brandl MT (2006) Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annu Rev Phytopathol* 44:367-92
  236. Griffin PM (2007) Federal public health programs and CDC experiences with non-O157 STEC, presented at the public health significance of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) public meeting, George Mason University, Arlington Campus, Arlington VA
  237. Govaris A, Angelidis AS, Katsoulis K, Pournaras S (2011) Occurrence, virulence genes and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 in bovine, caprine, ovine and porcine carcasses in Greece. *J Food Safety* 31:242–249
  238. Dontorou C, Papadopoulou C, Filioussis G, Economou V, Apostolou I, Zakkas G, Salamoura A, Kansouzidou A, Levidiotou S (2003) Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. *Int J Food Microbiol* 82(3):273-9
  239. Kansouzidou A, Litke OM, Karabaxoglou D, Danielides BD (1994) Incidence of *E. coli* O157:H7 in animal faeces and minced meat. *Appl Clin Microbiol Lab Diagn* 9:264-268
  240. Lekkas C, Kakouri A, Paleologos E, Voutsinas LP, Kontominas MG, Samelis J (2006) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12 degrees 0C. *Food Microbiol* 23(3):268-76

241. Gerner-Smidt P, Hise K, Kincaid J, Hunter S, Rolando S, Hyytiä-Trees E, Ribot EM, Swaminathan B; PulseNet Taskforce (2006) PulseNet USA: a five-year update. *Foodborne Pathog Dis* 3(1):9-19
242. Ahmed R, Bopp C, Borczyk A, Kasatiya S (1987) Phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis* 155(4):806-9
243. Hyytiä-Trees E, Smole SC, Fields PA, Swaminathan B, Ribot EM (2006) Second generation subtyping: a proposed PulseNet protocol for multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157). *Foodborne Pathog Dis* 3(1):118-31
244. Okrend AJG, Rose BE, Bennett B (1990) A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. *J Food Prot* 53:249–252
245. Chapman PA, Wright DJ, Siddons CA (1994) A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces. *J Med Microbiol* 40(6):424-7
246. Vernozy-Rozand C, Mazuy C, Ray-Gueniot S, Boutrand-Loeï S, Meyrand A, Richard Y (1997) Detection of *Escherichia coli* O157 in French food samples using an immunomagnetic separation method and the VIDAS E. coli O157. *Lett Appl Microbiol* 25(6):442-6
247. Robson WL, Scott RB, Fick GH (1990) Influence of antidiarrheal and antimicrobial medications on the hemorrhagic colitis associated with hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr* 117(4):675-6
248. Stewart AI, Jones GA, McMenamin J, Chaudhuri AKR, Todd WTA (1997) 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections. Melville, N.Y: Lois Joy Galler Foundation for Hemolytic Uremic Syndrome Inc. Central Scotland *Escherichia coli* O157 outbreak—clinical aspects, abstr. V212/Vii; p. 115
249. Walterspiel JN, Ashkenazi S, Morrow AL, Cleary TG (1992) Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin I. *Infection* 20(1):25-9
250. Wolf LE, Acheson DW, Lincicome LL, Keusch GT (1997) 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections. Melville, N.Y: Lois Joy Galler Foundation for Hemolytic Uremic Syndrome Inc. Subinhibitory concentrations of antibiotics increase the release of Shiga toxin from E. coli O157:H7 in vitro, abstr. V145/III; p. 60
251. Cordovéz A, Prado V, Maggi L, Cordero J, Martinez J, Misraji A, Rios R, Soza G, Ojeda A, Levine MM (1992) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* associated with hemolytic-uremic syndrome in Chilean children. *J Clin Microbiol* 30(8):2153-7
252. Wolf DC, Giannella RA (1993) Antibiotic therapy for bacterial enterocolitis: a comprehensive review. *Am J Gastroenterol* 88(10):1667-83
253. Cimolai, N, Carter JE, Morrison BJ, Anderson JD (1990) Risk factors for the progression of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis to hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr* 116:589-592
254. Siegler RL (1988) Management of hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr* 112(6):1014-20
255. Verweyen HM, Karch H, Brandis M, Zimmerhackl LB (2000) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: following transmission routes. *Pediatr Nephrol* 14(1):73-83
256. Karmali MA (1989) Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 2(1):15-38



- 257.Griffin PM, Ostroff SM, Tauxe RV, Greene KD, Wells JG, Lewis JH, Blake PA (1988) Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections. A broad clinical spectrum. *Ann Intern Med* 109(9):705-12
- 258.Karmali MA, Mascarenhas M, Petric M, Dutil L, Rahn K, Ludwig K, Arbus GS, Michel P, Sherman PM, Wilson J, Johnson R, Kaper JB (2003) Age-specific frequencies of antibodies to *Escherichia coli* verocytotoxins (Shiga toxins) 1 and 2 among urban and rural populations in southern Ontario. *J Infect Dis* 188(11):1724-9
- 259.Ludwig K, Karmali MA, Smith CR, Petric M (2002) Cross-protection against challenge by intravenous *Escherichia coli* verocytotoxin 1 (VT1) in rabbits immunized with VT2 toxoid. *Can J Microbiol* 48(1):99-103
- 260.Ahmed A, Li J, Shiloach Y, Robbins JB, Szu SC (2006) Safety and immunogenicity of *Escherichia coli* O157 O-specific polysaccharide conjugate vaccine in 2-5-year-old children. *J Infect Dis* 193(4):515-21
- 261.Karmali MA (2004) Prospects for preventing serious systemic toxemic complications of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections using Shiga toxin receptor analogues. *J Infect Dis* 189(3):355-9
- 262.Jordan D, McEwen SA, Lammerding AM, McNab WB, Wilson JB (1999) Pre-slaughter control of *Escherichia coli* O157 in beef cattle: a simulation study. *Prev Vet Med* 41(1):55-74
- 263.Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66(5):365-78
- 264.Sargeant JM, Amezcua MR, Rajic A, Waddell L (2007) Pre-harvest interventions to reduce the shedding of *E. coli* O157 in the faeces of weaned domestic ruminants: a systematic review. *Zoonoses Public Health* 54(6-7):260-77
- 265.Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM (2010) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol* 140(3-4):360-70. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.04.011
- 266.Woerner DR, Ransom JR, Sofos, JN, Scanga JA, Smith GC, Belk KE (2006) Preharvest processes for microbial control in cattle. *Food Prot* 26:393-400
- 267.Kudva IT, Jelacic S, Tarr PI, Youderian P, Hovde CJ (1999) Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-specific bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* 65(9):3767-73
- 268.Callaway TR, Anderson RC, Edrington TS, Genovese KJ, Bischoff KM, Poole TL, Jung YS, Harvey RB, Nisbet DJ (2004) What are we doing about *Escherichia coli* O157:H7 in cattle? *J Anim Sci* 82 E-Suppl:E93-99
- 269.Haines RJ (2004) Report of the Meat Regulatory and Inspection Review: Farm to Fork - A Strategy for Meat Safety in Ontario. Toronto: Ontario Ministry of the Attorney General
- 270.Stevens MP, van Diemen PM, Dziva F, Jones PW, Wallis TS (2002) Options for the control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in ruminants. *Microbiology*. 148(Pt 12):3767-78
- 271.Varela NP, Dick P, Wilson J (2013) Assessing the existing information on the efficacy of bovine vaccination against *Escherichia coli* O157:H7--a systematic review and meta-analysis. *Zoonoses Public Health* 60(4):253-68. doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01523.x
- 272.Van Donkersgoed J, Hancock D, Rogan D, Potter AA (2005) *Escherichia coli* O157:H7 vaccine field trial in 9 feedlots in Alberta and Saskatchewan. *Can Vet J* 46(8):724-8
- 273.Byrne CM, Bolton DJ, Sheridan JJ, McDowell DA, Blair IS (2000) The effects of preslaughter washing on the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 transfer from cattle hides to carcasses during slaughter. *Lett Appl Microbiol* 30(2):142-5

274. Gannon VPJ (1999) Control of *Escherichia coli* O157:H7 at Slaughter. In Stewart CS, Flint HJ (eds). *Escherichia coli* O157 in Farm Animals. Pp 169-93. CABI Publishing, Wallingford, UK
275. Feng P (2001) *Escherichia coli*. In: Labbe RG, Garcia S (eds). Guide to Foodborne Pathogens. Pp 143-62. John Wiley & Sons, Inc., Publication, New York
276. Altekruze SF, Cohen ML, Swerdlow DL (1997) Emerging foodborne diseases. *Emerg Infect Dis* 3(3):285-93
277. Hulebak KL, Schlosser W (2002) Hazard analysis and critical control point (HACCP) history and conceptual overview. *Risk Anal* 22(3):547-52
278. Campbell ME, Gardner CE, Dwyer JJ, Isaacs SM, Krueger PD, Ying JY (1998) Effectiveness of public health interventions in food safety: a systematic review. *Can J Public Health* 89(3):197-202
279. Alepopoulou E, Panopoulou M, Maltezos E, Kartalis G, Kartali S (2007) Isolation of *E. coli* O157:H7 and non-O157 in the region of Thrace, Greece. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) & 25th International Congress of Chemotherapy (ICC), 31.03.2007 - 03.04.2007.  
<http://www.blackwellpublishing.com/eccmid17/abstract.asp?id=56380>
280. Kansouzidou A, Mitka S, Ifantidou A, Chaidouli E, Psillaki X, Gymnopoulou M. (2005) Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 *E. coli* strains in stool specimens of patients with acute enteric infection. *Acta Microbiologica Hellenica* 50(4): 245-258.  
<http://www.scopus.com/record/display.url?eid=2-s2.0-28444474231&origin=resultslist&sort=plf-f&src=s&st1=Kansouzidou&st2=A&nlo=1&nlr=20&nls=count-f&sid=D71BF65CD95F5C9FF97B68CD13DECDAC.WXhD7YyTQ6A7Pvk9AIA%3a473&sot=anl&sdt=aut&sl=39&s=AU-ID%28%22Kansouzidou%2c+Athina%22+6603593084%29&relpos=20&relpos=0&searchTerm=AU-ID%28%5C%26quot%3BKansouzidou%2C+Athina%5C%26quot%3B+6603593084%29>
281. Paton AW, Paton JC (1998) Detection and characterization of Shiga toxicogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *J Clin Microbiol* 36(2):598-602
282. Gunzer F, Bohm H, Russmann H, Bitzan M, Aleksic S, Karch H (1992) Molecular detection of sorbitol fermenting *E. coli* O157 in patients with hemolytic- uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 30:1807-1810
283. Karch H, Huppertz HI, Bockemühl J, Schmidt H, Schwarzkopf A, Lissner R (1997) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Germany. *J Food Prot* 60(11):1454-1457.  
<http://www.scopus.com/record/display.url?eid=2-s2.0-0030807699&origin=resultslist&sort=plf-f&src=s&st1=Shiga+toxin+-+producing+Escherichia+coli+infections+in+Germany&nlo=&nlr=&nls=&sid=D71BF65CD95F5C9FF97B68CD13DECDAC.WXhD7YyTQ6A7Pvk9AIA%3a580&sot=b&sdt=b&sl=77&s=TITLE-ABS-KEY%28Shiga+toxin+-+producing+Escherichia+coli+infections+in+Germany%29&relpos=115&relpos=115&searchTerm=TITLE-ABS-KEY%28Shiga+toxin+-+producing+Escherichia+coli+infections+in+Germany%29>

284. Burnens AP, Boss P, Orskov F, Orskov I, Scaad UB, Muller F, Heinzle R, Nicolet J (1992) Occurrence and phenotypic properties of verotoxin producing *E. coli* in sporadic cases of gastroenteritis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11:631-634
285. Pierard D, Stevens D, Moriau L, Lior H, Lauwers S (1997) Isolation and virulence factors of verocytotoxin-producing *E. coli* in human stool samples. *Clin Microbiol Infect* 3:531-540
286. Mainil J (1999) Shiga/verocytotoxins and Shiga /verotoxigenic *E. coli* in animals. *Vet Res* 30:235-257
287. Richards HA, Pérez-Conesa D, Doane CA, Gillespie BE, Mount JR, Oliver SP, Pangloli P, Draughon FA (2006) Genetic Characterization of a Diverse *Escherichia coli* O157:H7 Population from a Variety of Farm Environments. *Foodborne Pathogens and Disease* 3(3):259-265
288. Feder I, Gray JT, Pearce RA, Fratamico PM, Bush E, Porto-Fett A, Wallace FM, Fedorka-Cray PJ, Luchansky JB (2007) Testing of swine feces obtained through the National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 study for the presence of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection* 70(6):1489-1492
289. Dipineto L, Santaniello A, Fontanella M, Lagos K, Fioretti A, Menna LF (2006) Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in living layer hens. *Lett Appl Microbiol* 43:293-295
290. Gunn GJ, McKendrick IJ, Ternent HE, Thomson-Carter F, Foster G, Synge BA (2007) An investigation of factors associated with the prevalence of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 shedding in Scottish beef cattle. *Vet J* 174(3):554-64
291. Conedera G, Dalvit P, Martini M, Galiero G, Gramaglia M, Goffredo E, Loffredo G, Morabito S, Ottaviani D, Paterlini F, Pezzotti G, Pisanu M, Semprini P, Caprioli A (2004) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. *Int J Food Microbiol* 96(1):67-73
292. McEvoy JM, Doherty AM, Sheridan JJ, Thomson-Carter FM, Garvey P, McGuire L, Blair IS, McDowell DA (2003) The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157:H7 at a commercial beef abattoir. *J Appl Microbiol* 95(2):256-66
293. Sargeant JM, Sanderson MW, Smith RA, Griffin DD (2003) *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle feces and water in four major feeder-cattle states in the USA. *Prev Vet Med* 61(2):127-35
294. Eriksson E, Aspan A, Gunnarsson A, Vågsholm I (2005) Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O157 in Swedish dairy herds. *Epidemiol Infect* 133(2):349-58
295. Zschock M, Hamann HP, Kloppert B, Wolter W (2000) Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. *Lett Appl Microbiol* 31:203-208
296. Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Gonzalez EA, Bernardez MI, Alonso MP, Coira A, Rodriguez A, Rey J, Alonso JM, Usera MA (2003) Verotoxin – producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of *E. coli* O157:H7 and non-O157 STEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Exp Biol Med (Maywood)* 228:345-351
297. Irino K, Kato MA, Vaz TM, Ramos II, Souza MA, Cruz AS, Gomes TA, Vieira MA, Guth BE (2005) Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in Sao Paulo State, Brazil. *Vet Microbiol* 105:29-36
298. Ogden ID, MacRae M, Strachan NJC (2005) Concentration and prevalence of *E. coli* O157 in sheep faeces at pasture in Scotland. *Journal of Applied Microbiology* 98:646-651

299. Shukla R, Slack R, George A, Cheasty T, Rowe B, Scutter J. (1995) *Escherichia coli* O157 infection associated with a farm visitor centre. *Commun Dis Rep CDR Rev* 5: R86-90.
300. Bielaszwska M, Janda J, Blahova K, Minarikova H, Jikova E, Karmali MA, Laubova J, Sikulova J, Preston MA, Khakhria R, Karch H, Klazarova H, Nyc O (1997) Human *E. coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidem Infect* 119:299-305
301. Pulz M, Matussek A, Monazahian M, Tittel A, Nikolic E, Hartmann M, Bellin T, Buer J, Gunzer F (2003) Comparison of a Shiga Toxin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Two Types of PCR for Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Human Stool Specimens. *J Clin Microbiol* 41:4671-4675
302. Bean NH, Goulding JS, Lao C, Angulo FJ. (1996) Surveillance for foodborne-disease outbreaks--United States, 1988-1992. *MMWR CDC Surveill Summ.* 45:1-66
303. DeRoever C (1998) Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. *Food Control* 9:321-347
304. Parish ME (1997) Public health non pasteurized fruit juices. *Crit Rev Microbiol* 23:109-119
305. Mukherjee A, Speh D, Jones AT, Buesing KM, Diez-Gonzalez F (2006) Longitudinal microbiological survey of fresh produce grown by farmers in the upper midwest. *J Food Prot* 69(8):1928-36
306. Chapman PA, Cerdan Malo AT, Ellin M, Ashton R, Harkin MA (2001) *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. *Int J Food Microbiol* 64, 139–150
307. Bouvet J, Bavai C, Rossel R, Le Roux A, Montet MP, Ray-Gueniot S, Mazuy C, Arquilliere C, Vernozy-Rozand C (2001) Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in pig carcasses from three French slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol* 71: 249–255
308. Bouvet J, Montet MP, Rossel R, Le Roux A, Bavai C, Ray-Gueniot S, Mazuy C, Atrache V, Vernozy-Rozand C (2002b) Effects of slaughter processes on pig carcass contamination by verotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7. *Int. J Food Microbiol* 77: 99–108
309. Lenahan M, Crowley H, O'Brien SB, Byrne C, Sweeney T, Sheridan JJ (2009) The potential use of chilling to control the growth of Enterobacteriaceae on porcine carcasses and the incidence of *E. coli* O157:H7 in pigs. *J. Appl Microbiol* 106: 1512–1520
310. Bonardi S, Brindani F, Pizzin G, Lucidi L, D'inciau M, Liebana E, Morabito S (2003) Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy. *Int J Food Microbiol* 85: 101– 110
311. Phillips D, Sumner J, Alexander JF, Dutton KM (2001) Microbiological quality of Australian sheep meat. *J Food Prot* 64: 697–700
312. ECDC Technical Report (2011) 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
313. Battisti A, Lovari S, Franco A, Di Egidio A, Tozzoli R, Caprioli A, Morabito S (2006) Prevalence of *Escherichia coli* O157 in lambs at slaughter in Rome, central Italy. *Epidemiol Infect* 134: 415–419

314. Mark Taylor C. (2008) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and Shigella dysenteriae type 1-induced haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr Nephrol* 23(9):1425-31. doi: 10.1007/s00467-008-0820-3.
315. Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marches O, Capioli A (2000) Typing of intimin genes in human and animal enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterisation of a new intimin variant. *Infection Immunity* 68:64-71
316. Heuvelink AE, Zwartkruis-Nahuis JT, Beumer RR, de Boer E (1999) Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in meats obtained from retail outlets in The Netherlands. *J Food Prot* 62(10):1115-22.  
<http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/1999/00000062/00000010/art00003?token=004b116837e442f2067217a7646707b23566c783f6a687627502b333e3568263c2be7f9ac47>
317. Van Donkersgoed J, Graham T, Gannon V (1999) The prevalence of verotoxins, *Escherichia coli* O157:H7, and Salmonella in the feces and rumen of cattle at processing. *Can Vet J* 40(5):332-8
318. Rhoades JR, Duffy G, Koutsoumanis K (2009) Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, Salmonella enterica and Listeria monocytogenes in the beef production chain: a review. *Food Microbiol* 26(4):357-76. doi: 10.1016/j.fm.2008.10.012.
319. de Louvois J, Rampling A (1998) One fifth of samples of unpasteurised milk are contaminated with bacteria. *BMJ* 316(7131):625
320. Murinda SE, Nguyen LT, Ivey SJ, Gillespie BE, Almeida RA, Draughon FA, Oliver SP (2002) Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in bulk tank milk and fecal samples from cull cows: a 12-month survey of dairy farms in east Tennessee. *J Food Prot* 65(5):752-9
321. Picozzi C, Foschino R, Heuvelink A, Beumer R (2005) Phenotypic and genotypic characterization of sorbitol-negative or slow-fermenting (suspected O157) *Escherichia coli* isolated from milk samples in Lombardy region. *Lett Appl Microbiol* 40(6):491-6
322. Heuvelink AE, Bleumink B, van den Biggelaar FL, Te Giffel MC, Beumer RR, de Boer E (1998) Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in raw cow's milk in The Netherlands. *J Food Prot* 61(12):1597-601
323. Coia JE, Johnston Y, Steers NJ, Hanson MF (2001) A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland. *Int J Food Microbiol* 66(1-2):63-9
324. Caro I, Mateo J, García-Armesto MR (2007) Phenotypical characteristics of Shiga-like toxin *Escherichia coli* isolated from sheep dairy products. *Lett Appl Microbiol* 45(3):295-300
325. Prendergast DM, Lendrum L, Pearce R, Ball C, McLernon J, O'Grady D, Scott L, Fanning S, Egan J, Gutierrez M (2011) Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in beef and sheep abattoirs in Ireland and characterisation of isolates by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis. *Int J Food Microbiol* 144(3):519-27. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.012.
326. Ramoneda M, Foncuberta M, Simón M, Sabaté S, Ferrer MD, Herrera S, Landa B, Musté N, Martí R, Trabado V, Carbonell O, Vila M, Espelt M, Ramírez B, Durán J (2013) Prevalence of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 (VTEC O157) and compliance with microbiological safety standards in bovine carcasses from an industrial beef slaughter plant. *Lett Appl Microbiol* 56(6):408-13. doi: 10.1111/lam.12062.

327. Phillips D, Sumner J, Alexander JF, Dutton KM (2001) Microbiological quality of Australian beef. *J Food Prot* 64(5):692-6
328. Heuvelink AE, Roessink GL, Bosboom K, de Boer E (2001) Zero-tolerance for faecal contamination of carcasses as a tool in the control of O157 VTEC infections. *Int J Food Microbiol* 66(1-2):13-20
329. Mechie SC, Chapman PA, Siddons CA (1997) A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. *Epidemiol Infect* 118(1):17-25
330. Cardinal P (1993) Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 and detection of verotoxigenic *E. coli* in food and cattle feces in Quebec in 1990–1991. In: Todd ECD, MacKenzie JM editor. *Escherichia coli* O157:H7 and Other Verotoxigenic *E. coli* in Foods. Ottawa, Canada: Food Directorate, Health Protection Branch, Health and Welfare Canada, and the Canadian Meat Council. p. 141–147
331. Lira WM, Macedo C, Marin JM (2002) The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. *J Appl Microbiol* 97(4):861-6
332. Govaris A, Papageorgiou DK, Papatheodorou K (2002) Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of feta and teleme cheeses. *J Food Prot* 65(4):609-15
333. Govaris A, Koidis P, Papatheodorou K (2002) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Feta cheese during storage. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 53(1): 24-32
334. Govaris A, Papageorgiou DK, Papatheodorou K (2002) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in cultured butter during storage. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 53(2): 147-161
335. Govaris A, Koidis P, Papatheodorou K (2002) Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in sour milk, cows' milk yogurt and ewes' milk yogurt. *Journal of Dairy Research* 69(4):655-660

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## **Παράρτημα Ι- Δελτίο Καταγραφής Γαστρεντερίτιδας**



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
 ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
 ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ  
 Τηλ.2410565007  
 Fax.2410258197

**ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΙΑΤΡΟΥ:**

ΔΕΛΤΙΟ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΤΙΔΑΣ			
	Συνολικός αριθμός ασθενών που εξετάστηκαν	Αριθμός ασθενών με πιθανή μικροβιακή γαστρεντερίτιδα	Αριθμός ασθενών με πιθανή ιογενή γαστρεντερίτιδα
Κυριακή			
Δευτέρα			
Τρίτη			
Τετάρτη			
Πέμπτη			
Παρασκευή			
Σάββατο			
ΣΥΝΟΛΟ			

Γαστρεντερίτιδα: Αιφνίδια εμφάνιση συχνών υδαρών κενώσεων άνω των 2 ημερησίως, με ενίοτε συνοδά συμπτώματα έμετο, κακουχία, καταβολή, πυρετό, κοιλιακό άλγος.

**A) Πιθανή βακτηριακή:** Εμφάνιση ενός ή περισσότερων από τα παρακάτω: πρόσμειξη αίματος στις κενώσεις ή υψηλός πυρετός ή κωλικοειδή άλγη ή τεινεσμός ή ορθική έπειξη ή έντονη κακουχία.

**B) Πιθανή ιογενής:** Αρχίζει συνήθως με εμετούς και ακολουθείται από ηπιότερες εκδηλώσεις (χαμηλός ή καθόλου πυρετός, ήπιο ή καθόλου κοιλιακό άλγος) και κενώσεις χωρίς πρόσμειξη αίματος ή τεινεσμό. Στις μικρότερες ηλικίες δεν αποκλείεται η εμφάνιση αφυδάτωσης και βαριάς κλινικής εικόνας.

Ημερομηνία από...../...../..... εως...../...../.....

## **Παράρτημα ΙΙ- Βάση Δεδομένων Epi-Info**

File Edit Options Help

## ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΝΤΩΝ ΙΑΤΡΩΝ

Ιατρός

Επώνυμο:  Όνομα:  Κωδικός Ιατρού:   
 Ημερ:  Δίπλω:  Διακρίση:   
 Υπόθεση:  Αγωγή:  Φορέ:  Έτος:   
 Ειδίκευση:  Είδος Εργασίας:

Κέντρο Υγείας/ΠΙ  
 Ελεύθερος Επαγγελματίας

Όνοματεπώνυμο:

File Edit Options Help

## ΔΕΛΤΙΟ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΤΙΔΑΣ

Ιατρός:  Κωδικός Ιατρού:   
 Εβδομάδα:  Έτος:  Μήνας:

Σύνολο Εισασθέντων Ασθενών:  Σύνολο Ασθενών με ακροβατική γαστρεντερίτιδα:  Σύνολο Ασθενών με οξυκή γαστρεντερίτιδα:

Επακόλουθο καταγραφή

Κατηγορία	Εισασθέντες ασθενείς	Ασθενείς με ακροβατική γαστρεντερίτιδα	Ασθενείς με οξυκή γαστρεντερίτιδα
Κυριακή	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Δευτέρα	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Τρίτη	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Τετάρτη	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Πέμπτη	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Παρασκευή	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Σάββατο	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

How Enter, Repeat, activate, Logon/exit

File Edit Options Help

### ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

*Δημογραφικά*

1.Επώνυμο  Α/Α

2.Όνομα

3.Ηλικία  Ημέρες  Μήνες  Έτη

4.Φύλο

5.Νομός

6.Πόλη/χωριό

7.Διεύθυνση

8.Ταχυδρομικός κώδικας

9.Τηλέφωνο

10.Επίγγραφο

11.Καταγωγή  Άλλο προσδιορίστε:

File Edit Options Help

### Ιστορικό-Κλινικά στοιχεία

12.Πότε ξεκίνησαν τα συμπτώματα Ημερομηνία  Ώρα

13.Πόσο διάρρησαν τα συμπτώματα Ημέρες  Ώρες

14.Αριθμός διαρροϊκών κενώσεων/ημέρα

15.Αριθμός εμέτων/ημέρα

16.Ποια από τα παρακάτω συμπτώματα εμφανίστηκαν:

Διάρροια

Αιμαρραγική Διάρροια

Πυρετός

Κοιλιακό άλγος

Νauseία

Εμετός

Πυνιόκοιλιαός

File Edit Options Help

### Παράγοντες κινδύνου - Ιστορικό έκθεσης

17. Συμφαιτείστε σε κενό γούμα:

18. Ημερομηνία ύπαπτου γούματος:

19. Τρόφιμα που καταναλώθηκαν ή δραστηριότητες που πραγματοποιήσατε την προηγούμενη εβδομάδα:

20. Ταξιδεύσατε σε κάποια ξένη χώρα:

Ημερομηνία ταξιδιού:  Περιοχή ταξιδιού:

21. Πραγματοποιήσατε καρδιά ελευτερική δραστηριότητα (π.χ. κατασκήνωση):

Ημερομηνία:  Περιοχή:

22. Είχατε επαφή με ζώα/κατοικίδια:

Αν ναι προσδιορίστε:

Consent Legal

File Edit Options Help

### Παράγοντες κινδύνου - Ιστορικό έκθεσης(συνέχεια)

23. Προέλευση πόσιμου νερού στα σπίτι:  δίκτυο ύδρευσης  Πηγή  Εμφιασμένο

24. Προέλευση πόσιμου νερού στα σχολεία/δουλειά:  δίκτυο ύδρευσης  Πηγή  Εμφιασμένο

25. Εκτέθηκαν στον ίδιο παράγοντα άλλα άτομα:  Αριθμός ατόμων:

26. Είχαν άλλα άτομα τα ίδια συμπτώματα:  Αριθμός ατόμων:

27. Ποια νομίζετε ότι ήταν η αιτία που ασθενήσατε:



**Παράρτημα ΙΙΙ-Οδηγίες για την ανίχνευση *E. coli* O157:H7 στα μικροβιολογικά εργαστήρια**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ  
Τηλ.2410565259  
Fax.2410565259

Το δείγμα των κοπράνων λαμβάνεται όσο το δυνατόν συντομότερα μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Προτιμότερο κόπρανα και όχι ορθικό στυλεό.

### **0 ημέρα**

Σε στείρο δοκιμαστικό σωλήνα με 5 ml στείρο φυσιολογικό ορό προσθέτω 1 – 2 g κοπράνων και ανακατεύω πολύ καλά.

Από αυτό εμβολιάζω με κρίκο σε ένα τρυβλίο με Sorbitol MacConkey Agar (SMAC), που είναι ανάλογο με το Mac Conkey άγαρ, αλλά αντί για λακτόζη περιέχει σορβιτόλη. Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) διαθέτουν πολλές εταιρείες θρεπτικών υποστρωμάτων και το ετοιμάζω σύμφωνα με τις οδηγίες του συγκεκριμένου Οίκου.

Το επιάζω σε επωαστικό κλίβανο 37°C για 24 ώρες.

### **1η ημέρα**

Αναζητώ τις άχρωμες αποικίες (αυτές που δεν ζύμωσαν τη σορβιτόλη).

Εάν αυτές είναι «καθαρές» (δηλαδή μεμονωμένες) προχωρώ όπως παρακάτω. Εάν δεν είναι «καθαρές» (δηλαδή δεν είναι μεμονωμένες), τις ανακαλλιεργώ σε άλλο τρυβλίο με Sorbitol MacConkey Agar (SMA), μέχρις ότου πάρω «καθαρές» (μεμονωμένες) αποικίες.

Εάν το Εργαστήριο διαθέτει το αντιδραστήριο *E.coli* O157 Latex Test (DR620M) του Οίκου OXOID, εξετάζω δύο – τρεις άχρωμες αποικίες εάν συγκολλούνται με αυτό το Latex της OXOID, ακολουθώντας τις εσωκλειστες οδηγίες. Εάν συγκολλούνται βάζω API 20E.

Εάν το Εργαστήριο δεν διαθέτει το αντιδραστήριο *E.coli* O157 Latex Test (DR620M) του οίκου OXOID, ελέγχω δύο – τρεις άχρωμες αποικίες του Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) βάζοντας API 20E.

### **2η ημέρα**

Εάν από τα αποτελέσματα του API 20E προκύπτει ότι το στέλεχος είναι *E.coli*, το ανακαλλιεργώ σε ένα τρυβλίο με Mac Conkey άγαρ, το επιάζω σε επωαστικό κλίβανο 37<sup>0</sup> C για 24h, το σφραγίζω καλά και το στέλνω το συντομότερο δυνατόν στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.





## **Παράρτημα IV- Κάρτα καταγραφής εργαστηριακών δειγμάτων**



## **Παράρτημα V- Ερωτηματολόγιο για *E. coli* O157:H7**

**Ερωτηματολόγιο για ασθενή από τον οποίο απομονώθηκε *E. coli* O157:H7**

**ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ**

- 1) Επώνυμο: Όνομα : Πατρώνυμο:
- 2) Διεύθυνση :
- 3) Πόλη:
- 4) Ημερομηνία Γέννησης...../...../..... Τύπος Ηλικίας : Ημέρες  Μήνες  Έτη
- 5) Φύλο: Α  Θ
- 6) Τηλ. Κατοικίας ..... Τηλ.Εργασίας.....

**7) Καταγωγή**

- Ελληνική
- Αλβανική
- Ρωσική
- Τσιγγάνικη
- Άλλο

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ**

- 8) Δείγμα  Κόπρανα σε βαμβακοφόρο στυλεό  Κόπρανα σε κύπελλο
- 9) Ημερομηνία συλλογής του δείγματος...../...../.....
- 10) Πιστοποιήθηκε η παρουσία του O157 αντιγόνου στο εργαστήριο αναφοράς:  
 Ναι  Όχι  Άγνωστο
- 11) Πιστοποιήθηκε η παρουσία του H7 αντιγόνου στο εργαστήριο αναφοράς:  
 Ναι  Όχι  Άγνωστο

12) Αυτό το κρούσμα αναφέρθηκε από:

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Νοσοκομείο      | <input type="checkbox"/> Παθολόγος/Γενικός Ιατρός/Παιδίατρος |
| <input type="checkbox"/> Εργαστήριο      | <input type="checkbox"/> Σχολείο                             |
| <input type="checkbox"/> Άλλο εργαστήριο | <input type="checkbox"/> Άλλο                                |

Εργαστήριο αναφοράς:

Τηλέφωνο:

Ιατρός εργαστηρίου αναφοράς:

Τηλέφωνο:

### ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

13) Ημερομηνία έναρξης συμπτωμάτων :...../...../.....  Άγνωστο

14) Ο ασθενής παρουσίασε (παρακαλώ σημειώστε απάντηση για το καθένα):

- |                            |                          |     |                          |     |                          |         |
|----------------------------|--------------------------|-----|--------------------------|-----|--------------------------|---------|
| Διάρροια                   | <input type="checkbox"/> | Ναι | <input type="checkbox"/> | Όχι | <input type="checkbox"/> | Άγνωστο |
| Ορατό αίμα στα κόπρανα     | <input type="checkbox"/> | Ναι | <input type="checkbox"/> | Όχι | <input type="checkbox"/> | Άγνωστο |
| Πυρετός (πάνω από 37,8 °C) | <input type="checkbox"/> | Ναι | <input type="checkbox"/> | Όχι | <input type="checkbox"/> | Άγνωστο |
| Κοιλιακό άλγος             | <input type="checkbox"/> | Ναι | <input type="checkbox"/> | Όχι | <input type="checkbox"/> | Άγνωστο |
| Ναυτία                     | <input type="checkbox"/> | Ναι | <input type="checkbox"/> | Όχι | <input type="checkbox"/> | Άγνωστο |
| Εμετός                     | <input type="checkbox"/> | Ναι | <input type="checkbox"/> | Όχι | <input type="checkbox"/> | Άγνωστο |
| Πονοκέφαλος                | <input type="checkbox"/> | Ναι | <input type="checkbox"/> | Όχι | <input type="checkbox"/> | Άγνωστο |
| Αδυναμία                   | <input type="checkbox"/> | Ναι | <input type="checkbox"/> | Όχι | <input type="checkbox"/> | Άγνωστο |
| Φρίκια/Ρίγος               | <input type="checkbox"/> | Ναι | <input type="checkbox"/> | Όχι | <input type="checkbox"/> | Άγνωστο |
| Άλλα.....                  |                          |     |                          |     |                          |         |

15) Μεταφέρθηκε ο ασθενής λόγω των συμπτωμάτων σου σε κάποιο νοσοκομείο;

- |                          |     |                          |     |                          |         |
|--------------------------|-----|--------------------------|-----|--------------------------|---------|
| <input type="checkbox"/> | Ναι | <input type="checkbox"/> | Όχι | <input type="checkbox"/> | Άγνωστο |
|--------------------------|-----|--------------------------|-----|--------------------------|---------|

**16) Ο ασθενής (παρακαλούμε απαντήστε για το καθένα χωριστά):**

Παρουσίασε Αιμολυτικό Ουραιμικό Σύνδρομο;  Ναι  Όχι  Άγνωστο  
(Α.Ο.Σ ορίζεται ως αναιμία, μειωμένα αιμοπετάλια (<150.000), νεφρική βλάβη)

Παρουσίασε Θρομβωτική Θρομβοπενική Παρφύρα;  
(Θ.Θ.Π ορίζεται ως αναιμία, μειωμένα αιμοπετάλια (<150.000), νεφρική βλάβη, διαταραχές από το Κ.Ν.Σ, πυρετός)

Ναι  Όχι  Άγνωστο

Υποβλήθηκε σε αιμοκάθαρση;  Ναι  Όχι  Άγνωστο

Έχασε ημέρες από την εργασία/σχολείο λόγω της ασθένειας;

Ναι  Όχι  Άγνωστο

Αν ναι, πόσες;.....

Πέθανε;  Ναι  Όχι  Άγνωστο

**ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ**

17) Ο ασθενής εργάζεται σε βρεφονηπιακό σταθμό;  Ναι  Όχι  Άγνωστο

Αν ναι, πού;.....

18) Ο ασθενής εργάζεται ως επαγγελματίας υγείας;  Ναι  Όχι  Άγνωστο

Αν ναι, πού;.....

19) Ο ασθενής εργάζεται ως χειριστής τροφίμων;  Ναι  Όχι  Άγνωστο

Αν ναι, πού;.....

**ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ**

20) Επτά ημέρες πριν την έναρξη των κλινικών εκδηλώσεων, ο ασθενής έφαγε ή ήπιε κάτι από τα ακόλουθα;

Ωμό (μη παστεριωμένο γάλα)  Ναι  Όχι  Άγνωστο

Άλλα, μη παστεριωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως τυριά, κρέμες, παγωτά

Ναι  Όχι  Άγνωστο

Φυσικούς χυμούς φρούτων  Ναι  Όχι  Άγνωστο

Ωμά λαχανικά (μαρούλια, ντομάτες, αγγούρια, πράσσα, καρότα, μαϊντανός, σέλινο, λάχανα)  Ναι  Όχι  Άγνωστο

Μπιφτέκι (μοσχαρίσιο, χοιρινό, κοτόπουλο)  Ναι  Όχι  Άγνωστο

Μπριζόλα (χοιρινή, μοσχαρίσια)  Ναι  Όχι  Άγνωστο

Παϊδάκια (αρνίσια, πρόβεια, κατσικίσια)  Ναι  Όχι  Άγνωστο

Κεμπάπ  Ναι  Όχι  Άγνωστο

Λουκάνικα χωριάτικα  Ναι  Όχι  Άγνωστο

Κρέας (μοσχάρι, χοιρινό, κοτόπουλο, πρόβειο, κατσικίσιο) μισοψημένο  Ναι  Όχι  Άγνωστο

Μη χλωριωμένο νερό  Ναι  Όχι  Άγνωστο

**21) Επτά ημέρες πριν την έναρξη των κλινικών εκδηλώσεων, ο ασθενής έφαγε σε:**

Ταβέρνα/Εστιατόριο  Ναι  Όχι  Άγνωστο

Fast-Food  Ναι  Όχι  Άγνωστο

Αλλού  Ναι  Όχι  Άγνωστο

Αν ναι, πού:.....

**22) Επτά ημέρες πριν την έναρξη των κλινικών εκδηλώσεων, ο ασθενής:**

Κολύπησε σε κολυμβητική δεξαμενή;  Ναι  Όχι  Άγνωστο

Κολύπησε σε κολυμβητικές ακτές;  Ναι  Όχι  Άγνωστο



Αν ναι, πού;.....

Επισκέφθηκε ή έμεινε σε αγροτική περιοχή;  Ναι  Όχι  Άγνωστο

Ήρθε σε επαφή με βοοειδή (αγελάδες ή μοσχάρια), χοίρους, αίγες, πρόβατα, κοτόπουλα;

Ναι  Όχι  Άγνωστο

Εργάζεται σε βρεφονηπιακό σταθμό;

Ναι  Όχι  Άγνωστο

Άλλαξε πάνες σε μικρό παιδί;

Ναι  Όχι  Άγνωστο

Ταξίδεψε σε άλλη χώρα;

Ναι  Όχι  Άγνωστο

Αν ναι, πού;.....

Ταξίδεψε σε άλλη περιοχή στην Ελλάδα;

Ναι  Όχι  Άγνωστο

Αν ναι, πού;.....

Μεταχειρίστηκε ή ετοίμασε ωμά λαχανικά και ειδικότερα λαχανικά που έρχονται σε επαφή με το έδαφος (παντζάρια, καρώτα, μαρούλια, λάχανα)

Ναι  Όχι  Άγνωστο

Συνηθίζει να δαγκώνει τα χέρια του, τα νύχια του ή να πιπιλίζει τον αντίχειρα;

Ναι  Όχι  Άγνωστο

**23) Το κρούσμα αυτό αποτελεί μέρος επιδημίας (δυο ή περισσότερα κρούσματα με λοίμωξη από E.coli 0157:H7 τα οποία αλληλοσχετίζονται σε χρόνο και σε τόπο);**

Ναι  Όχι  Άγνωστο

Αν ναι,  
περιγράψτε:.....

**24) Παρουσίασε κάποιος από τους οικείους του ασθενούς διάρροια εφτά ημέρες πριν από την έναρξη των κλινικών εκδηλώσεων του ασθενούς;**

Ναι  Όχι  Άγνωστο

Αν ναι, παρακαλώ καταγράψτε τις παρακάτω πληροφορίες για αυτά τα άτομα:

Βαθμός συγγένειας:.....

Ηλικία:.....

Φύλο:.....

Αιματηρά κόπρανα:  Ναι  Όχι  Άγνωστο

**25) Γνωρίζει ο ασθενής κάποιον άλλον που να παρουσίασε παρόμοια κλινική εικόνα με τη δική του τις τελευταίες τρεις εβδομάδες;**

Ναι  Όχι  Άγνωστο

**Αν ναι, παρακαλώ καταγράψτε τα ονόματα και τους αριθμούς τηλεφώνου των ατόμων με παρόμοια κλινική εικόνα:**

1) Ονοματεπώνυμο:.....

Τηλέφωνο:.....

2) Ονοματεπώνυμο:.....

Τηλέφωνο:.....

**26) Εξέλιξη Νόσου**

Επιβίωση

Θάνατος

Άγνωστο

## ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑ

Πήρε κάποιο φάρμακο;  Ναι  Όχι  Άλλο

Αν άλλο, τι:.....

Πότε ξεκίνησαν τα συμπτώματα; Ημερομηνία:...../...../.....  
Ωρα:.....

Πόσο διήρκησαν τα συμπτώματα; Ώρες:..... Ημέρες:.....

Επισκέφτηκε ιατρό;  Ναι  Όχι  
Όνομα ιατρού:.....

Νοσηλεύτηκε;  Ναι  Όχι  
Νοσοκομείο:.....

Υποφέρει από επιπλοκές;  Ναι  Όχι

## ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

Φυσική εξέταση (πυρετός, κοιλιακή ευαισθησία, μακροσκοπική αιμορραγία στα κόπρανα)

Εργαστηριακές εξετάσεις (αίμα στα κόπρανα, λευκά αιμοσφαίρια στα κόπρανα, >10000 λευκά αιμοσφαίρια στο αίμα)

## **Παράρτημα VI- Ερωτηματολόγιο για τροφιμογενή νοσήματα**

## ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

### ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ

1. α)Επώνυμο:.....β)Όνομα.....
2. Ηλικία: α)Ημέρες:...β)Μήνες.....γ)Έτη..... 3. Φύλο  Α  Θ
4. α)Νομός:.....β)Πόλη/χωριό:.....γ)Διεύθυνση:.....
- δ)Ταχυδρομικός κώδικας:.....ε)Τηλ..... ζ) Επάγγελμα:.....
- η) Καταγωγή: Ελληνική  Αλβανική  Ρωσική
- Τσιγγάνικη  Πομάκος  Άλλο

Αν άλλο, προσδιόρισε:.....

### ΙΣΤΟΡΙΚΟ – ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

5. Πότε ξεκίνησαν τα συμπτώματα; α)Ημερομηνία...../...../..... β)Ωρα:.....
6. Πόσο διήρκεσαν τα συμπτώματα; .....α) ημέρες ..... β) ώρες
7. Αριθμός διαρροϊκών κενώσεων/ημέρα;.....
8. Αριθμός εμέτων/ημέρα;.....
9. Ποια από τα παρακάτω συμπτώματα εμφανίσατε;
- |                        |                              |                              |                                      |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| α)Διάρροια             | <input type="checkbox"/> Ναι | <input type="checkbox"/> Όχι | <input type="checkbox"/> Δεν θυμάμαι |
| β)Αιμορραγική Διάρροια | <input type="checkbox"/> Ναι | <input type="checkbox"/> Όχι | <input type="checkbox"/> Δεν θυμάμαι |
| γ)Πυρετός              | <input type="checkbox"/> Ναι | <input type="checkbox"/> Όχι | <input type="checkbox"/> Δεν θυμάμαι |
| δ)Κοιλιακό Άλγος       | <input type="checkbox"/> Ναι | <input type="checkbox"/> Όχι | <input type="checkbox"/> Δεν θυμάμαι |
| ε)Ναυτία               | <input type="checkbox"/> Ναι | <input type="checkbox"/> Όχι | <input type="checkbox"/> Δεν θυμάμαι |

ζ)Εμετός  Ναι  Όχι  Δεν θυμάμαι

η)Πονοκέφαλος  Ναι  Όχι  Δεν θυμάμαι

### ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ- ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΕΚΘΕΣΗΣ

10) Συμμετείχατε σε κοινό γεύμα;  Ναι  Όχι  Δεν γνωρίζω

11) Ημερομηνία ύποπτου γεύματος ...../...../.....

Απαντήστε μόνο για τρόφιμα που καταναλώθηκαν ή δραστηριότητες που πραγματοποιήσατε την προηγούμενη εβδομάδα

Υποπτο τρόφιμο ή ποτό	Νομός	Πόλη/χωριό	Ημερομηνία	Ωρα

12. α) Ταξιδέψατε σε κάποια ξένη χώρα;  Ναι  Όχι

Αν ναι, διευκρινίστε β) ημερομηνία (εξ) και γ) περιοχή(εξ).....

13. α) Πραγματοποιήσατε καμία εξωτερική δραστηριότητα (π.χ κατασκήνωση)  Ναι  Όχι

Αν ναι, διευκρινίστε β) ημερομηνία (εξ) και γ) περιοχή(εξ).....

14. α)Είχατε επαφή με ζώα/κατοικίδια;  Ναι  Όχι

Αν ναι, β)προσδιορίστε.....

15. Προέλευση πόσιμου νερού στο σπίτι:

Δίκτυο ύδρευσης  Πηγή  Εμφιαλωμένο

16. Προέλευση πόσιμου νερού στο σχολείο/δουλειά:

Δίκτυο ύδρευσης  Πηγή  Εμφιαλωμένο

17. α)Εκτέθηκαν στον ίδιο παράγοντα άλλα άτομα;

Ναι  Όχι β)Αρ.ατόμων:

18. α)Είχαν άλλα άτομα τα ίδια συμπτώματα;

Ναι  Όχι β)Αρ. ατόμων:

19. Ποια νομίζετε ότι ήταν η αιτία που ασθενήσατε;.....

.....  
.....  
.....

## **Παράρτημα VII- Ερωτηματολόγιο για τα ζώα-ξενιστές**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**Τηλ.2410565259**  
**Fax.2410565259**

**ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΓΙΑ ΤΑ ΖΩΑ – ΞΕΝΙΣΤΕΣ**

**ΚΩΔΙΚΟΣ ΖΩΟΥ:**  
**ΚΩΔΙΚΟΣ ΦΥΛΑΞΗΣ/ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ:**  
**ΑΡ. ΜΗΤΡΩΟΥ ΖΩΟΥ:**

1. Είδος Ζώου: Βοοειδές  Πρόβατο  Αίγα  Χοίρος  Όρνιθες

2. Ηλικία Ζώου: Έτη:..... Μήνες:..... Ημέρες:.....

3. Φύλο: Αρσενικό  Θηλυκό

4. Φυλή:.....

5. Παραγωγική κατεύθυνση του ζώου: Γαλακτοπαραγωγή   
Κρεατοπαραγωγή   
Ωοπαραγωγή   
Άλλο

Αν άλλο, τι;.....

6. Διατροφή: Τυποποιημένη  Ελευθέρως βοσκής  Άλλο

Αν άλλο, τι;.....

7. Συνθήκες σταβλισμού: Κοπάδι  Μεμονωμένα

8. Μέγεθος κοπαδιού ( Αρ. ζώων ) :.....

**9. Περιοχή προέλευσης του ζώου:**

Λάρισα

Βόλος

Τρίκαλα

Καρδίτσα

**10. Τόπος της εκμετάλλευσης:**

Νομός:.....

Πόλη / χωριό:.....