

Intestinální patotypy *E. coli* a shigely

Doc. MUDr. Martina Bielaszewska, CSc.

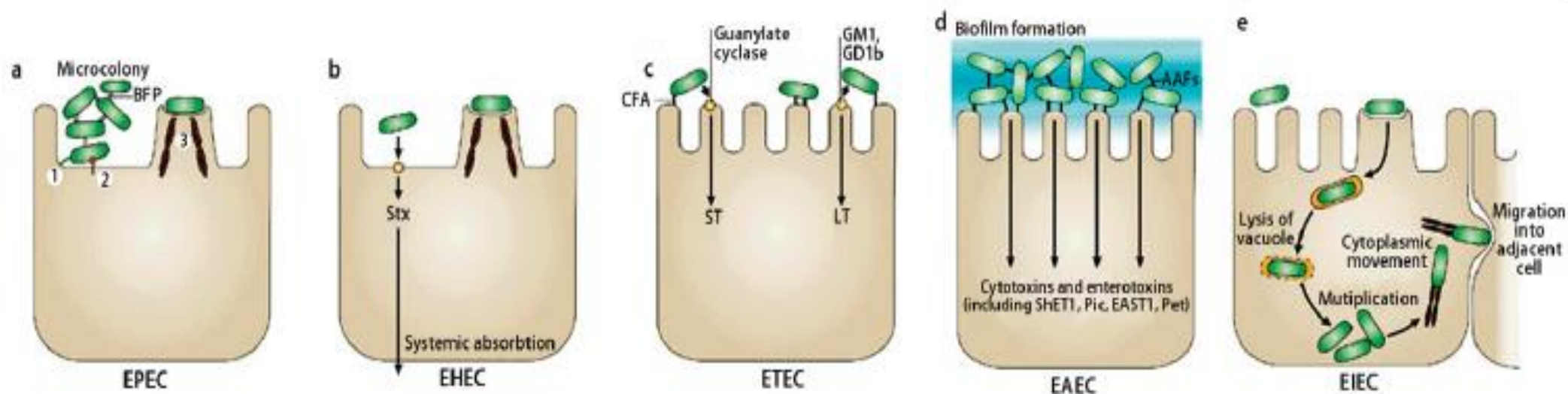
**Národní referenční laboratoř pro *E. coli* a shigely
Státní zdravotní ústav, Praha**

Escherichia coli

- První popis: Theodor Escherich v r. 1886 – bakterie kolonizující střevo novorozenců po porodu
=> *Bacterium coli commune*
- V r. 1919 přejmenována na *Escherichia coli*
- Významná součást fyziologické střevní mikroflóry (syntéza vitamínu K, udržování střevní rovnováhy, atd.)
- První důkaz patogenity: nozokomiální epidemie průjmu na novorozeneckých a kojeneckých odděleních v zemích západní Evropy ve 40. a 50. letech 20. století – těžký průběh, dehydratace, vysoká mortalita (> 50%)
- Ve stolicích nemocných dětí žádný známý patogén, pouze *E. coli*
 - Kmeny *E. coli* od dětí s průjmem odlišné (biochemicky a antigeně) od kmenů od zdravých dětí
 - epidemické kmeny z různých zemí stejné či velmi podobné => určité séroskupiny (O111, O55)
=> Hypotéza: tyto kmeny byly původci epidemií
- *E. coli* vyvolává nejen průjem, ale i mimostřevní onemocnění (IMC, meningitida, sepse)

Patotypy střevně patogenních *E. coli*

- Enteropatogenní *E. coli* (EPEC)
 - Shiga toxin-produkující *E. coli* (STEC) – synonymum: Verotoxin-produkující *E. coli* (VTEC)
=> **STEC patogenní pro člověka označovány enterohemoragické *E. coli* (EHEC)**
 - Enterotoxigenní *E. coli* (ETEC)
 - Enteroagregativní *E. coli* (EAEC)
 - Enteroinvazivní *E. coli* (EIEC)
- ❖ **Liší se faktory virulence, mechanismem interakce se střevním epitelem, séroskupinami**



Enteropatogenní *E. coli* (EPEC)

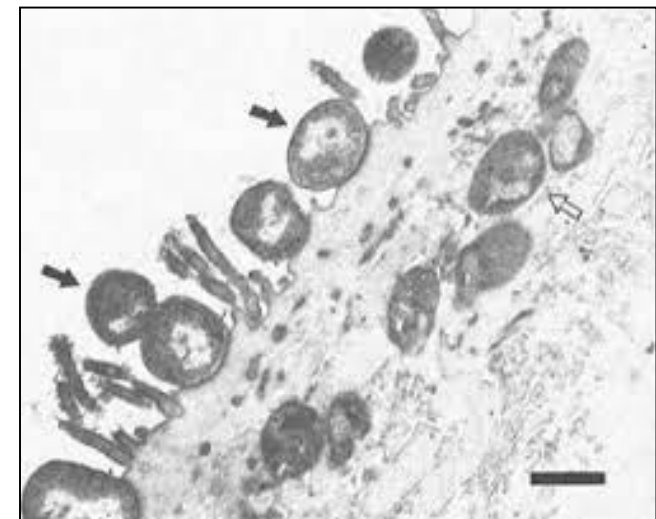
- První identifikovaný patotyp diarhogenních *E. coli*
=> původci rozsáhlých epidemií kojeneckých průjmů v Evropě ve 40. a 50. letech 20. století
 - Poslední skupina, u které byl identifikován mechanismus enteropatogenity!
 - EPEC neprodukují enterotoxiny
 - Nejsou enteroinvazivní
- => Pochybnosti o enteropatogenitě !!!

Pathogenesis of *Escherichia coli* Gastroenteritis in Man — Another Mechanism

Martin H. Ulshen, M.D., and John L. Rollo, M.D.

New England Journal of Medicine 1980; 302:99-101

- Specifický EM nález na sliznici tenkého střeva



EPEC

➤ Faktory virulence – kódovány na ostrovu patogenity LEE

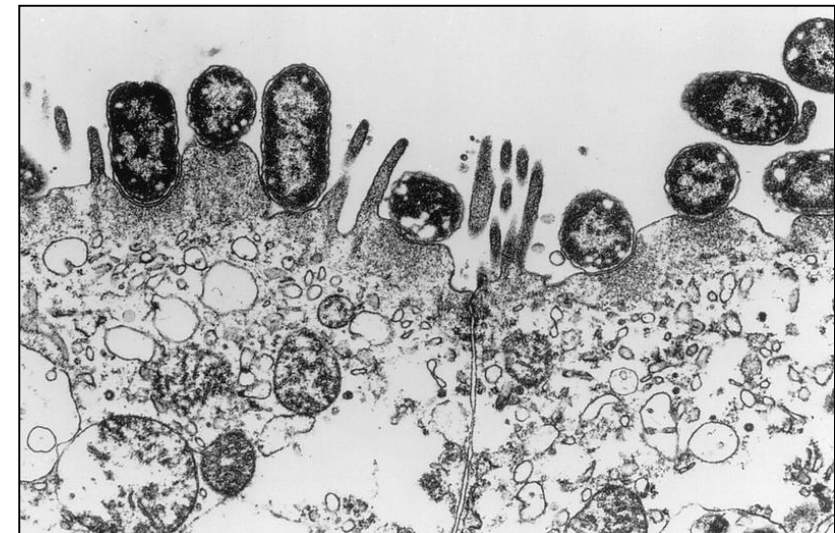
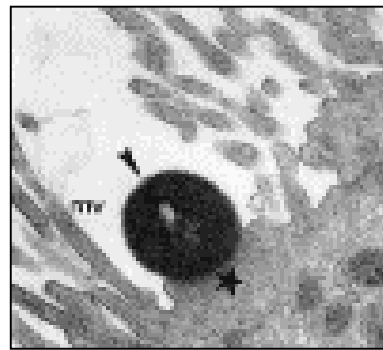
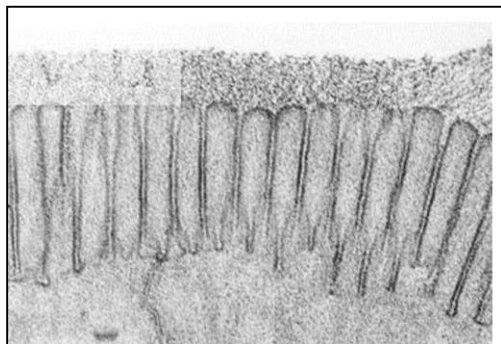
(locus of enterocyte effacement):

- Adheziny: intimin
- Tir = translokovaný receptor intiminu
- Sekreční systém typu 3 (TTSS)
- Cytotoxické efektorové proteiny

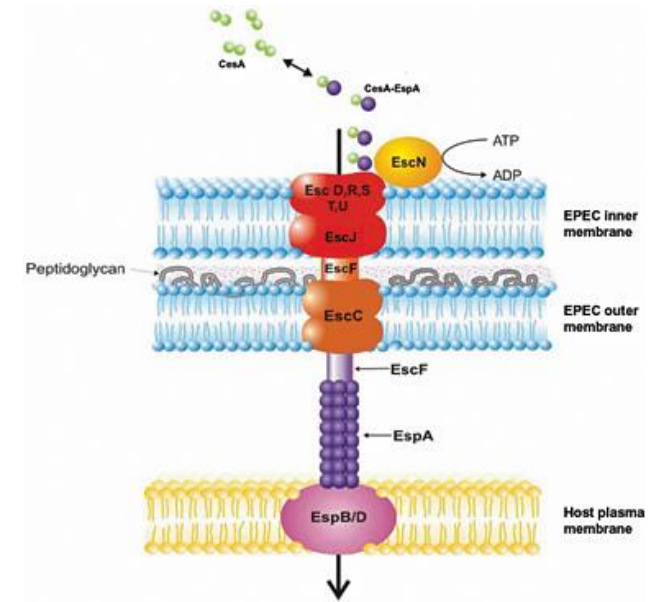
➤ Patogeneze

- Těsná adherence EPEC k enterocytům tenkého střeva (intimin – Tir)
- „Injekce“ cytotoxických efektor. proteinů do buněk via TTSS
=> reorganizace cytoskeletonu, tvorba pedestalů, k nimž EPEC adherují
=> poškození až destrukce mikrokloků
= “attaching effacing (A/E) lesions“

=> Poškození resorpčního epitelu => vodnatý průjem



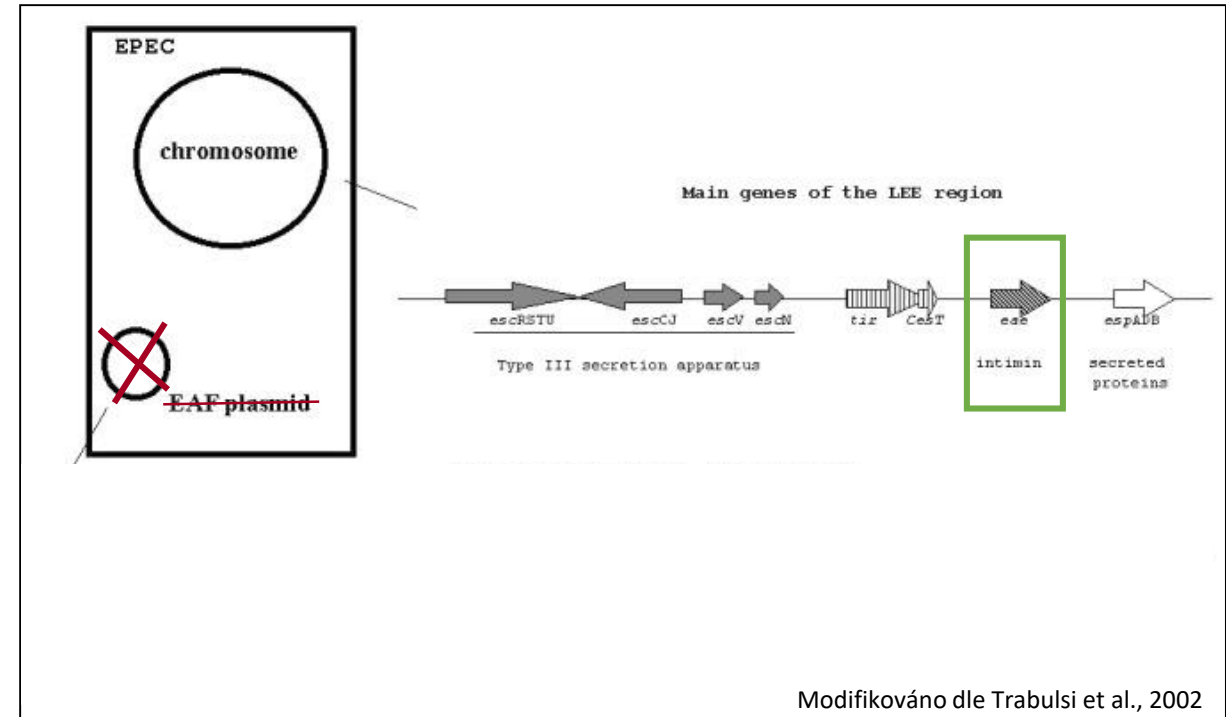
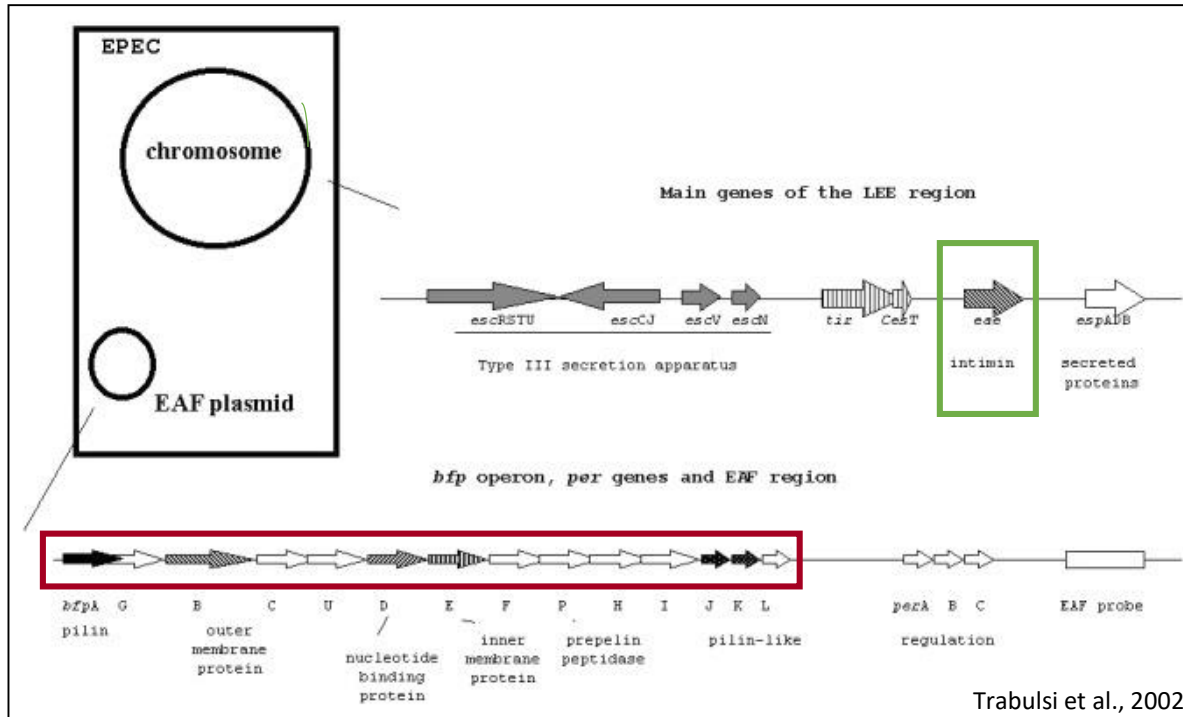
A/E lesions; Nataro and Kaper, 1998



EPEC TTSS. Natalie Strynadka, Howard Hughes Medical Institute

Resorpční epitel zdravého TS => normální mikroklokky Resorp. epitel infekce EPEC => destrukce mikrokloků

Typické vs. atypické EPEC



Typické EPEC

- **Chromosom - ostrov patogenity LEE** (locus of enterocyte effacement): Intimin (hlavní adhezin EPEC), Tir (translokovaný receptor intiminu), sekreční systém typu III (TTSS), efektorové proteiny
- **Plazmid EAF** (EPEC adherence factor): bundle-forming pilli - adhezin
- **Výskyt:** rozvojové země teplého pásma, průměrně u dětí < 1 rok
- **Rezervoár a zdroj infekce:** člověk
- **Přenos:** Fekálně-orální člověk-člověka (matka-dítě), kont. kojen. strava
- **Sérotypy:** O55:H6, O111:H2, O114:H2, O119:H6, O127:H6, O142:H6

Atypické EPEC

- **Chromosom - ostrov patogenity LEE:** Intimin, Tir, sekreční systém typu III, efektorové proteiny
- **Plazmid EAF CHYBÍ**
- **Výskyt:** rozvinuté země mírného pásma, průměrně u dětí < 2 let
rozvojové země teplého pásma
- **Rezervoár:** zvířata (domácí – dobytek)
- **Přenos:** Kontaminované potraviny, voda, přímý kontakt
- **Sérotypy:** O26:H11, O55:H7, O111:H8, O119:H2, O125:H6, O128:H2

Mikrobiologická diagnostika EPEC

Materiál: stolice - rektální výtěr

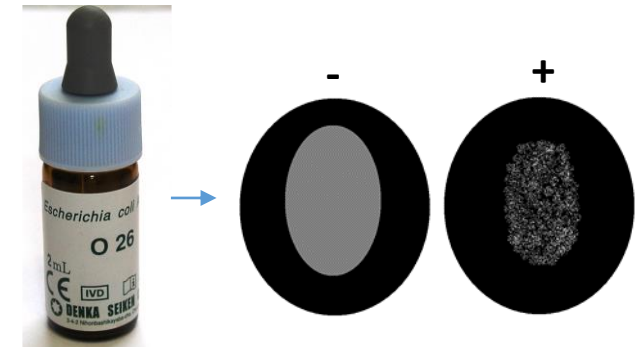


➤ Kultivace

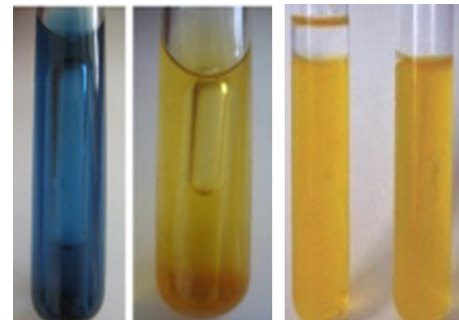
- Krevní agar (nehemolytické)
- Endo, MacConkey agar – většinou laktóza-fermentující (ružové kolonie) => nelze odlišit od fyziol. střevní flóry

➤ Identifikace

- Screening kolonií EPEC sérotypizací (sklíčková aglutinace)
 - nejčastější séroskupiny O26, O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O142
 - => **Provádí se povinně u dětí do 2 let!**



- Potvrzení druhu *E. coli*
 - Biochemické testy

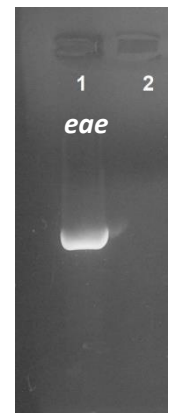


Zkumavkové testy



API systém Biomérieux

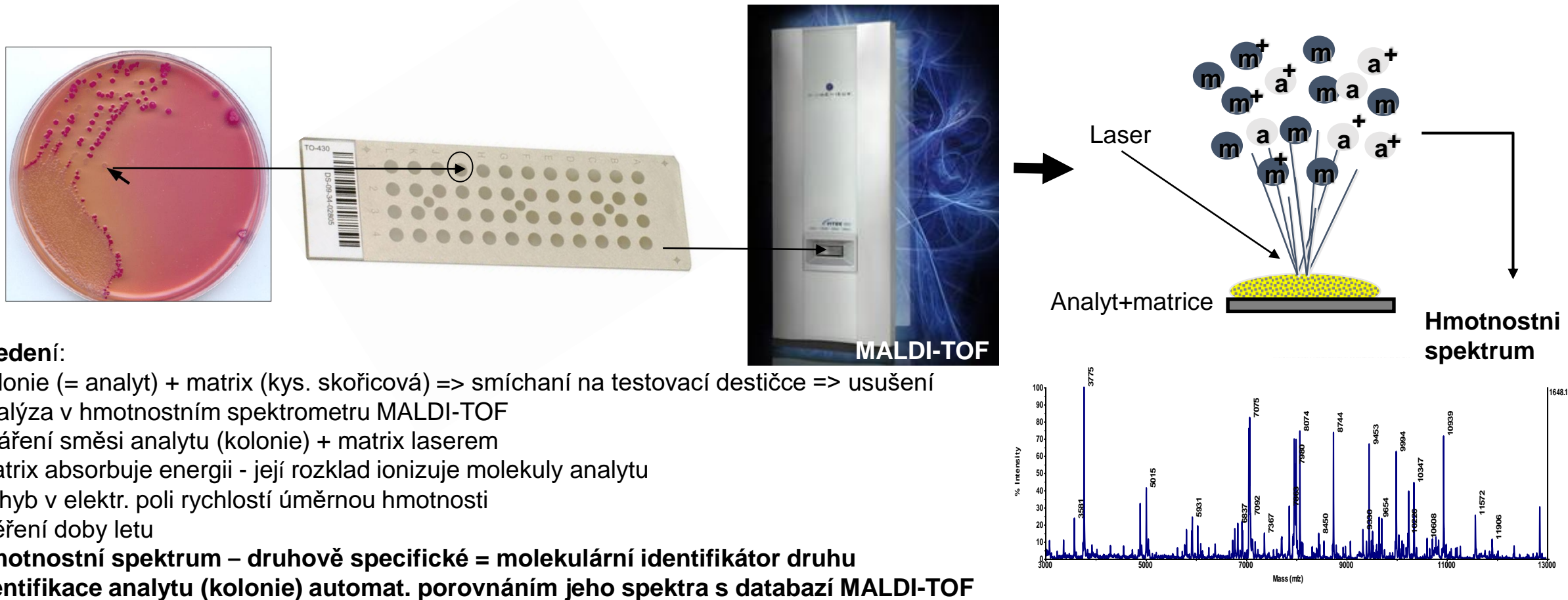
- MALDI-TOF



- U susp. kolonií EPEC průkaz *eae* genu kódujícího intimin pomocí PCR (NRL pro *E. coli* a shigely)

MALDI-TOF

- **MALDI-TOF** (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) = **hmotnostní spektrometrie** – identifikace bakterií dle hmotnostního spektra proteinů
Rychlá a vysoce přesná metoda na určení druhu – testují se kolonie rovnou z primokultury na pevné půdě
=> výsledek během MINUT => extrémní urychlení dg a tím možnost zahájení cílené terapie!
Nejvýznamnější pokrok v mikrobiologii za posledních 35 let!

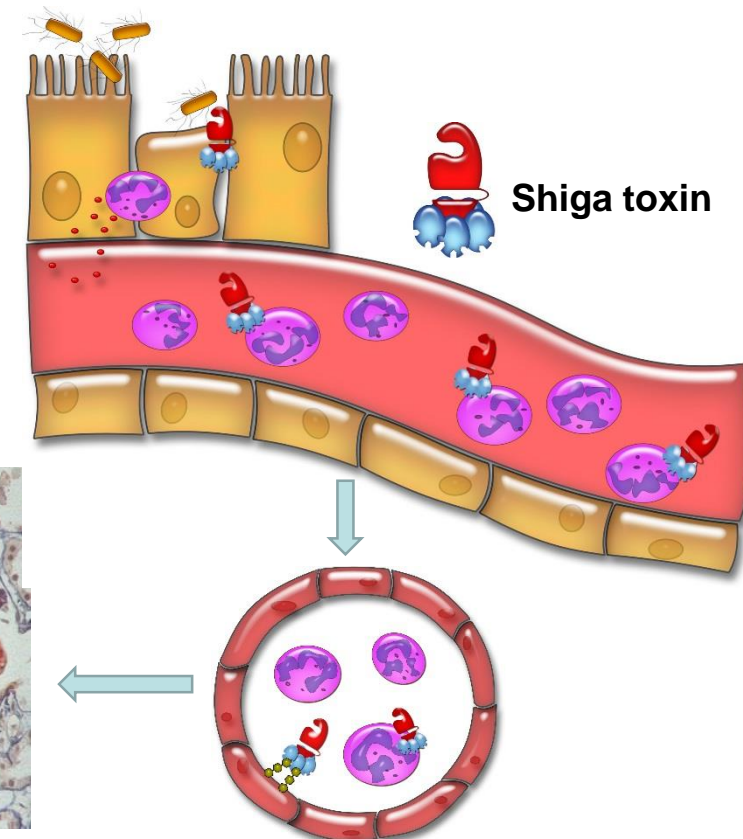
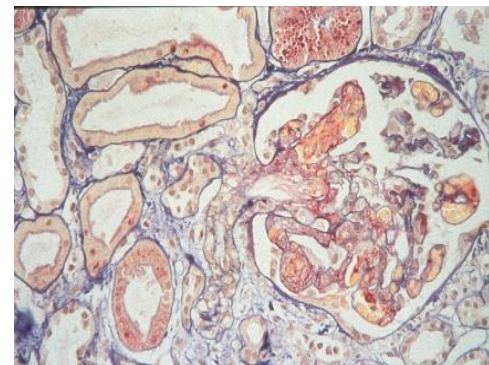


Provedení:

1. Kolonie (= analyt) + matrix (kys. skořicová) => smíchaní na testovací destičce => usušení
2. Analýza v hmotnostním spektrometru MALDI-TOF
=> ozáření směsi analytu (kolonie) + matrix laserem
=> matrix absorbuje energii - její rozklad ionizuje molekuly analytu
=> pohyb v elektr. poli rychlostí úměrnou hmotnosti
=> měření doby letu
=> **hmotnostní spektrum – druhově specifické = molekulární identifikátor druhu**
3. Identifikace analytu (kolonie) automat. porovnáním jeho spektra s databází MALDI-TOF

Enterohemoragické *Escherichia coli* (EHEC)

- **Nejzávažnější skupina diarhogenních *E. coli* – průjem i celkové onemocnění!**
- **Výskyt: celosvětový** (rozvinuté i rozvojové země)
- **Onemocnění**
 - Průjem
 - Krvavý průjem (hemoragická kolitida)
 - Hemolyticko-uremický syndrom (typický, D+ HUS)
- **Typický HUS (D+ HUS)**
 - Systémová komplikace infekce EHEC u asi 10 % pac. s průjmem, především děti < 5 let!
 - Vyvolán **Shiga toxiny (Stx)** produkovanými EHEC kolonizujícími colon => absorpce Stx do oběhu
 - => poškození endotelu glomerulárních kapilár
 - => agregace trombocytů a fibrinu => tromby
 - => **glomerulární trombotická mikroangiopatie** (histopatologický podklad HUS)



HUS klinika a pozdní následky

➤ Klinika:

▪ Hemolytická anémia

(hemoglobin < 10 g/l, schistocyty v perif. krevním nátěru)

▪ Thrombocytopenie

(počet trombocytů < 150 x 10⁹/l)

▪ Akutní renální selhání

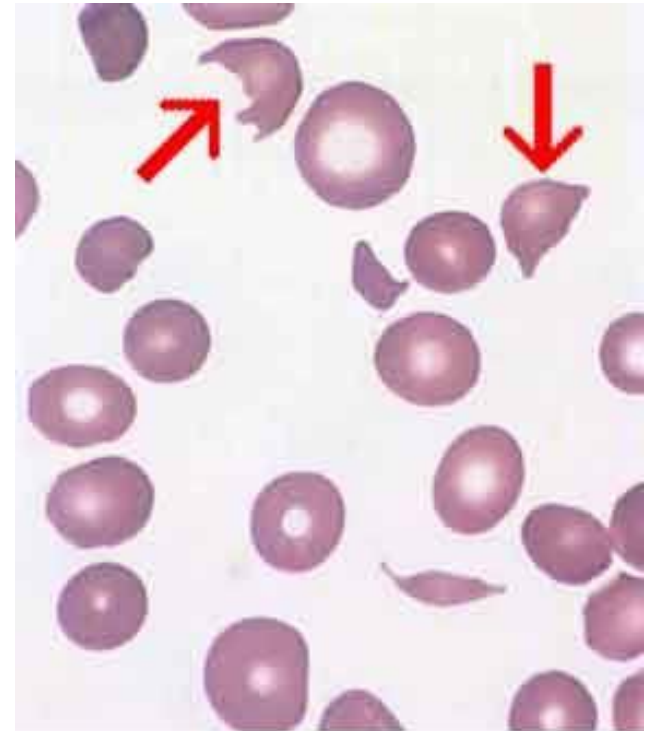
(zvýšený sérový kreatinin a urea)

➤ **Nejčastější příčina akutního renálního selhání u dětí!**

➤ Smrtnost akutního onemocnění 1 - 3%

➤ **Pozdní následky (až u 30% pacientů):**

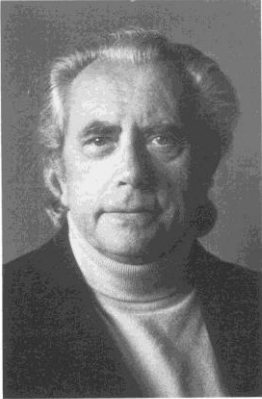
Proteinurie, hypertenze, chron. renální selhání => dialýza, transplantace ledvin



Schistocytes / Helmet Cells

Robbins Pathologic Basis Of Disease: 6th Edition, 1999.
Fig. 14-17 p. 621.

EHEC (STEC, VTEC) - historie



Prof. Conrad Gasser 1912-1982

Hämolytisch-urämische Syndrome: Bilaterale Nierenrindennekrosen bei akuten erworbenen hämolytischen Anämien

Von C. Gasser, E. Gautier und Annemarie Steck (klinischer Teil) und
R. E. Siebenmann und R. Oechslin (pathologisch-anatomischer Teil)

Hiezu 4 Abbildungen Seite 929

Aus einer Gruppe von 10 letal verlaufenen Krankheitsbildern,
die mit Urämie und hämolytischer Anämie einhergingen, werden
5 akute Fälle beschrieben, die charakterisiert sind durch eine aus
unbekannter Ursache plötzlich einsetzende akute intravasale Hämolyse.

Schweiz Med Wochenschr 85: 905 (1955)

THE LANCET, MARCH 19, 1983

Preliminary Communication

SPORADIC CASES OF HAEMOLYTIC-URAEMIC SYNDROME ASSOCIATED WITH FAECAL CYTOTOXIN AND CYTOTOXIN-PRODUCING ESCHERICHIA COLI IN STOOLS

MOHAMED A. KARMALI
MARTIN PETRIC

BRIAN T. STEELE*
CORAZON LIM

Departments of Bacteriology and Virology,
Research Institute, and Division of Nephrology, Department of
Paediatrics, Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada
MSG 1X8 and Department of Microbiology, University of Toronto

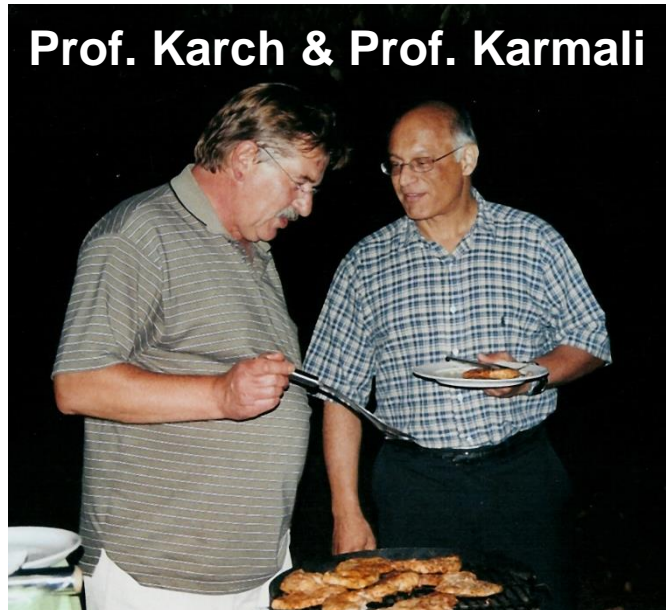
THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES • VOL. 156, NO. 1 • JULY 1987
© 1987 by The University of Chicago. All rights reserved. 0022-1899/87/5601-0022\$01.00

A DNA Probe to Identify Enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and Other Serotypes That Cause Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome

Myron M. Levine, Jian-guo Xu*, James B. Kaper,
Hermey Lior, Valeria Prado, Ben Tall, James Nataro,
Helge Karch, and Kaye Wachsmuth

From the Center for Vaccine Development, Division of
Geographic Medicine, Department of Medicine, and the
Division of Infectious Diseases and Tropical Pediatrics,
Department of Pediatrics, University of Maryland School of
Medicine, Baltimore, Maryland; the Laboratory Center for
Disease Control, Ottawa, Canada; the Department of
Microbiology, University of Chile Faculty of Medicine,
Area Oriente, Santiago, Chile; the Institut für Medizinische
Mikrobiologie und Immunologie, Universitäts-Krankenhaus
Eppendorf, Hamburg, Federal Republic of Germany; and the
Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia

- ➔ První popis HUS: Gasser *et al.*, 1955
- ➔ 1. zpráva o souvislosti mezi infekcí STEC (VTEC)
a HUS: Karmali *et al.*, 1983
- ➔ 1. zpráva o STEC O157:H7 jako původci HC:
Riley *et al.*, 1983
- ➔ EHEC (= vysoce patogenní STEC):
Levine *et al.*, 1987



Prof. Karch & Prof. Karmali

Epidemiologie EHEC infekcí

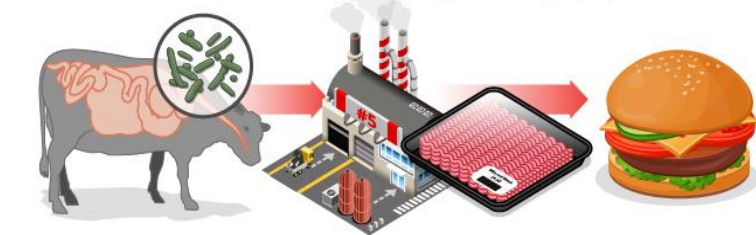
- **Hlavní rezervoár:** hovězí dobytek (ovce, kozy, prasata), ale i divoká zvířata a ptáci
- **Zdroj a přenos:**
 - Kontaminované (při porážce) a nedostatečně tepelně opracované maso (hovězí - hamburgery), nepasterizované mléko
 - Fekálně kontaminované syrové (a nedostatečně omyté) plodiny - zelenina, klíčky, ovoce
 - Fekálně kontaminovaná voda
 - Přímý kontakt se zvířaty (farma, zoo)
 - Přímý kontakt s pacientem či nosičem (nedostatečná hygiena rukou)

Infekční dávka: 10-100 bakterií (nízká!)

How E. coli bacteria spreads

FROM MEAT

E. coli can contaminate meat during slaughter, processing or preparation



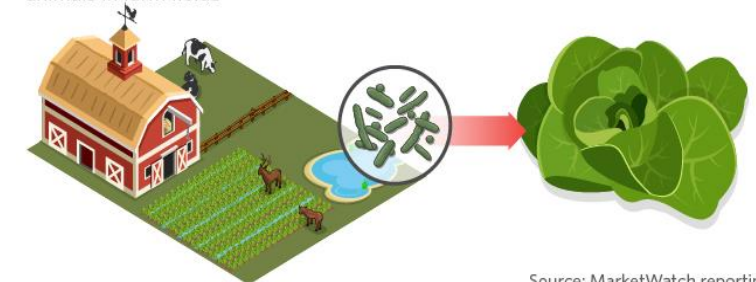
FROM HUMANS

E. coli can spread if hands aren't thoroughly washed between using the restroom and touching food



FROM PRODUCE

Animal feces can contaminate crops through groundwater or errant animals in farm fields



Shiga toxiny

AB₅ toxiny = 1 biologicky aktivní A podjednotka (N-glykosidázová aktivita => ribozomy => inhibice proteosyntézy)
+ pentamer vazných B podjednotek (vazba k receptoru Gb3 na hostitelských buňkách)

- **2 hlavní typy Stx:** Stx1, Stx2

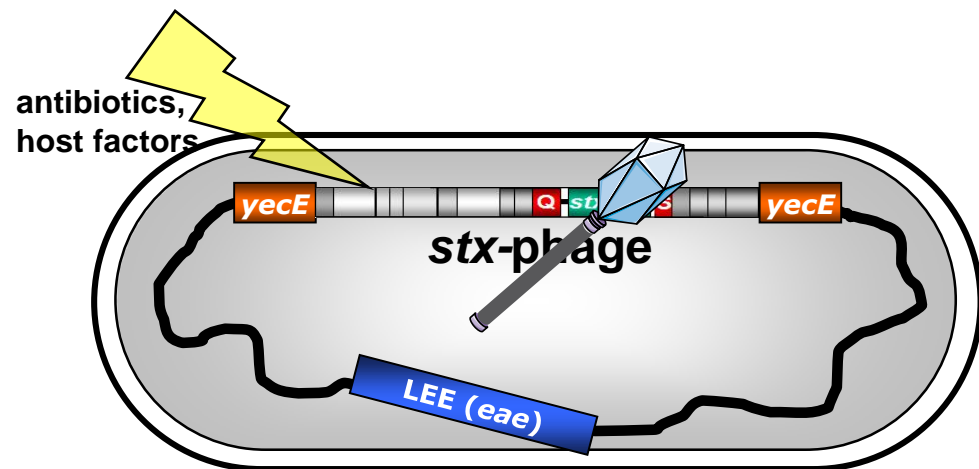
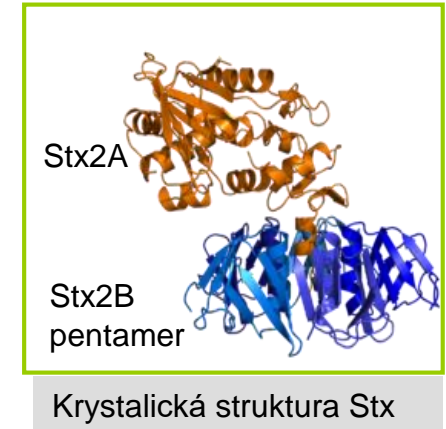
Řada subtypů

Stx1a, Stx1c, Stx1d

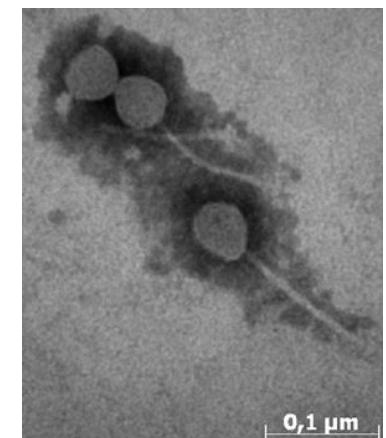
Stx2a, Stx2b, **Stx2c**, **Stx2d**, Stx2e, Stx2f

=> **Stx2a, Stx2c, Stx2d hlavní vyvolavatelé HUS**

- **Shiga toxiny kódovány genem *stx* lokalizovaným na temperovaném bakteriofágu**
- Faktory aktivující stresovou odpověď (UV záření, ATB, střevní prostředí) indukují *stx*-fága => přechod z lyzogenního stavu do lytické fáze => produkce Stx



Bakteriální lýza
=> uvolňování Stx z bakterií



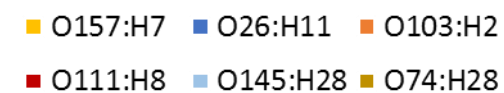
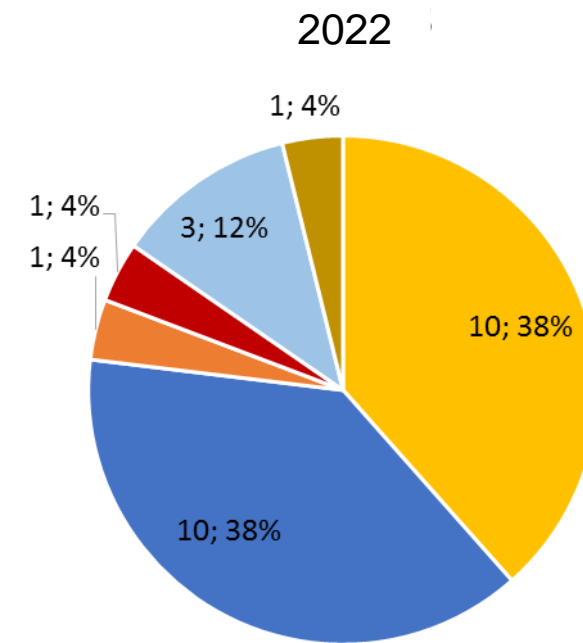
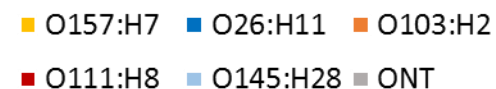
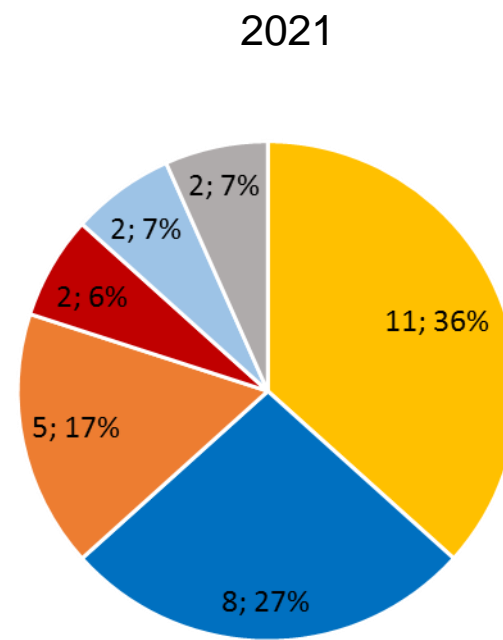
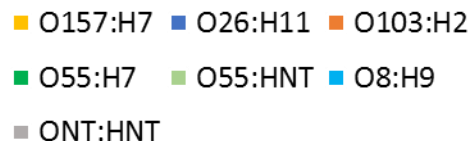
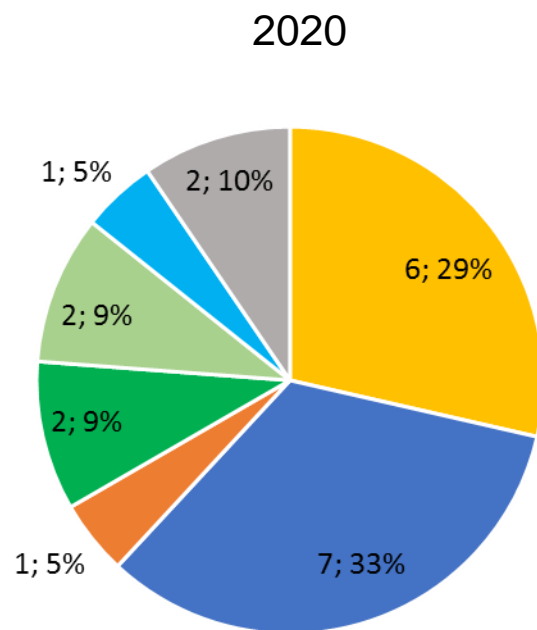
stx-bakteriofág

EHEC – nejčastější sérotypy vyvolávající lidská onemocnění (data NRL pro *E. coli* a shigely)

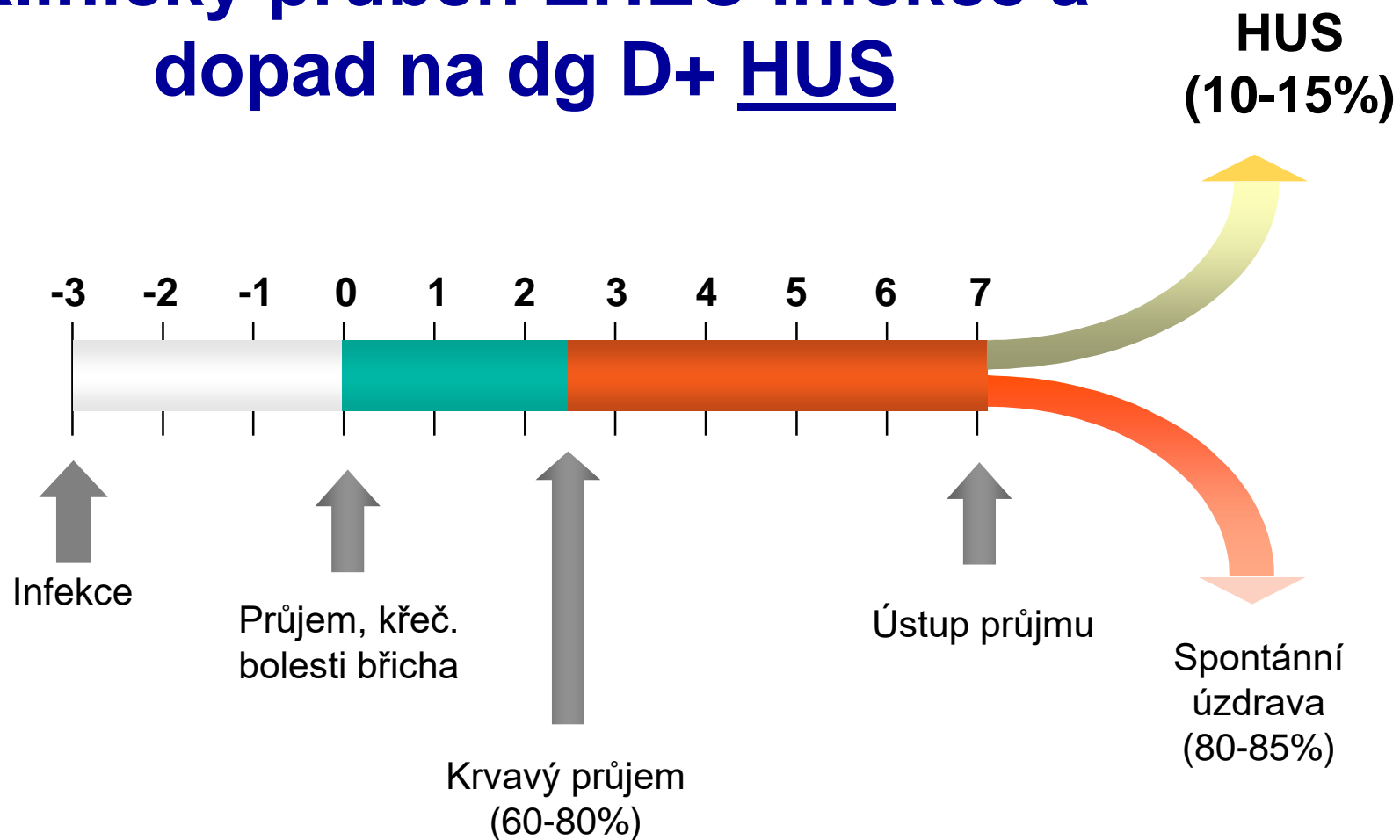
➤ „Top five“ EHEC

- O157:H7/H⁻
- O26:H11/H⁻
- O103:H2
- O111:H8/H⁻
- O145:H28/H25/H⁻
- O45:H-
- O121:H2

(„top seven“)



Klinický průběh EHEC infekce a dopad na dg D+ HUS



Adaptováno z Tarr et al., Lancet, 2005

Kvantum EHEC ve stolici

Velmi rychlý pokles po začátku průjmu!!!

**Nutné užití vysoce citlivých selektivně-dg metod pro průkaz a izolaci EHEC!
(=> specializ. pracoviště)**

Diagnostika EHEC u pacientů s HUS (NRL pro *E. coli* a shigely)

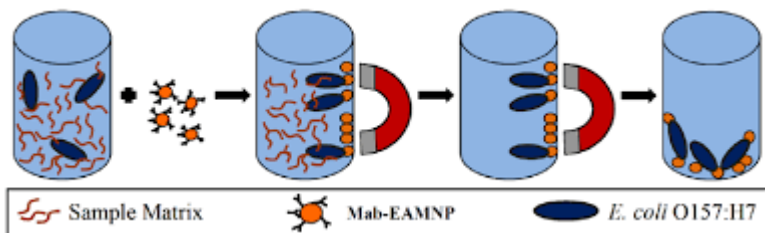
Materiál: Stolice (vzorek, ne rekt. výtěr)



Pomnožení (Hajna bujon bez/s Novobiocinem)



Imunomagnetická separace (IMS) „top five“
(O26, O103, O111, O145, O157)
=> **Selektivní koncentrace „top five“ STEC**



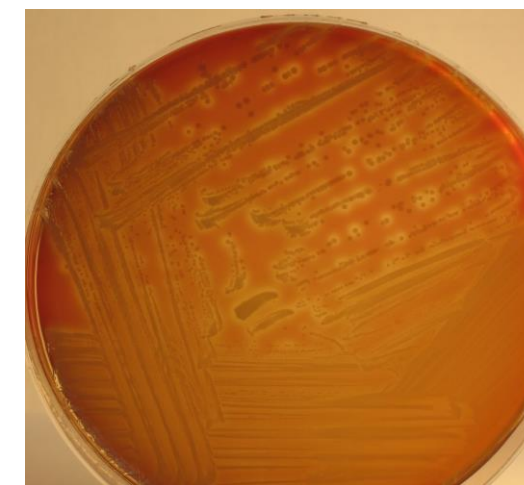
Kultivace po IMS na:

- KA
- Sorbitol MacConkey agar (SMAC)
- CT-SMAC
- Enterohemolysinový agar



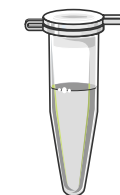
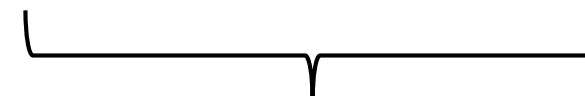
SMAC, CT-SMAC

O157:H7 bezbarvé
Ostatní "top five" růžové



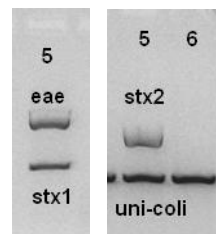
Enterohemolysinový agar

Všechny "top five" = enterohemolytický
fenotyp (neúplná hemolýza)



Stažení části kultury ze SMAC,
CT-SMAC a E-Hly agaru do dH2O

DNA izolace (směsná kultura + susp. kolonie) => **PCR**



PCR EHEC

*stx*₁
*stx*₂
eae
EHEC-*hly*



Fenotypová charakterizace:

- Potvrzení *E. coli* (bioch., MALDI-TOF)
- Sérotypizace (skličk. aglutinace)
- Produkce Stx (ELISA, latex aglutinace)

Průkaz produkce Shiga toxinu u izolátů

VTEC-RPLA (reverzní pasivní latexová aglutinace)

Diagnostikum: latexové částice sensibilizované protilátkou proti Stx1 nebo Stx2
(latex. částice bez protilátky = negativní kontrola)

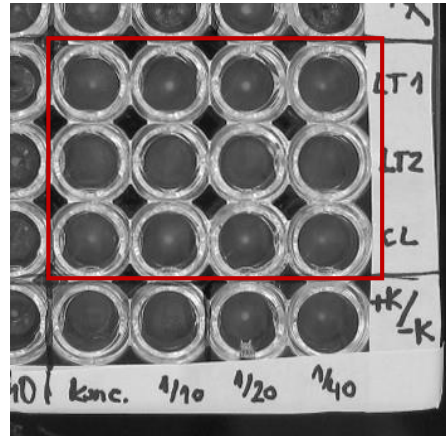
Provedení:

Supernatant kultury

+ L-anti-Stx1, L-anti-Stx2, L-kontrolní

=> inkubace přes noc

=> odečítání aglutinace latex. částic



Kmen produkuje Stx2
v titru > 1:40

- **Izolace STEC se povinně hlásí do evropského surveillance systému TESSy v ECDC (Evropské centrum pro kontrolu infekčních nemocí - Stockholm) => celoevropská evidence**
- **Průkaz infekce STEC u pacienta s HUS je rozhodující pro volbu správného terapeutického postupu** (je odlišný od léčby HUS jiného původu – např. geneticky podmíněného atypického HUS)

Diagnostika EHEC u pacientů s průjmem

Na začátku průjmu vysoké kvantum EHEC ve stolici => více Stx => možný průkaz Stx nebo *stx* genů buď přímo ve stolici (rychlé, ale nízká citlivost!) nebo v pomnožené kultuře

➤ **Stx ELISA** (několik komerčních testů):

- Detekce Stx1+Stx2 společně – nerozlišeny

- Premier EHEC (Meridian)
- RidaScreen Verotoxin (R-Biopharm)

➤ **Další imunoeseje (imunochromatografie):**

- Detekce Stx1 a Stx2 zvlášť => rozlišují Stx1 a Stx2

=> klinicky důležité – produkce Stx2 spojena se zvýšeným rizikem rozvoje HUS!

- ImmunoCard STAT![®] EHEC (Meridian)

➤ **Průkaz genů kódujících Stx1 a Stx2 (PCR)** – součást komerčního enterického panelu (dg panelů pro střevní patogeny)

POZOR: Pozitivní immunoassay nebo PCR = pouze předběžná detekce STEC infekce => pozitivní vzorky nutno kultivovat => kmeny izolovat a charakterizovat (důležité hlavně epidemiologicky)
=> NRL pro *E. coli* a shigely



Léčba onemocnění vyvolaných EHEC

▪ Průjem

- self-limiting, není třeba, při velké dehydrataci => rehydratace

▪ Prevence HUS ve stadiu průjmu

- **Nepodávat antibiotika!** – některé skupiny ATB (β -laktamy působící na bakteriální stěnu a fluorochinolony aktivující stresovou odpověď) indukují *stx*-bakteriofágy => zvyšují produkci Stx a jeho uvolňování z bakterií do střev. lumen => absorpci do oběhu => **zvyšují riziko rozvoje HUS => u průjmu s prokázanou infekcí EHEC nebo s neznámou etiologií (nevíme, zda není EHEC) nepodávat ATB!!!**
- **Monoklonální Abs proti Stx, analoga Gb3** => nutno podat co nejdříve po začátku průjmu! (v praxi zatím neužívány, pouze klin. studie)

▪ HUS

Kauzální léčba neexistuje!

Pouze podpůrná léčba (dostatek tekutin i.v., dialýza, transfuze erytrocytů, atd.)

Hlavní „léčba“ = prevence onemocnění => zabránit infekci EHEC (jíst pouze dobře tepelně opracované maso, nepít nepasteurizované mléko, řádně mýt ovoce a zeleninu, řádně mýt ruce po kontaktu se zvířaty či s pacientem, atd.)

Enterotoxigenní *E. coli* (ETEC)

➤ Výskyt a onemocnění

- **Rozvojové země teplého pásma s nízkým hygienickým standardem**

=> hlavní původci **akutních vodnatých průjmů u dětí a dospělých**

(cholera-like disease) - rychlá dehydratace – smrt => vedoucí příčina dětské úmrtnosti
(podvýživa, špatná dostupnost lék. péče včetně možnosti rehydratace!)

- **Rozvinuté země s vysokým hyg. standardem - importované nákazy**

=> **průjmy cestovatelů (travellers' diarrhoea)** – průjmová onemocnění turistů,
kteří se nakazili při pobytu v oblastech vysokého výskytu ETEC
- obvykle mírný průběh, neohrožují život

➤ Zdroj infekce

- Fekálně kontaminovaná voda a potraviny (infekční dávka ca. 10^9 bakterií)

=> v endemických oblastech pít jen balenou vodu, tuto mýt i ovoce/zeleninu, pozor na led do nápojů!

➤ Léčba

- Rehydratace (náhrada vody a elektrolytů)!

ETEC

➤ Faktory virulence (kódované na plasmidech):

- Enterotoxiny – termolabilní (LT), termostabilní (STa)
- Adheziny (kolonizace tenkého střeva)

➤ Patogeneze

- Adherence bakterií k epitelu tenkého střeva a pomnožení => kolonizace (bez morfol. poškození!)
- Produkce LT a/nebo STa

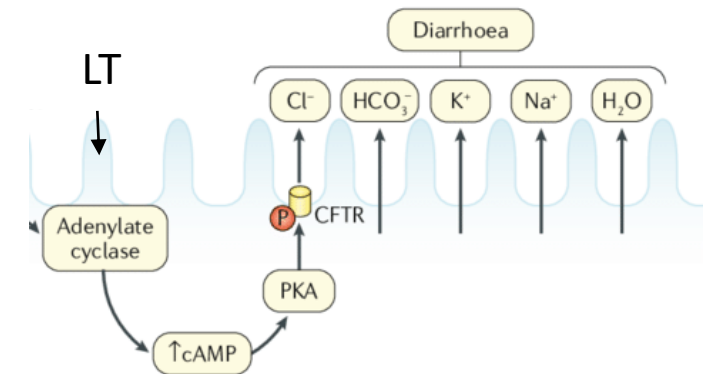
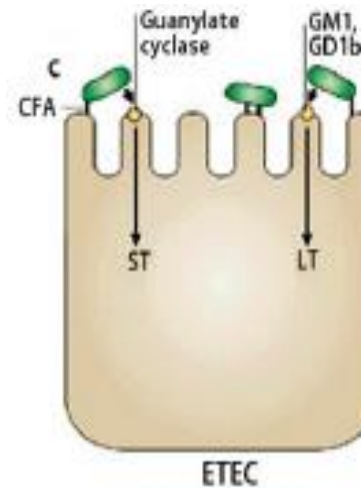
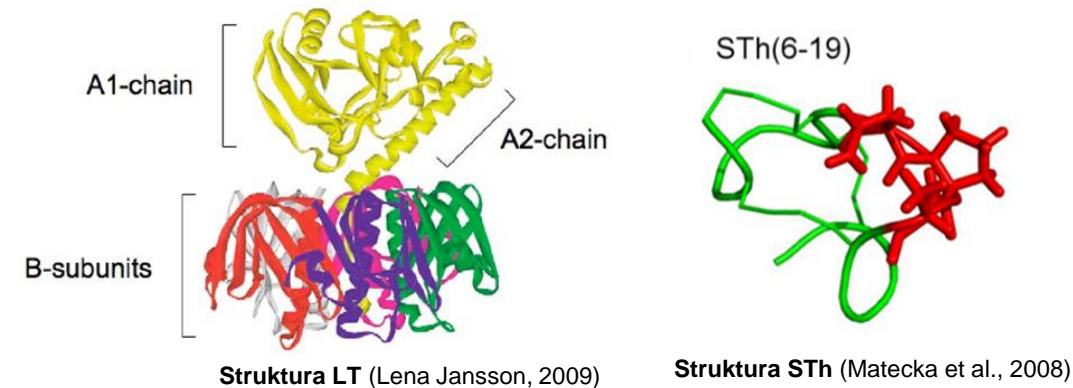
➤ LT (podobný cholerovému toxinu, AB₅ toxin)
=> aktivace adenylcyklázy => zvýšení cAMP

➤ STa (oligopeptid)
=> aktivace guanylcyklázy => zvýšení cGMP

⇒ Porucha transportu iontů (Na⁺,K⁺) =>

⇒ zvýšená sekrece H₂O z buněk

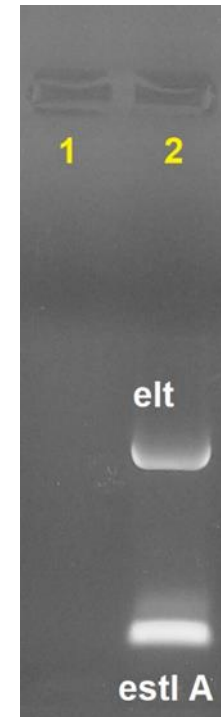
⇒ **vodnatý průjem** (střevní tekutina bez příměsi krve, hlenu, hnisu)



ETEC

Mikrobiologická diagnostika

- **Materiál:** rektální výtěr
 - **Kultivace**
 - KA (nehemolytické)
 - Endo agar, MacConkey agar => ETEC laktóza-fermentující => nelze odlišit od běžné stř. flóry
 - **Identifikace**
 - Screening ETEC kolonií sérotypizací (sklíčková aglutinace)
 - nejčastější séroskupiny O6, O8, O25, O78, O148, O159, O173
 - Potvrzení druhu *E. coli*
 - Biochemické vlastnosti
 - MALDI-TOF
 - U suspektních kolonií průkaz enterotoxinů
 - LT a STa imunoeseje (ELISA, latex aglutinace)
 - gény kódující LT a STa (PCR)
- => Provádí NRL pro *E. coli* a shigely



Enteroagregativní *E. coli* (EAEC)

➤ Výskyt a onemocnění

- Hlavně rozvojové země s nízkým hygienickým standardem
 - Chronické (persistentní) průjmy u dětí => malnutrice, poruchy růstu, smrt
- I rozvinuté země
 - průjmy dětí
 - Akutní a chronické průjmy u imunokompromitovaných osob (HIV pacienti)
 - Průjmy cestovatelů (importované infekce)

➤ Zdroj infekce

- Kontaminovaná voda a potraviny
- Mezilidský přenos (infekční dávka 10^6 bakterií)

➤ Léčba

- Rehydratace
- Antibiotika (nutná u chronických průjmů na eradikaci patogena)

EAEC

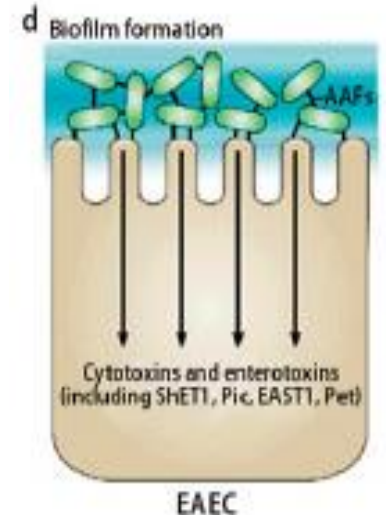
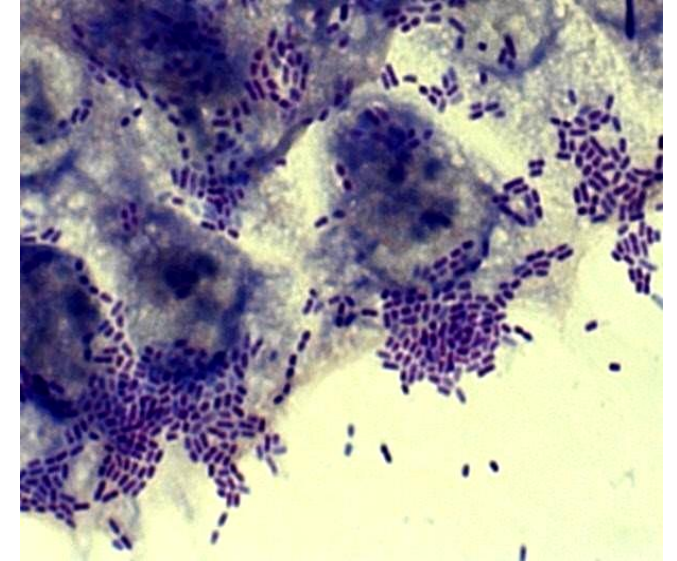
➤ Faktory virulence:

- Heterogenní sady faktorů virulence – kmenově specifické
- Společné pro všechny EAEC jsou **agregativní fimbrie (AAF)**
=> umožňují adhezenci ke střevnímu epitelu i mezi bakteriemi
=> velké agregáty bakterií na povrchu epitelu

➤ Patogeneze

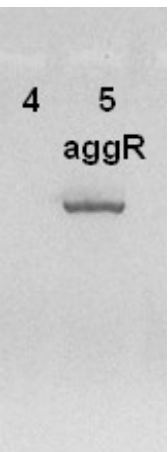
- Aggregativní adherence hlavní patogenetický mechanismus
=> velká kvanta adherujících bakterií produkují toxiny (enterotoxiny, cytotoxiny, atd.) a další produkty
=> poškození střevního epitelu => redukce resorpční schopnosti

=> **Chronický průjem a malnutrice**



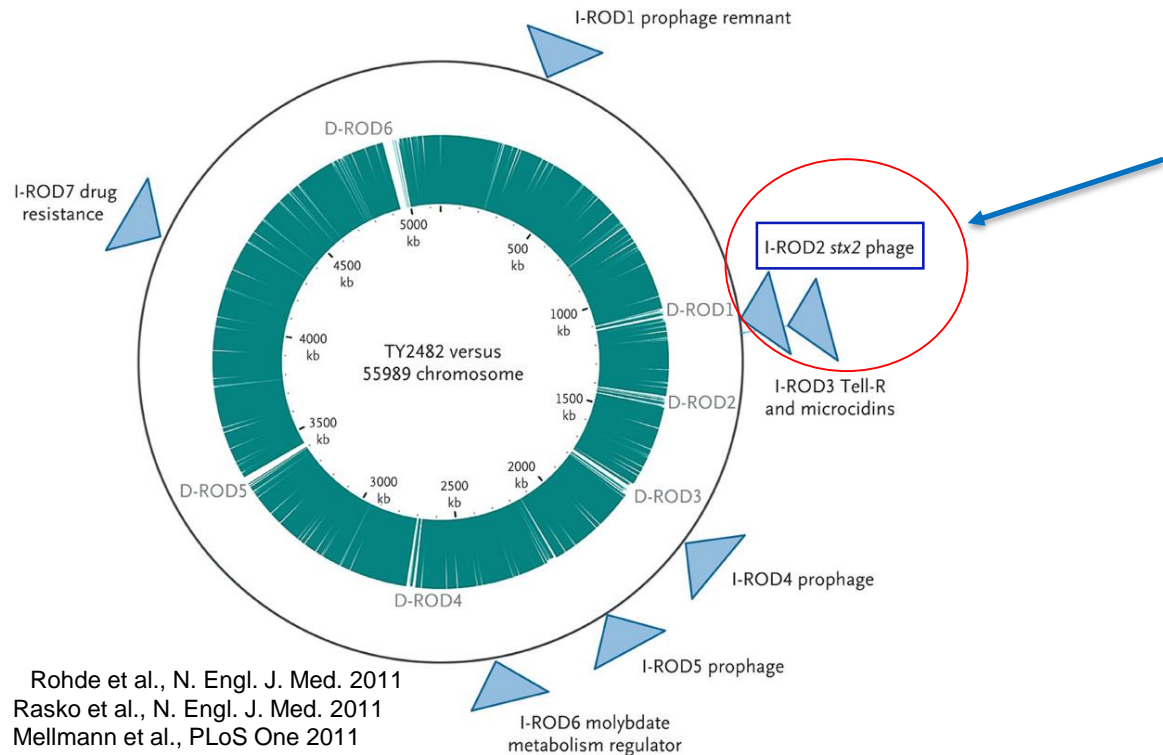
Mikrobiologická diagnostika

- **Materiál:** rektální výtěr
- **Kultivace**
 - KA (nehemolytické i hemolytické)
 - Endo, MacConkey agar - laktóza-fermentující (růžové kolonie) => nelze odlišit od fyziol. střevní flóry
- **Identifikace**
 - Screening kolonií sérotypizací (sklíčková aglutinace)
 - nejčastější séroskupiny O3, O15, O44, O86, O104, O111, O127
 - Potvrzení druhu *E. coli*
 - biochemické vlastnosti
 - MALDI-TOF
 - U susp. kolonií PCR průkaz *aggR* genu (kóduje transkripční regulátor AggR) = marker EAEC
=> NRL pro *E. coli* a shigely



Vznik hybridních patogenů (EHEC/EAEC O104:H4)

EAEC mohou být lyzogenizovány bakteriofágy nesoucími *stx*-gény kódující Stx => vznik hybridů!!!



Celogenomové sekvenování (WGS) O104:H4 epid. kmene:

- Core (základní) genom typický pro EAEC

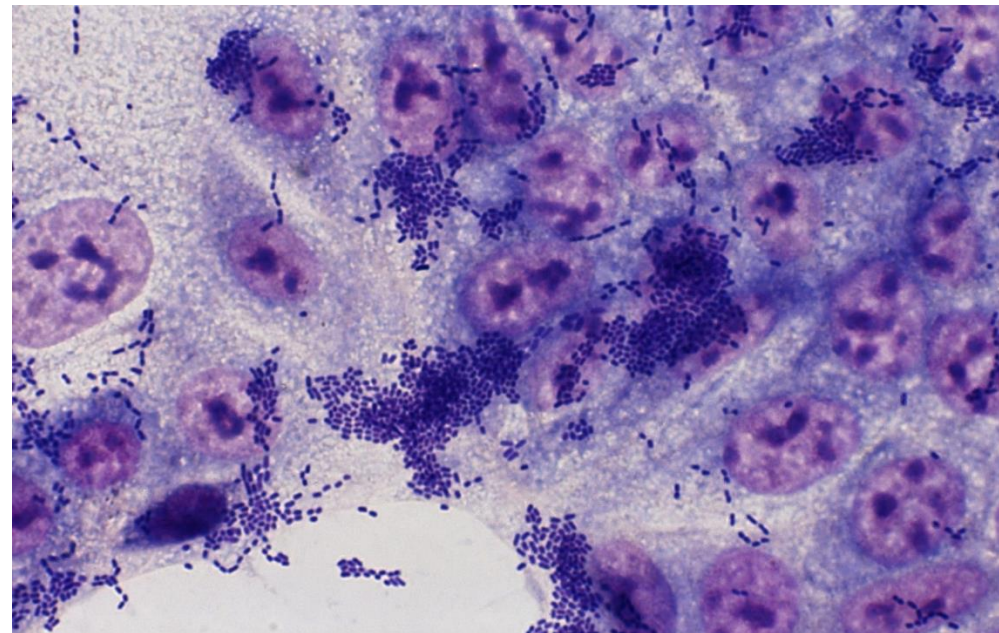
=> typické faktory virulence EAEC => schopnost intenzivní adherence ke střevnímu epitelu

- do chromosomu integrován *stx*₂ bakteriofág kódující Stx2

=> **EHEC/EAEC hybrid**

Hypotéza: Masivní adherence ke střevní sliznici zvýšila množství Stx2 absorbované do krevního oběhu

=> **Vysoká virulence - progrese infekce do HUS 22%!**



Adherence EHEC/EAEC O104:H4 ke střevním epitelovým buňkám (Bielaszewska et al., 2011)

Epidemie hybridním kmenem EHEC/EAEC O104:H4, Německo 2011

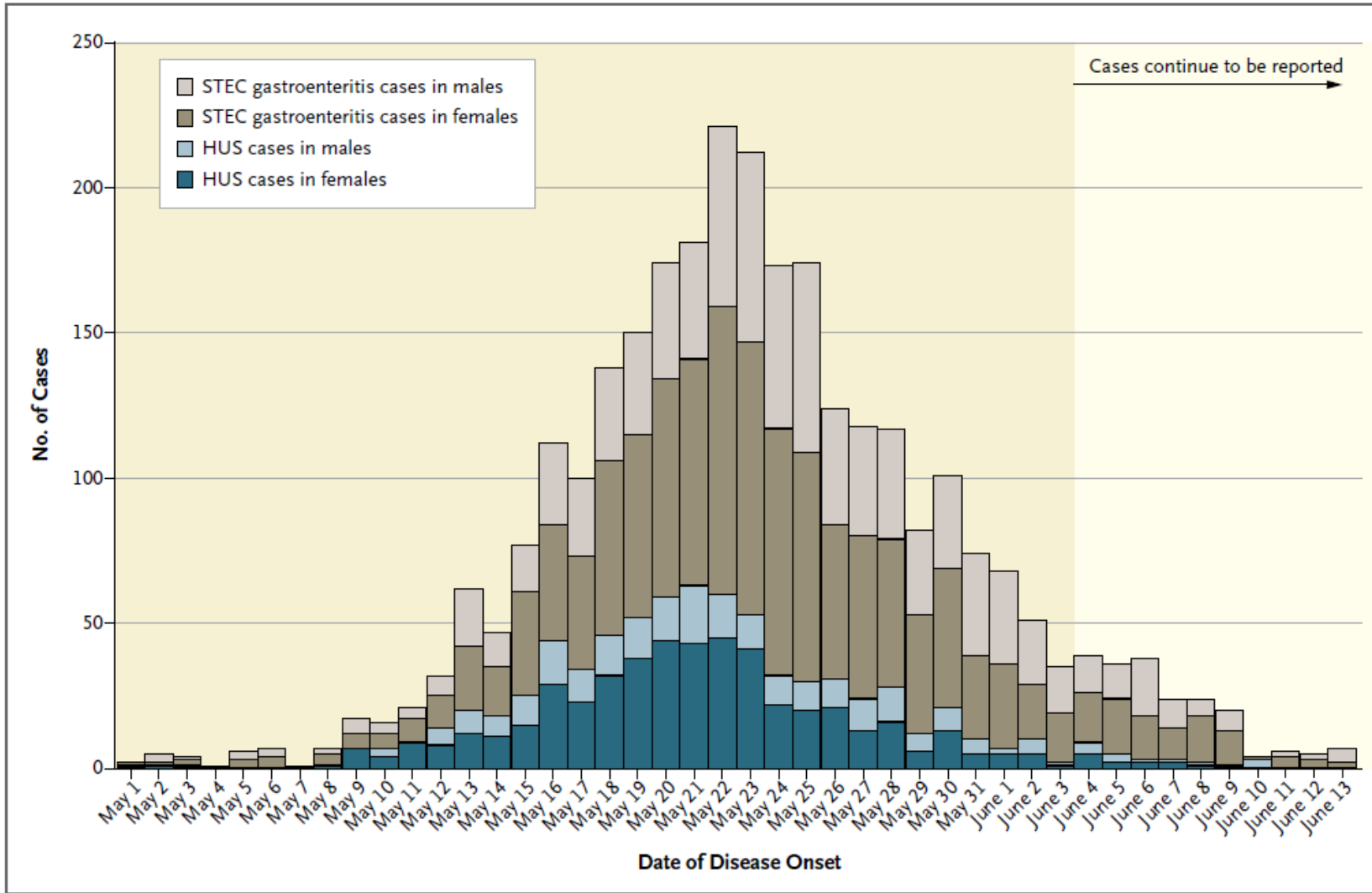


Figure 1. Epidemiologic Curve of the Outbreak.

Shown are the number of cases of the hemolytic-uremic syndrome (HUS) and of Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) gastroenteritis, according to sex. Only cases with a known date of onset are included here — 748 of 810 cases of the hemolytic-uremic syndrome and 2166 of 2412 cases of Shiga-toxin-producing *E. coli* diarrhea.

3.842 případů onemocnění
2.987 průjem
855 HUS (22 %)
54 úmrtí



Největší a nejzávažnější epidemie HUS v historii!

Zdroj:

klíčky pískavice řecké seno
- přidávané do salátů
 (kontaminovaná semena
 dovezena z Egypta)



➤ **1 případ v ČR (US turistka, která konzumovala salát s klíčky v Německu)**

Enteroinvazivní *E. coli* (EIEC)

➤ Onemocnění a výskyt

- **Onemocnění podobné shigelóze** = průjmy s příměsí hlenu a krve, břišní křeče, zvracení, horečka – děti i dospělí
- **Hlavní výskyt rozvojové země teplého pásma s nízkým hyg. standardem**
- Vzácné v rozvinutých zemích mírného pásma (často importované infekce)

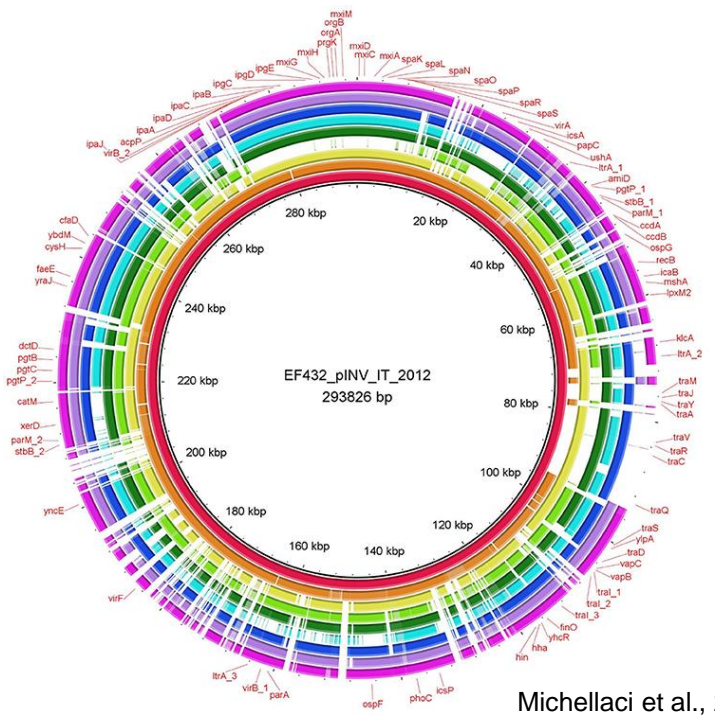
➤ Zdroj infekce a přenos

- Zdroj infekce člověk (jediný hostitel EIEC)
- Fekálně-orální přenos z člověka na člověka
- Kontaminovaná voda a potraviny (infekční dávka > 10^6 bakterií)

➤ Léčba

- Rehydratace
- Antibiotika (dle citlivosti v případě nutnosti)

EIEC



➤ Faktory virulence:

- Komplex **invazinů** - proteinů umožňujících invazi do epitelu tlustého
- střeva (kódované na velkém „invazivním“ plasmidu)

➤ Patogeneze

- Fakultativně intracelulární patogén

(na rozdíl od ostatních diarhogenních *E. coli*)!

- Invaze do epitelových buněk tlustého střeva hlavní patogenetický mechanismus!

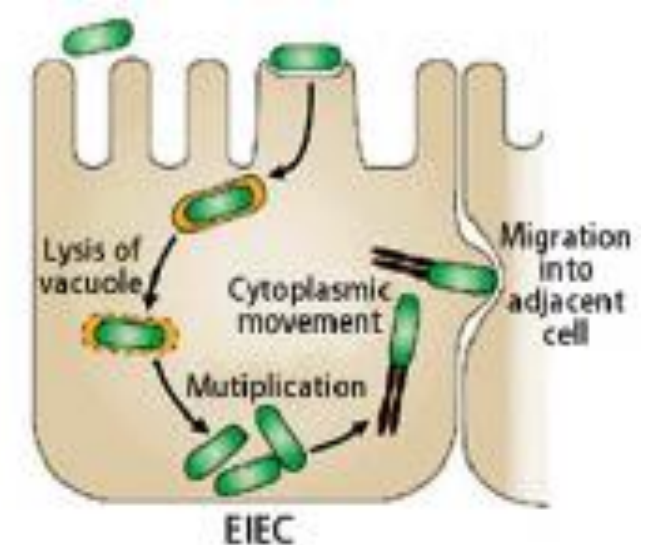
=> intracelulární množení => šíření baktérii z buňky do buňky

=> destrukce epitelu => slizniční léze

=> zánětlivá infiltrace sliznice

- **Průjem s příměsí hlenu, krve, hnisu**

(leukocyty mikroskopicky)



EIEC

Mikrobiologická diagnostika

➤ **Materiál:** rektální výtěr

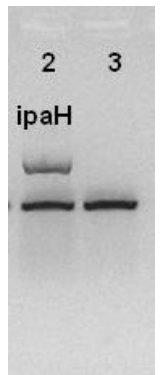
➤ **Kultivace**

- KA (nehemolytické)
- Endo agar, MacConkey agar - laktóza-nefermentující (světlé kolonie)
- => odlišení od fyziol. střevní flóry (laktóza-fermentující růžové kolonie)

➤ **Identifikace**

Obtížně odlišitelné od shigel, s nimiž mají společné genetické, fenotypové a antigenní vlastnosti a faktory virulence!

- Biochemické vlastnosti – EIEC bioch. málo aktivni, velmi podobné shigelám – odlišení od shigel pomocí speciálních bioch. testů (lyzin-dekarboxyláza, mukát, acetát)
- MALDI-TOF – běžný postup neodliší EIEC od shigel
- Sérotypizace (sklíčková aglutinace)
 - nejčastější séroskupiny O28, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O159, O167
- U susp. kolonií PCR průkaz genů kódujících invaziny (*ipaH* – marker EIEC a shigel)
=> NRL pro *E. coli* a shigely



EIEC sérotypy a zkřížené reakce se shigelami

Table 1.4 O:H serotypes of EIEC and the O antigen identity to *Shigella* O antigens

O group	H antigen	<i>Shigella</i> O antigen
O28ac	H-	<i>S. boydii</i> 13
O29	H-	
O112ac	H-	<i>S. dysenteriae</i> 2 O112ab ~ <i>S. boydii</i>
O115	H-	
O121	H-	<i>S. dysenteriae</i> 7
O124	H-; H7; H30; H32	<i>S. dysenteriae</i> 3
O135	H-	
O136	H-	
O143	H-	<i>S. boydii</i> 8
O144	H-; H25	<i>S. dysenteriae</i> 10
O152	H-	<i>S. dysenteriae</i> 12
O159	H2	
O164	H-	
O167	H-; H4; H5	<i>S. boydii</i> 3
O173	H-	

zdroj: *Pathogenic Escherichia coli*, Caister Academic Press, 2014

Shigely

4 druhy: *Sh. dysenteriae*, *Sh. sonnei*, *Sh. flexneri*, *Sh. boydii*

➤ Onemocnění a výskyt

- **Dysenterie (bacilární úplavice, shigelóza):** Náhlý začátek – horečka, zimnice, třesavka, průjem => zprvu vodnatý, později příměs hlenu, krve; břišní křeče (tenezmy)
- **Hlavní výskyt rozvojové země** s nízkým hyg. standardem
=> Shigelóza významným zdrojem morbidity a mortality, hlavně u dětí
- Nízký výskyt v rozvinutých země mírného pásma, onemocnění probíhá mírněji (dobrá tělesná konstituce populace), většinou importované infekce

➤ Zdroj infekce a přenos

- Zdroj infekce člověk a vyšší primáti (jediní hostitelé shigel)
- Fekálně-orální přenos z člověka na člověka (infekční dávka 10-100 bakterií)
- Kontaminovaná voda a potraviny

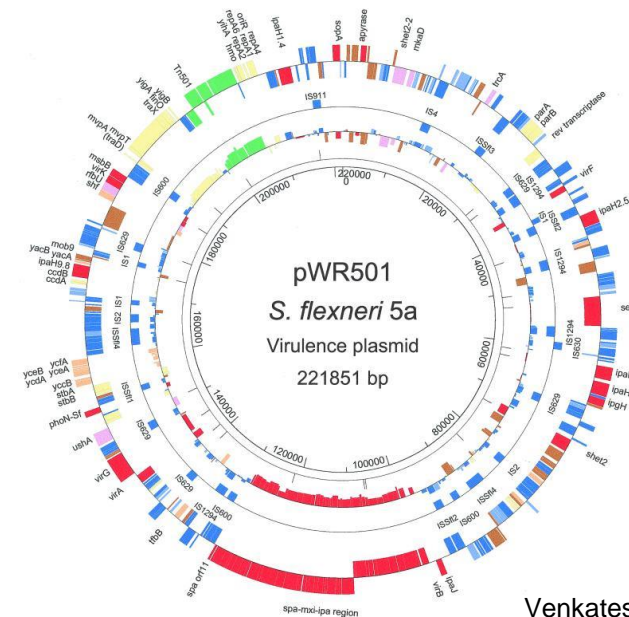
➤ Léčba

- Rehydratace
- Antibiotika (dle citlivosti); shigely mají tendenci perzistovat intracelulárně!

Shigely

➤ Faktory virulence

- Komplex proteinů umožňujících invazi do epitelu colon (kódované na velkém „invazivním“ plasmidu)
- Toxiny
 - Shiga toxin 1 – ***Sh. dysenteriae* Typ 1 => vyvolává HUS!**
 - Shigella enterotoxin 1, 2

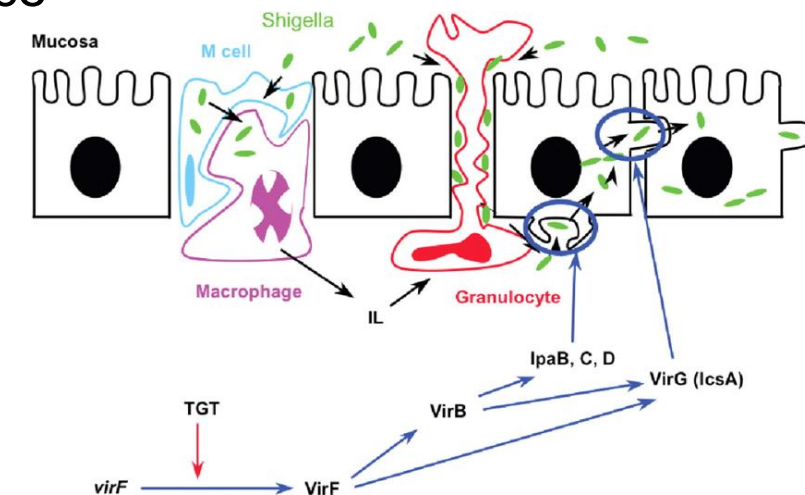


Venkatesan et al., 2001

➤ Patogeneze

- Invaze do epitelových buněk tlustého střeva hlavní patogenetický mechanismus!
- Fakultativně intracelulární patogény => intracelulární množení => šíření z buňky do buňky => destrukce epitelu => slizniční léze => zánětlivá infiltrace

⇒ **Průjem s příměsí hlenu, krve, hnisu**
(leukocyty ve stolici mikroskopicky)



Shigely

Mikrobiologická diagnostika

➤ **Odběr:** rektální výtěr (vždy zasílat v transportní půdě - shigely citlivé k zevním vlivům!)

➤ Kultivace

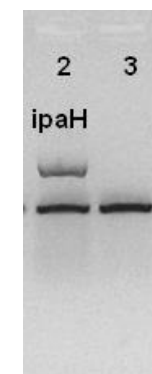
- KA (někdy R fáze, nehemolytické)
- Endo/MacConkey agar (světlé laktóza-nefermentující)
- DC agar (selektivní půda pro shigelly) – světlé laktóza-nefermentující



➤ Identifikace

Obtížně odlišitelné od EIEC, s nimiž mají společné genetické, fenotypové a antigenní vlastnosti a faktory virulence!

- Biochemické testy – velmi podobné EIEC, možno odlišit speciálními bioch. testy
- MALDI-TOF – nelze odlišit od EIEC
- Sérotypizace (sklíčková aglutinace) na určení druhu a sérotypu (zkřížená aglutinace s EIEC!)
 - *Sh. dysenteriae* - 15 sérotypů
 - *Sh. flexneri* - 6 sérotypů
 - *Sh. boydii* - 20 sérotypů
 - *Sh. sonnei* - 1 sérotyp (2 formy – I smooth, II rough)
- PCR *ipaH* (marker EIEC a shigel) => NRL pro *E. coli* a shigely



Děkuji za pozornost 😊