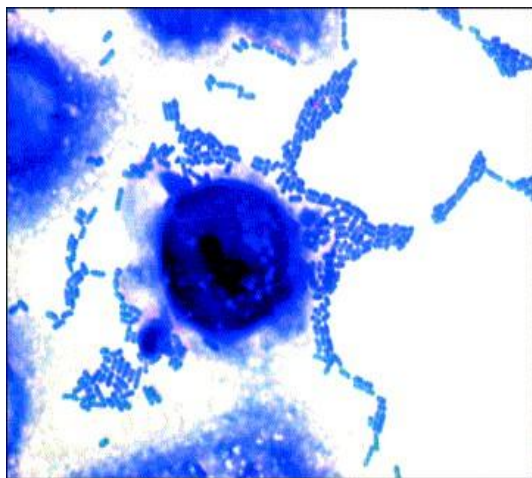


EPIDEMIOLOGI OG PATOLOGISK SIGNIFIKANS AF ENTEROAGGREGATIV *E. COLI*



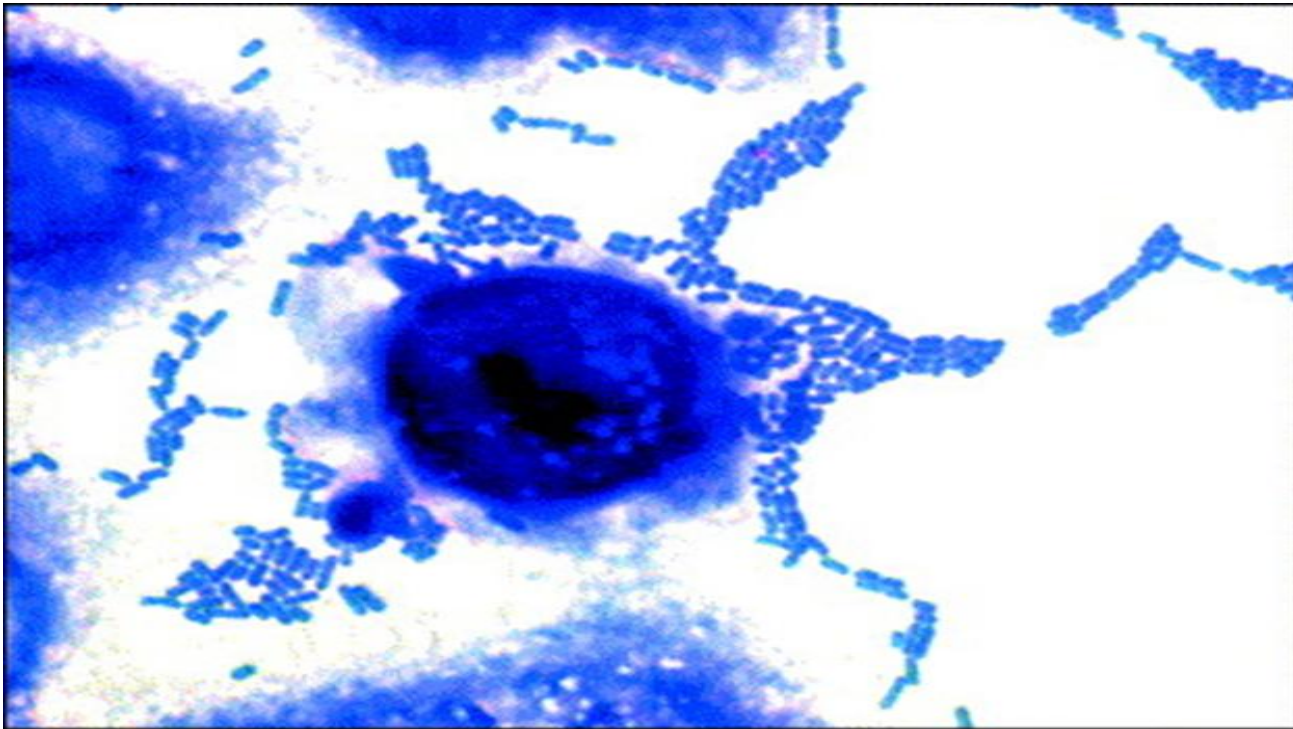
Betina Hebbelstrup Jensen
Statens Serum Institut,
Afdeling for Mikrobiologi og Infektions kontrol

Vejledere:
Karen Angeliki Krogfelt
Andreas Munk Petersen
Katharina E. P. Olsen

- **EAEC observeres første gang i 1987 i et studie af Professor Nataro et. al.**
- **Isolatet stammede fra en peruviansk dreng med diarre**
- **Bakterien blev kendetegnet ved det typiske ”brick-layer” mønster.**
- **Mønsteret opstår ved dyrkning af enteroaggregative *E.coli* på HEp-2 celler.**
- **Denne mønstergenkendelse er fortsat ”gold standard” til diagnostik af bakterien.**



EAEC dyrket på HEp-2 celler med "brick-layer" mønster.



Kilde:

Enterotoxigenic Escherichia coli.

Okeke, I N; Nataro, J P (2001)

The Lancet infectious diseases vol. 1 (5) p. 304-13

- Det aggregative mønster (AA) er associeret med en 60 mDa plasmid.
- Plasmidet bærer adskillelige virulensfaktorer og fimbriae.
- EAEC stammer bærende *aggR* genet anses for at være typiske EAEC.
- *AggR* genet øger transskriptionen af fimbriaerne og andre EAEC virulens gener.
- Der er fundet dosisrespons ved kvantitativ PCR ved anvendelse af *aggR* primer.

- ❖ **Dispersin er et hydrofobt overflade protein som ændrer de elektrokemiske egenskaber på overfladen af bakterien.**
- ❖ **Det negativt ladede LPS lag på EAEC og de positive ladede fimbriae tenderer til agglutination.**
- ❖ **Dispersin faciliterer fimbriaernes evne til at skyde ud fra bakterien og får denne til at adhærere til andre bakterier og tarmepitelet.**
- ❖ **Dispersin er immunogent selvom forhøjede antistofniveauer ikke beskyttede amerikanske studerende på rejse i Mexico.**



Scanningelektron mikroskopisk billede af EAEC.

**Kilde:**

Sheikh, J., Czeczulin, J.R., Harrington, S., Hicks, S., Henderson, I.R., Le Bouguéneq, C., *et al.* (2002). A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Invest* **110**, 1329-1337.

- ❖ Fire typer af fimbriae er fundet – AAF/I - AAF/IV.
- ❖ Disse fimbriae binder til komponenter i den extracellulære matrix herunder laminin, kollagen type IV og fibronectin.
- ❖ Fimbriae er essentielle for bakteriens evne til adhærence og dannelse af biofilm



Kilde:

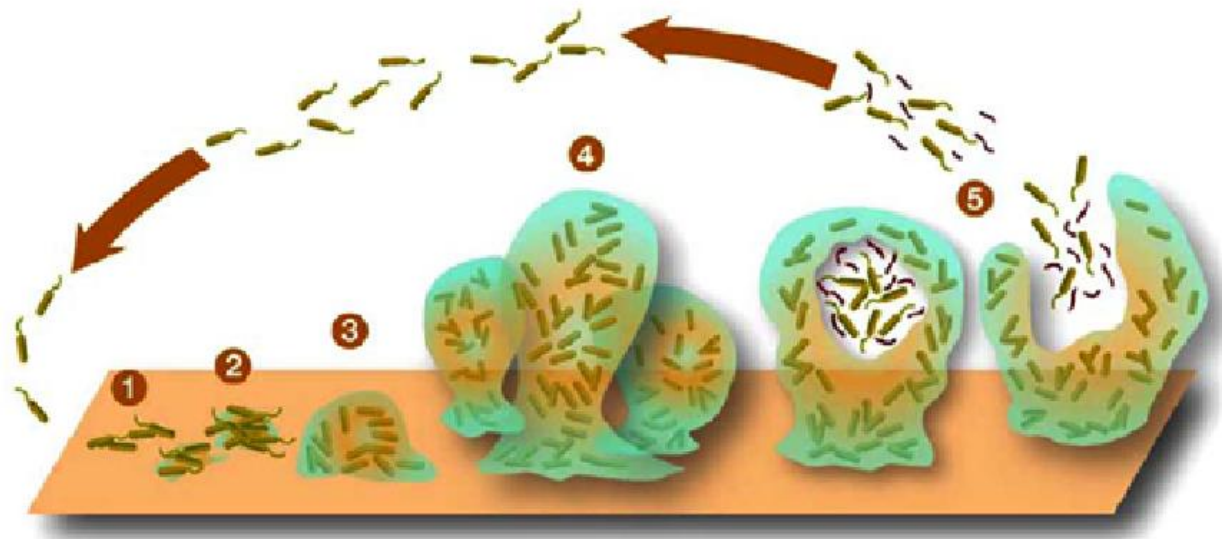
<http://mgm.ufl.edu/faculty/faculty-home-pages/giron-jorge-a/>

- ❖ Fæcesprøver med påvist EAEC har forhøjet leukocytter, lactoferrin, IL-1 β , IL-8.
- ❖ Patienter med SNPs i IL-8 genet har udvist større tendens til diarre ved EAEC infektion, desuden mere udtalt fækal leukocytose.
- ❖ Det inflammatoriske respons i tarmen er set at være afhængig af blandt andet bakteriens fimbriae.
- ❖ Manifestation af diarre grundet EAEC er antaget at være afhængig af værtsfaktorer



Transmission med EAEC følges af:

- 1) Initial adhærence til tarmmucosa
- 2) Dannelse af biofilm
- 3) Frigivelse af toxiner forårsager et inflammatorisk respons i tarmen.



- **EAEC stammerne udviser betydelig heterogenicitet.**
- **PCR med anvendelse af forskellige kombinationer af primers anvendt til diagnostik af EAEC.**
- **Endnu findes ingen global konsensus om hvilken kombination af primers, der er HEp-2 celleassay overlegen.**
- **Der er ingen konsensus om hvilke stammer er der "true pathogenic"**



Liste over PCR primers anvendt til diagnose af EAEC

aggR – transcription activators for AAF/I and AAF/II,

aggA – fimbrial subunit encoding AAF/I,

astA - Aggregative heat-stabile toxin 1 EAST1,

aap - anti-aggregation protein dispersin,

afaD – invasin,

aaf – encoding subunit of AAF/II,

aatA – ABC transporter

aaiC – type VI secretion system

aspU – dispersin surface coat protein,

Cdt – cytodetaching toxin,

fyuA – genes involved in iron sequestration,

hda – adhesion,

hly – haemolysin,

hra1 + 2 heat resistant agglutinin,

ipaH – invasin,

irp2 – yersina biosynthesis gene,

Pet – plasmid encoding toxin,

pic – protein involved in colonization,

ShET /*set* - Shigella enterotoxin1,

tia – gene product protein important for invasion,



PCR diagnostik af EAEC

Kontrol stammer

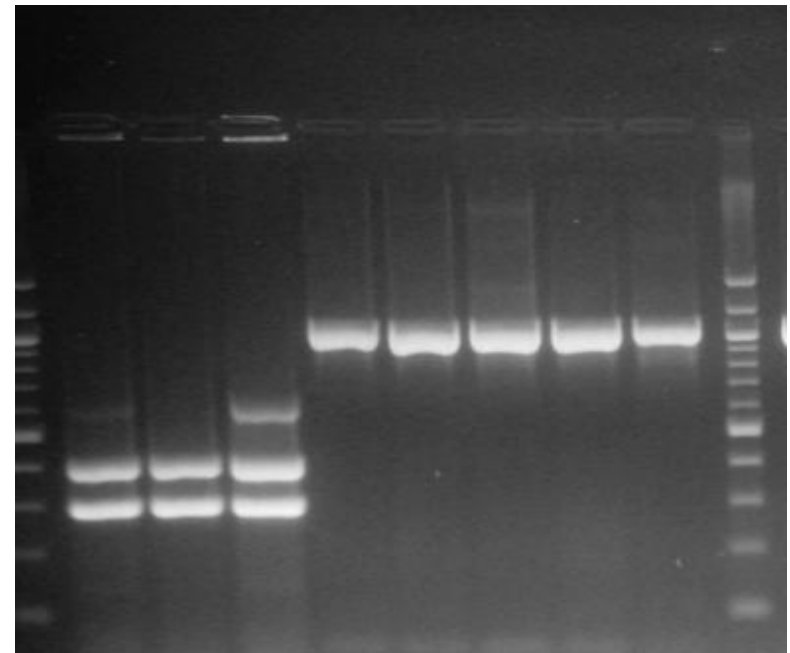
❖ I – O42

❖ II – JM221

❖ III – C1010


I II III

aatA
aggR
aaiC



- ❖ ***AggR*** – anses for at være ”the major regulon”
- ❖ ***AaiC*** genet er et kromosomalt gen, en del af en type VI transportersystem, involveret i dannelsen af biofilm
- ❖ ***aatA*** faciliterer transporten af dispersin på bakteriens overflade og er en del af et ABC transportersystem.
- ❖ Disse 3 gensekvenser anses for at være så konserverede at en diagnostisk for EAEC

- ❖ I 1995 foretager Nataro et al. et voluntørstudie, hvor deltagerne indtager 4 forskellige EAEC stammer.
- ❖ Kun den ene stamme forårsager diarre hos 3 ud af 4 deltagere.
- ❖ Stammen kaldes 042 og er siden studiet anset for prototype stammen.
- ❖ Stammen er sidenhen fundet at være i stand til dannelse af ekstensiv biofilm.

- Initialt ansås EAEC for at være opportunistisk patogen.
 - EAEC blev associeret med diarre hos HIV patienter, patienter med nedsat immunforsvar og småbørn fra udviklingslandene.
 - Senere studier associerede EAEC med rejsediarre.
 - Aktuelt ses studier, hvor EAEC sammenkædes med samfundserhvervede diarreepisoder i den vestlige verden.
- 

- ❖ **Pilotstudier pegede på association mellem EAEC og colon irritable.**
- ❖ **Nyere studier med større patient population har afvist denne sammenhæng.**
- ❖ **Et enkelt studie har fundet EAEC i større antal hos patienter med Colitis Ulcerosa sammenlignet med patienter med Morbus Crohn.**
- ❖ **Aktuelt sammenkædes diarree og EAEC med alle patienter uanset immunstatus eller anden co-morbiditet**

- ❖ **I case-kontrol studier ses højt antal af raske smittebærere.**
- ❖ **Det høje antal af raske smittebærere antages at skyldes erhvervet immunitet grundet manglende hygiejne i udviklingslandene.**
- ❖ **Dog ses også et betydeligt antal af raske smittebærere i case-kontrol studier foretaget i den vestlige verden.**
- ❖ **Disponerende værtsfaktorer for sygdomsmanifestation er uafklaret.**

- I foråret 2011 sås udbrud med VTEC I Tyskland.
- VTEC udbrud stammen O:104:H:4 forårsagede 54 dødsfald og talrige tilfælde af hæmolytisk uræmisk syndrom – HUS.
- The EAEC stammen havde optaget en profag kodende for verocytotoxinet *vtx2*.
- EAEC stammer bærer sædvanligvis ikke verocytotoxinet og er ikke associeret med HUS og kun sjældent med blodig diarre.

Manifestation of kliniske symptomer efter infektion med EAEC

- Vandig diarre
- Mucoïd diarre
- Subfebrilia > 38°C
- Kvalme
- Anoreksi
- Borborygmi
- Tenesmi
- Vægttab
- Persisterende diarre





❖ **Ph.d studiet vil omfatte 3 delprojekter**

❖ **Børnekoorte**

❖ **Case-kontrol studie**

❖ **Komparativt studie**



- ❖ **Kohorte studie med 200 børn i alderen 0-6 år i 36 daginstitutioner i Københavns omegn i en 1-årig periode.**
- ❖ **Fæcesprøver fra børnene sendes ind hver anden måned**
- ❖ **Spørgeskema udfyldes af forældre i tilslutning til prøveindsendelse.**
- ❖ **Registrering af mulige risiko faktorer for transmission af EAEC.**

- **Fæcesprøverne testes for patogene bakterier, virus samt parasitter**
- **Prævalens af EAEC i danske daginstitutioner**
- **Langtidsudskillelse af EAEC hos børn vil blive undersøgt**



- ❖ **Børnekoorten udgør den raske kontrol gruppe**
- ❖ **Case gruppen udgøres af børn med EAEC positive fæcesprøver samt diarre**
- ❖ **200 interviews med forældrene til de EAEC positive børn**
- ❖ **Forskelle i eksponering, antropometriske mål, brug af antibiotika.**

- ❖ **Sammenligning af EAEC stammer ved PCR mellem case og kontrol grupper.**
- ❖ **EAEC som årsag til diarre hos små børn vil blive undersøgt**
- ❖ **Nedsat trivsel og vægttab på grund af EAEC infektion hos danske børn vil blive undersøgt.**



- **200 interviews med voksne med diarre og EAEC sammenlignes med 200 voksne med co-infection.**
- **Risiko for EAEC infektion belyses – rejse, fødevarer indtag, risikoerhverv ect.**
- **Gastrointestiale symptomer fra patienter med EAEC sammenlignes med patienter inficeret med etablerede tarmpatogene mikroorganismer.**
- **Sammenligning af EAEC stammer hos patienter med persisterende diarre og patienter med akut diarre ved anvendelse af PCR**

- ❖ **Undersøge forekomsten af EAEC i Danmark**
- ❖ **Er EAEC en hidtil ikke diagnosticeret årsag til diarre?**
- ❖ **Hvilke EAEC stammer er særligt patogene i den danske befolkning**
- ❖ **Er EAEC en mulig årsag til persisterende diarre hos små børn?**





❖ Vejledere

Karen Krogfelt

Andreas Munk Petersen

Katharina E. P. Olsen

Samarbejdspartnere

Dennis Röser, Henrik Vedel, Bente Utoft, Alice Friis-Møller, Søren Persson, Jørgen Engberg, Susanne Schjørring, Steen Ethelberg, Lee O'Brian, Steffen Jørgensen, Rie Jønsson, Susanne Jespersen, Ovidiu Maldovan, Hengameh Mirsapasi.