Intestinální patotypy *E. coli* a shigely

Prof. 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 vitaminu K, udržování střevní rovnováhy, atd.)

- První důkaz střevní 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%)

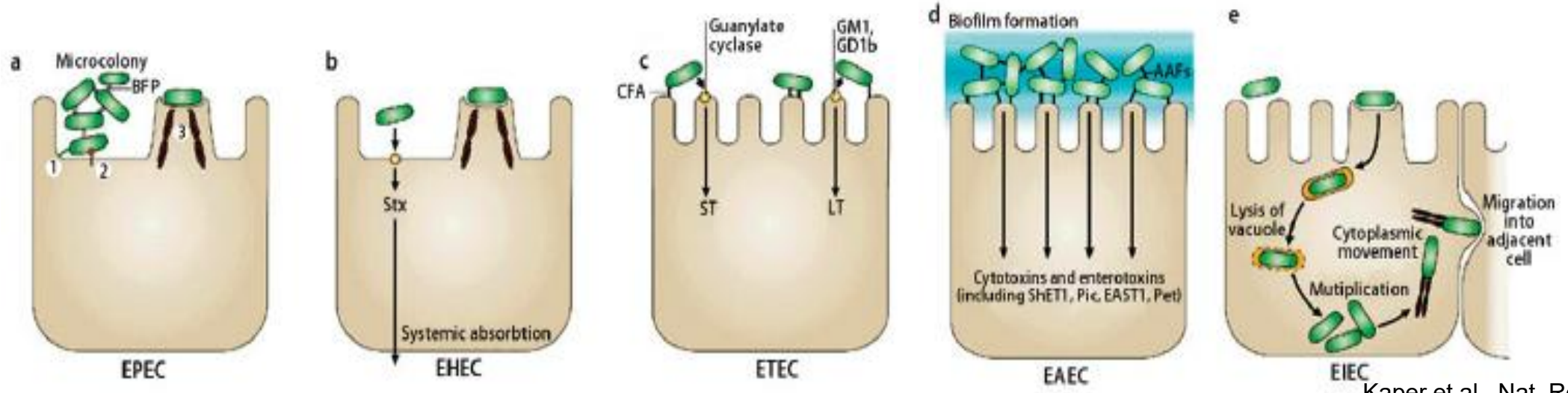
- Ve stolicích nemocných dětí žádný známý patogén, pouze *E. coli*
  - Kmeny *E. coli* od dětí s průjmem odlišné (biochemicky a antigenně) od kmenů od zdravých dětí
  - epidemické kmeny z různých zemí stejné či velmi podobné => určité séroskupiny (O111, O55)

  => Hypotéza: tyto kmeny byly původci epidemií

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)

❖ **Patotypy jsou definovány spektrem faktorů virulence a mechanismem interakce se střevním epitelem**
(kmeny jednotlivých patotypů patří obvykle k určitým sérotypům, ale samotný sérotyp neurčuje patogenitu!)



Kaper et al., Nat. Rev. Microbiol. 2004

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!

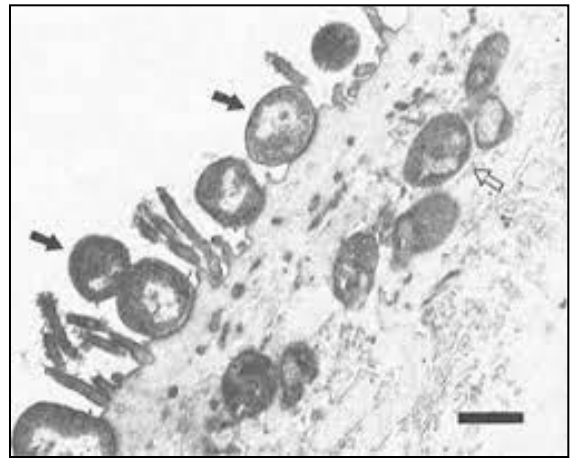
- EPEC neprodukují toxiny (enterotoxiny, Shiga toxiny)
- Nejsou enteroinvazivní

=> Pochybnosti o enteropatogenitě !!!

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

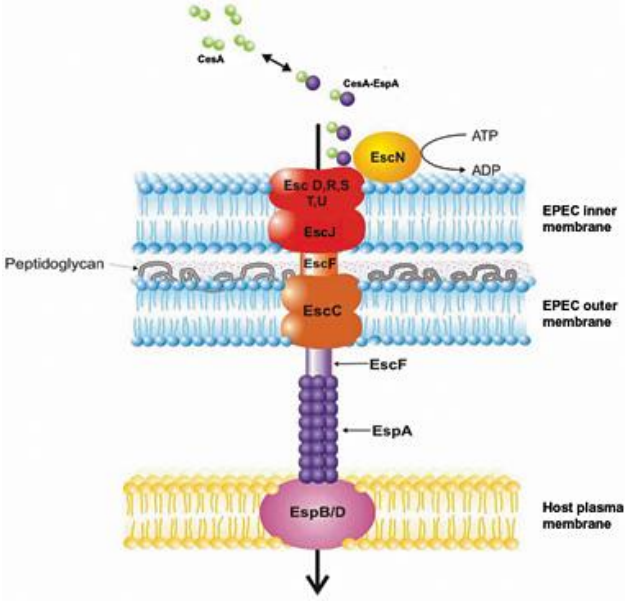
Martin H. Ulshen, M.D., and John L. Rollo, M.D.
New England Journal of Medicine 1980; 302:99-101

- Specifický EM nález na sliznici tenkého střeva



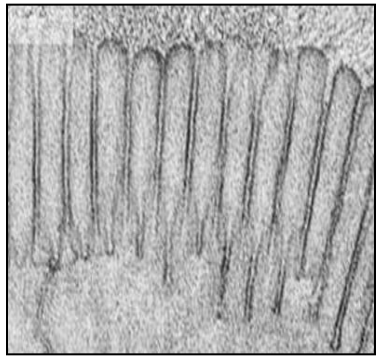
EPEC

- **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 mikroklků
    = **“attaching effacing (A/E) lesions“**

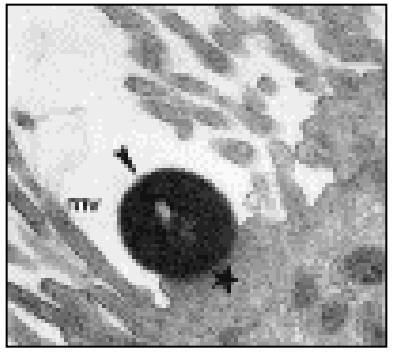


EPEC TTSS. Natalie Strynadka, Howard Hughes Medical Institute

=> Poškození resorpčního epitelu tenkého střeva => vodnatý průjem



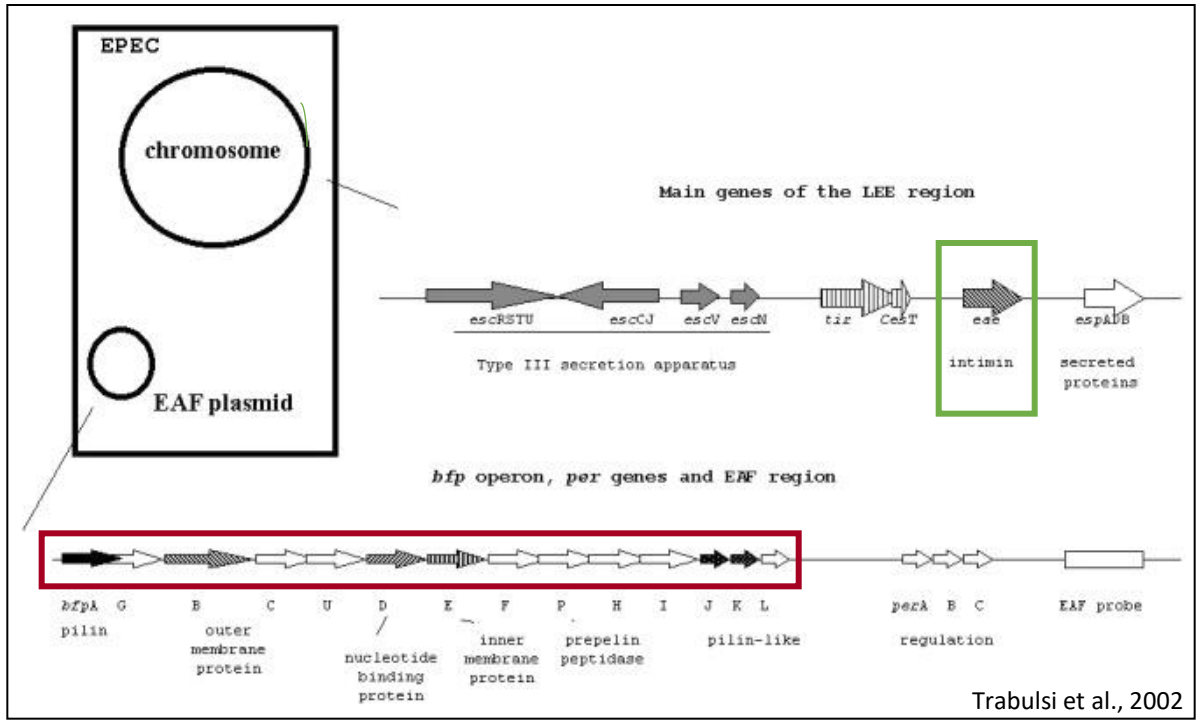
Resorpční epitel zdravého TS => normální mikroklky



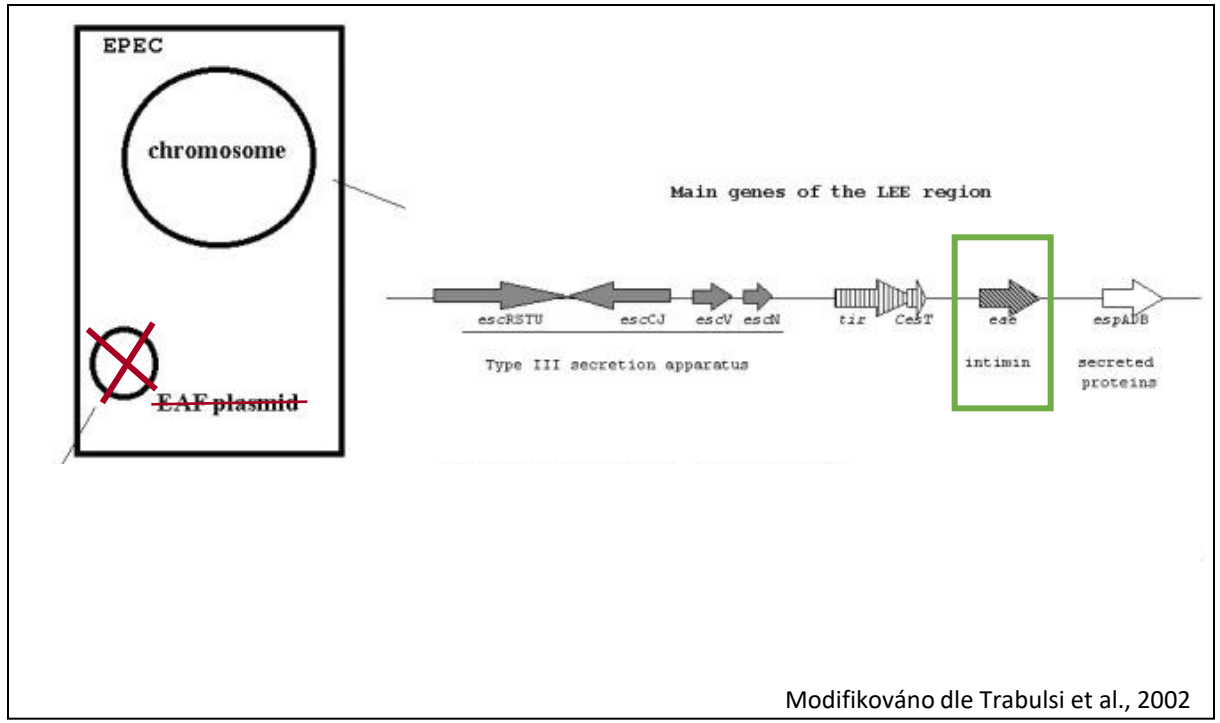
Resorpční epitel infekce EPEC => destrukce mikroklků

A/E lesions; Nataro and Kaper, 1998

Typické vs. atypické EPEC



Trabulsi et al., 2002



Modifikováno dle Trabulsi et al., 2002

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, průjem 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

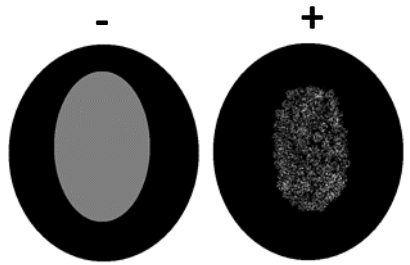
- **Chromosom - ostrov patogenity LEE**: Intimin, Tir, sekreční systém typu III, efektorové proteiny
- **Plazmid EAF CHYBÍ**
- **Výskyt:** rozvinuté země mírného pásma (i ČR), průjem u dětí < 2-3 let
  rozvojové země teplého pásma
- **Rezervoár:** zvířata (domácí – dobytek)
- **Přenos:** Kontaminované potraviny, voda, přímý kontakt
- **Sérotypy:** O26:H11, O55:H7, O111:H8, O119:H2, O125:H6, O128:H2

Mikrobiologická diagnostika EPEC

Materiál: stolice - rektální výtěr

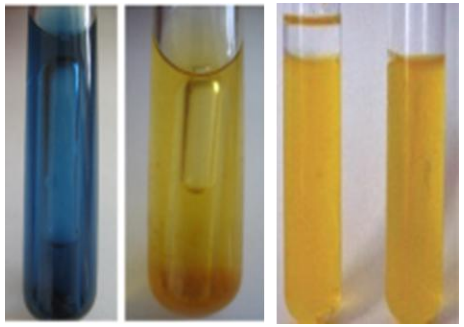
- **Kultivace**
- Krevní agar (nehemolytické)
- Endo, MacConkey agar – většinou laktóza-fermentující (růžové kolonie) => nelze odlišit od fyziol. střevní flóry

- **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

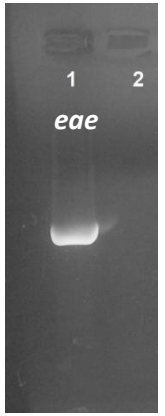
  - MALDI-TOF = identifikace dle hmotnostního spektra proteinů



Zkumavkové testy

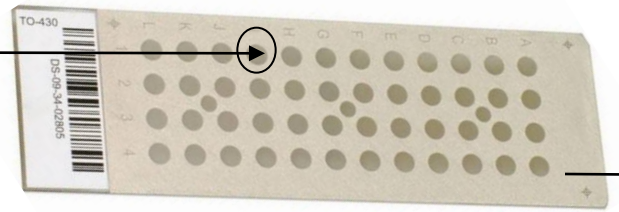
API systém Biomérieux

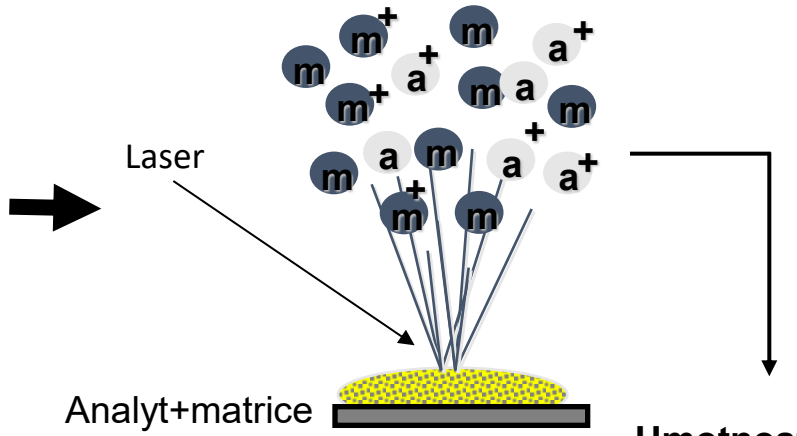
- U susp. kolonií EPEC průkaz *eae* genu kódujícího intimin pomocí PCR (NRL pro *E. coli* a shigely)



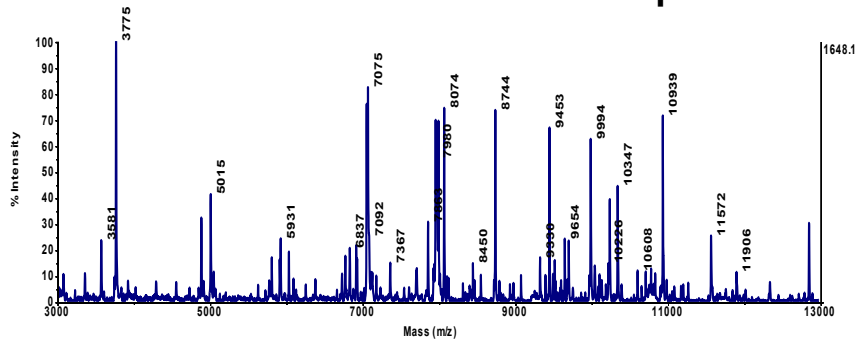
MALDI-TOF

- **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 určeni druhu – testují se kolonie rovnou z primokultury na pevné půdě
  => výsledek během MINUT => extrémní urychlení dg (a v případě potřeby zahájení cílené terapie)!





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 kolonie automat. porovnáním jejího spektra s databází MALDI-TOF



Enterohemoragické *Escherichia coli* (EHEC)

- **Nejzávažnější skupina diarhogenních *E. coli* – průjem i celkové onemocnění!**

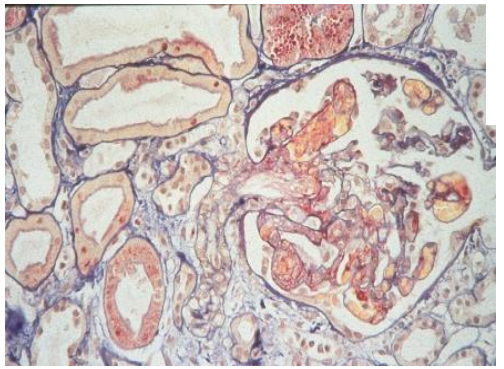
- **Výskyt: celosvětový** (rozvinuté i rozvojové země)

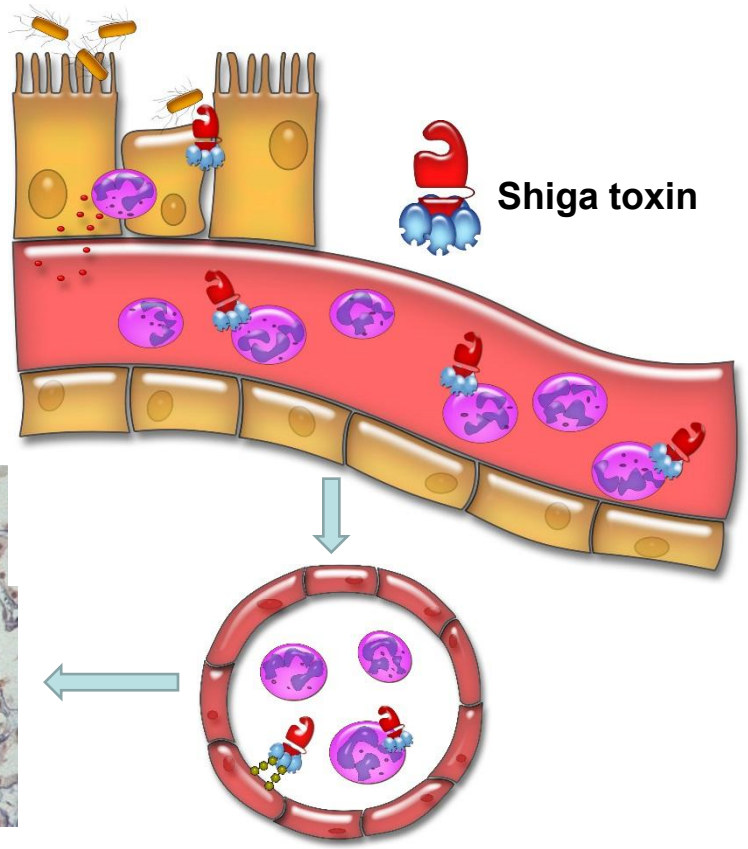
- **Onemocnění**

- 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 => absorbce Stx do oběhu
  => poškození endotelu glomerulárních kapilár
  => agregace trombocytů a fibrinu => tromby
  => glomerulární trombotická mikroangiopatie
  (histopatologický podklad HUS)





HUS klinika a pozdní následky

- **Klinika a laboratorní nálezy:**

- **Hemolytická anemie**
  (hemoglobin < 10 g/l, schistocyty v perif. krevním nátěru)

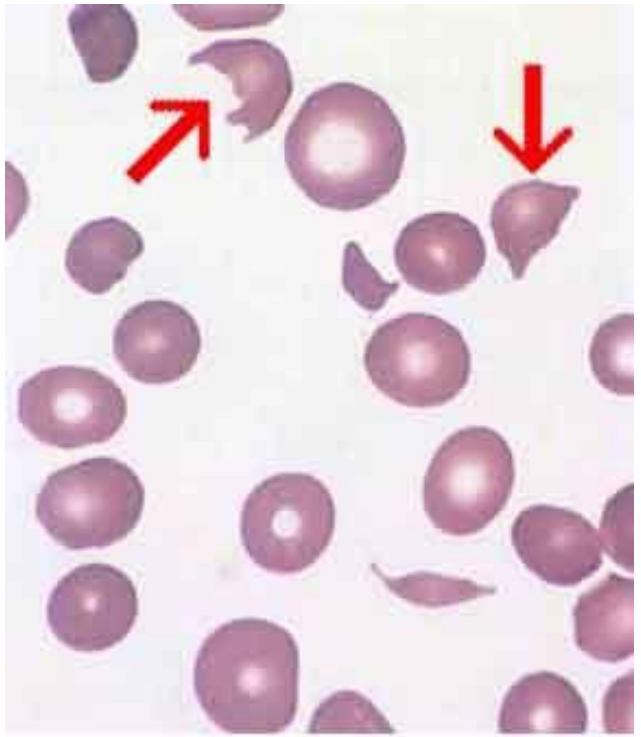
- **Thrombocytopenie**
  (počet trombocytů < 150 x 10^9/l)

- **Akutní renální selhání**
  (zvýšený sérový kreatinin a urea)

  - **HUS je nejčastější příčinou akutního renálního selhaní u dětí!**

  - Smrtnost akutního onemocnění 1 - 3%

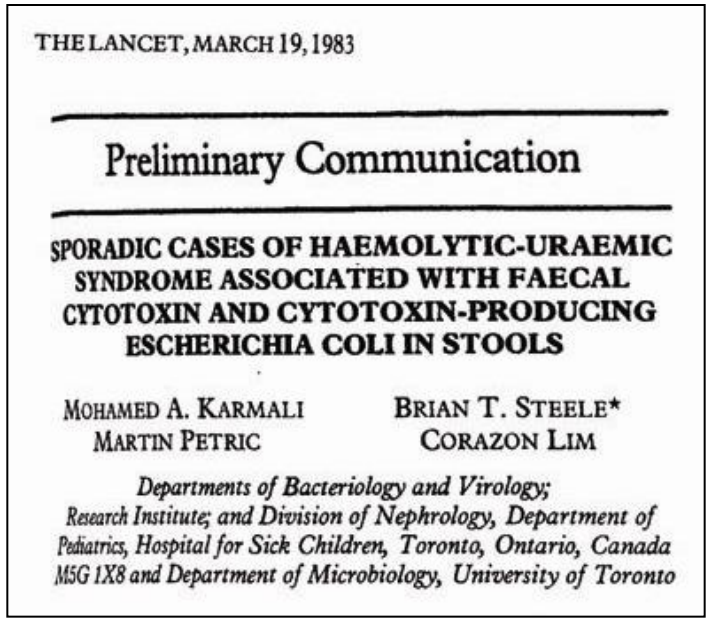
  - **Pozdní následky – až u 30% pacientů za 5 i více let po akutním onemocnění:**
    Proteinurie, hypertenze, chron. renální selhaní => dialýza, transplantace ledvin



Schistocytes / Helmet Cells

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

EHEC (STEC, VTEC) - historie



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 BRIAN T. STEELE*
MARTIN PETRIC CORAZON LIM

Departments of Bacteriology and Virology; Research Institute; and Division of Nephrology, Department of Pediatrics, Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada M5G 1X8 and Department of Microbiology, University of Toronto

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

SPECIALTIES TOPICS MULTIMEDIA CURRENT ISSUE LEARNING/CME AUTHOR CENTER PUBLICATIONS

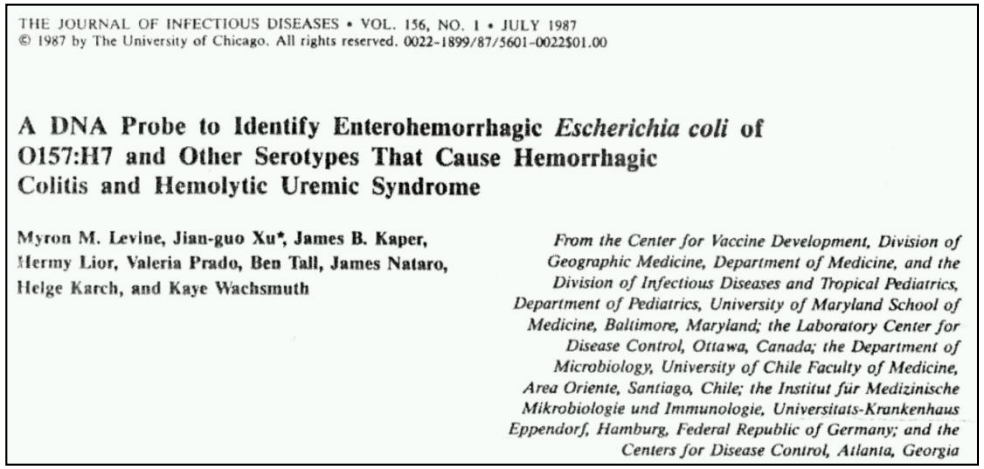
ORIGINAL ARTICLE | ARCHIVE

Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia coli* Serotype

Authors: Lee W. Riley, M.D., Robert S. Remis, M.D., M.P.H., Steven D. Helgerson, M.D., M.P.H., Harry B. McGee, M.P.H., Joy G. Wells, M.S., Betty R. Davis, M.S., Richard J. Hebert, M.D., Ellen S. Olcott, R.N., Linda M. Johnson, R.N., M.S., Nancy T. Hargrett, Ph.D., Paul A. Blake, M.D., M.P.H., and Mitchell L. Cohen, M.D. Author Info & Affiliations

Published March 24, 1983 | N Engl J Med 1983;308:681-685 | DOI: 10.1056/NEJM198303243081203

VOL. 308 NO. 12



THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES • VOL. 156, NO. 1 • JULY 1987

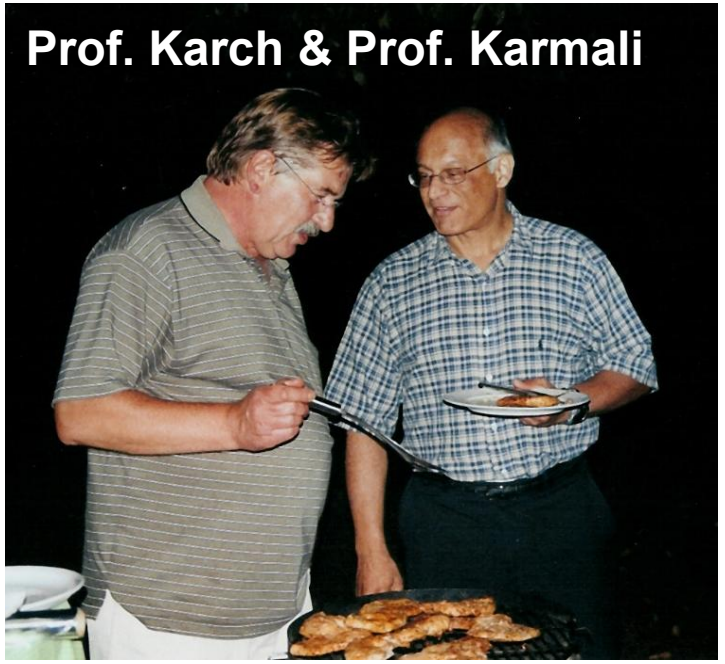
© 1987 by The University of Chicago. All rights reserved. 0022-1899/87/5601-0022$01.00

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, Hermy Lior, Valeria Prado, Ben Tall, James Nataro, Helge Karch, and Kaye Wachsmuth

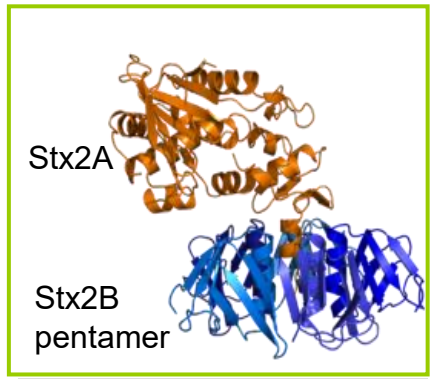
From the Center for Vaccine Development, Division of Geographic Medicine, Department of Medicine, and the Division of Infectious Diseases and Tropical Pediatrics, Department of Pediatrics, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland; the Laboratory Center for Disease Control, Ottawa,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

- **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



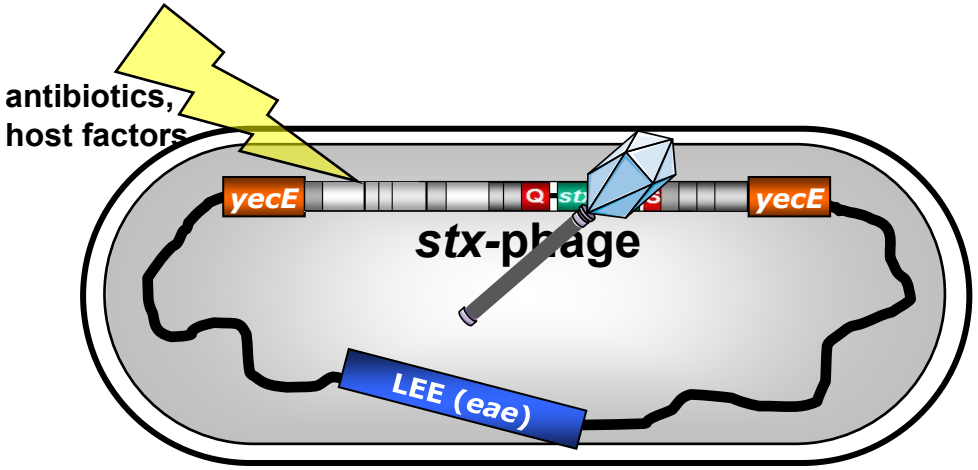
Shiga toxiny (Stx)

AB_5 toxiny = 1 biologicky aktivní A podjednotka (N-glykosidázová aktivita => ribozomy => inhibice proteosyntézy)
+ pentamer vazných B podjednotek (vazba k receptoru Gb3 na hostitelských buňkách)



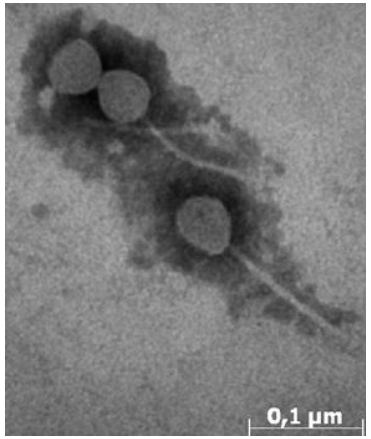
Krystalická struktura Stx

- **2 hlavní typy Stx:** Stx1, Stx2
  Řada subtypů
  Stx1a, Stx1c, Stx1d
  Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d**,** Stx2e, Stx2f, Stx2g…..
  => Stx2a nejčastěji produkován kmeny vyvolávajícími HUS
- **Shiga toxiny kódovány *stxA-stxB* operonem lokalizovaným na temperovaném bakteriofágu**
- Faktory aktivující stresovou odpověď (UV záření, ATB, střevní prostředí) indukují *stx*-fága => přechod z lyzogenního stavu do lytické fáze => uvolnění *stx*-fága z chromozomu



Bakteriální lýza
- možnost přenosu *stx*-fága na další kmeny *E. coli*
- **uvolňování Stx z bakterií**

⇒ ***faktory vedoucí k indukci stx-fága zvyšují množství Stx ve střevě!***



stx-bakteriofág

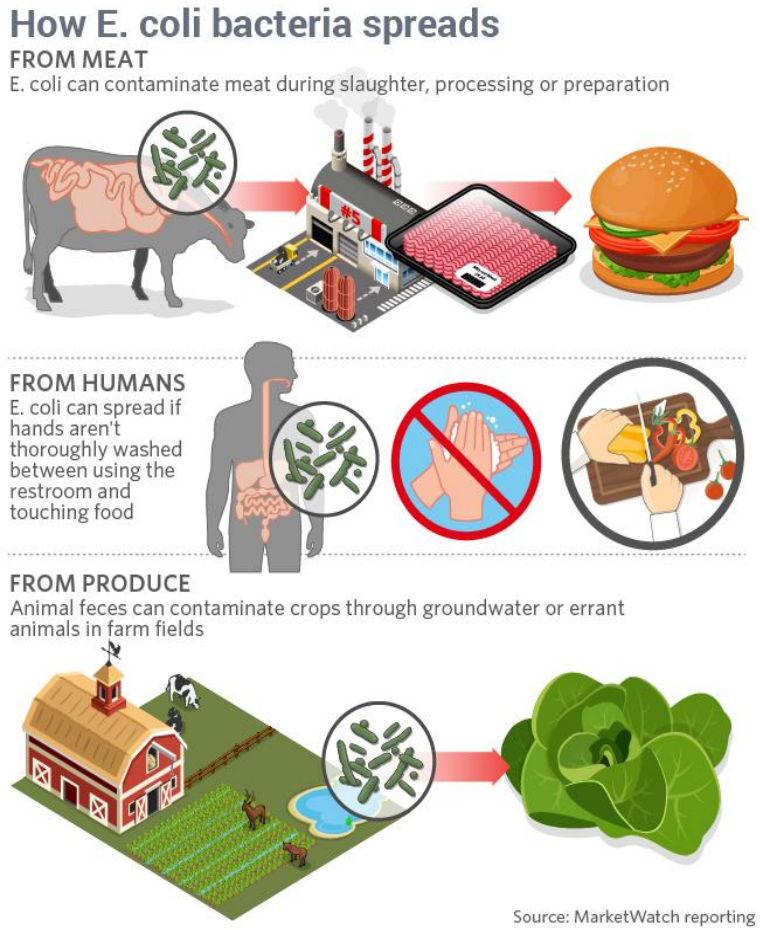
Epidemiologie EHEC infekcí

- **Hlavní rezervoár:** hovězí dobytek, ovce, kozy, prasata,
- ale i divoká zvířata a ptáci

- **Zdroj a přenos:**

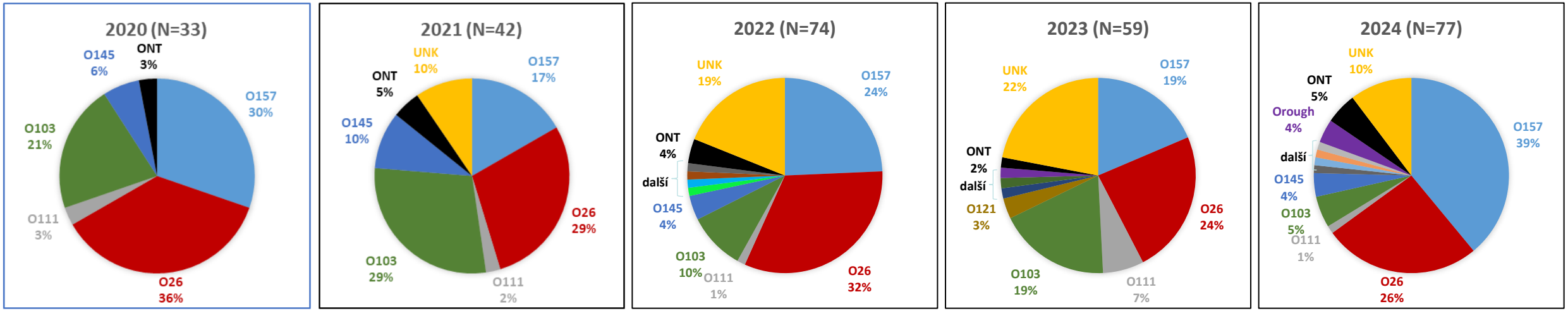
- Kontaminované (při porážce) a nedostatečně tepelně opracované maso (hovězí - hamburgery), nepasterizované mléko
- Fekálně kontaminované syrové (a nedostatečně omyté) plodiny - zelenina, ovoce, klíčky
- Fekálně kontaminovaná voda
- Přímý kontakt se zvířaty (farma, zoo)
- Přímý kontakt s pacientem či nosičem (nedostatečná hygiena rukou)

Infekční dávka: 10-100 baktérií (nízká!)



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

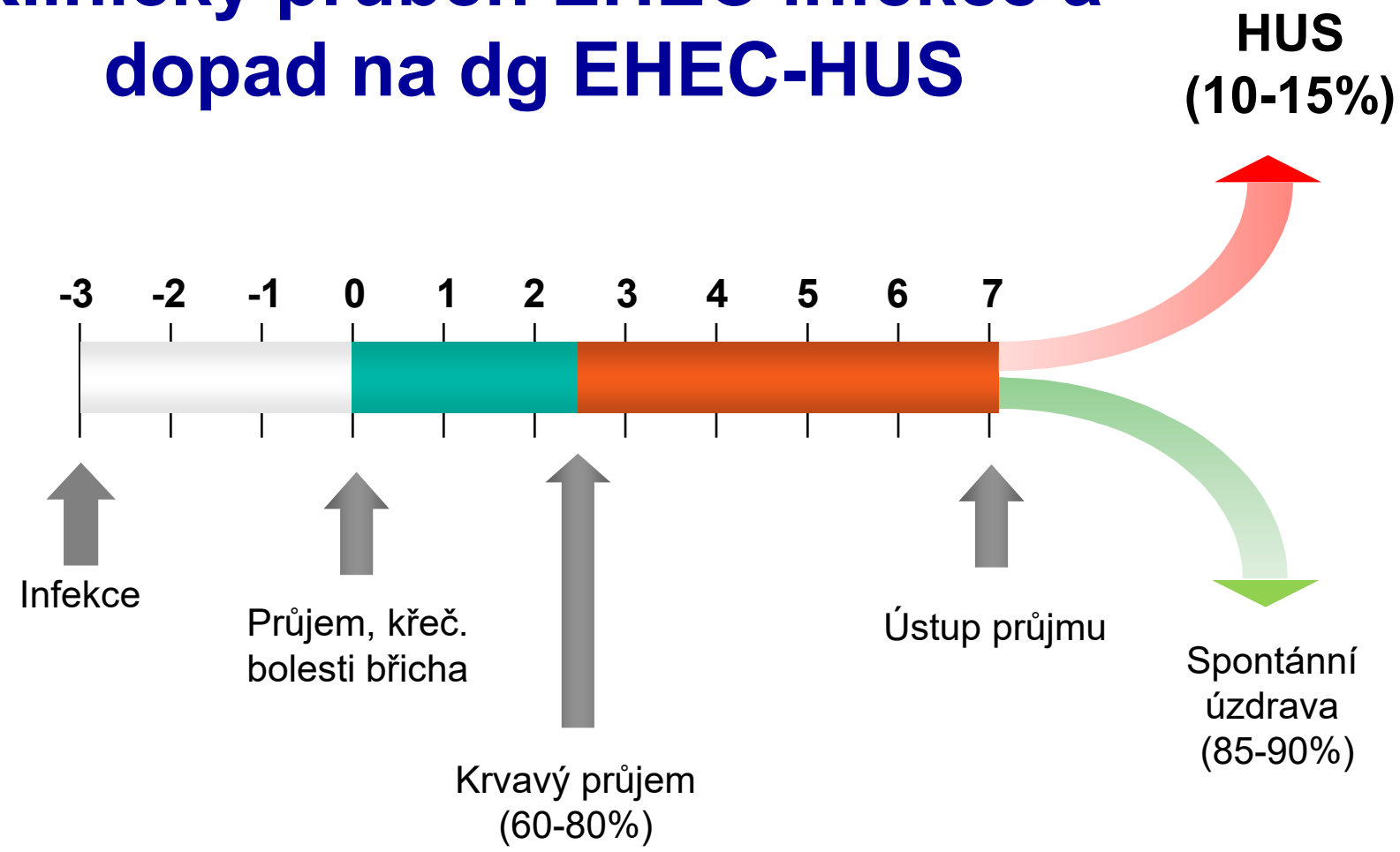
Zastoupení séroskupin EHEC (%) u humánních případů EHEC infekce (n=285) v letech 2020-2024



- **<u>„Top five“ EHEC</u> (převládají ve světě i v ČR)**

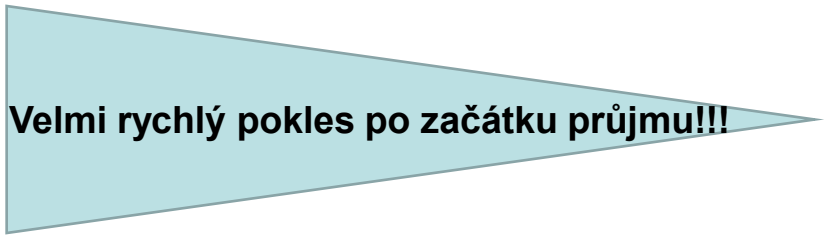
- **O157:H7/H$^-$**
- **O26:H11/H$^-$**
- **O103:H2**
- **O111:H8/H$^-$**
- **O145:H28/H25/H$^-$**

Klinický průběh EHEC infekce a dopad na dg EHEC-HUS



Adaptováno z Tarr et al., Lancet, 2005

Kvantum EHEC ve stolici



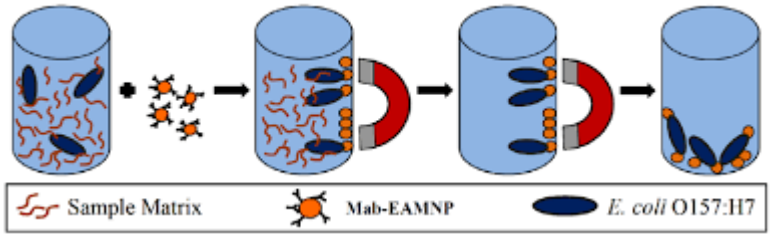
Nutnost užití vysoce citlivých selektivně-dg metod pro průkaz a izolaci EHEC u pacientů s HUS!
(=> NRL pro E. coli a shigely)

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

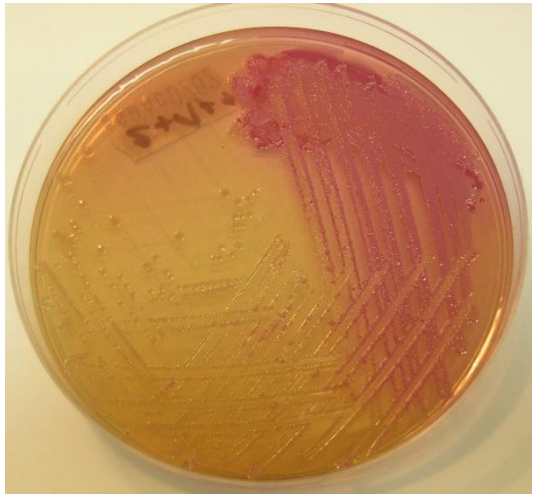
Materiál: Stolice (vzorek, ne pouze rekt. výtěr)

Pomnožení (Hajna bujon bez/s Novobiocinem)

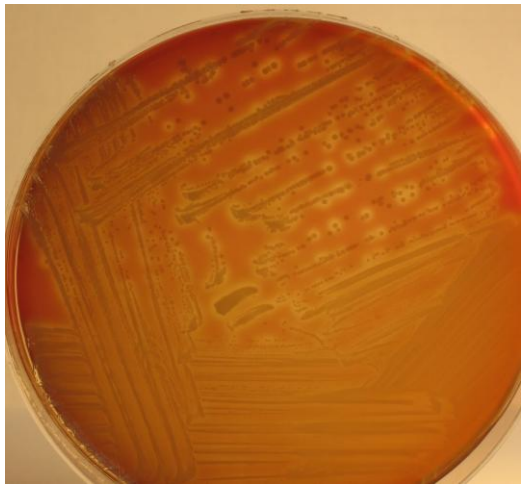
Imunomagnetická separace (IMS) „top five“
(O26, O103, O111, O145, O157)
=> Selektivní koncentrace „top five“ STEC



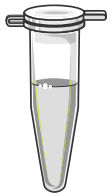
Kultivace po IMS na:
- KA
- Sorbitol MacConkey agar (SMAC)
- CT-SMAC (SMAC s cefiximem a teluritem)
- Enterohemolysinový agar



SMAC, CT-SMAC
O157:H7 bezbarvé
Ostatní “top five“ růžové

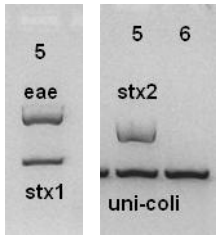


Enterohemolysinový agar
Všechny “top five“ = enterohemolytický fenotyp (neúplná hemolýza)



Stažení části kultury ze SMAC, CT-SMAC a E-Hly agaru do dH_2O

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



PCR EHEC

***stx*$_1$**
***stx*$_2$**
eae
EHEC-*hly*

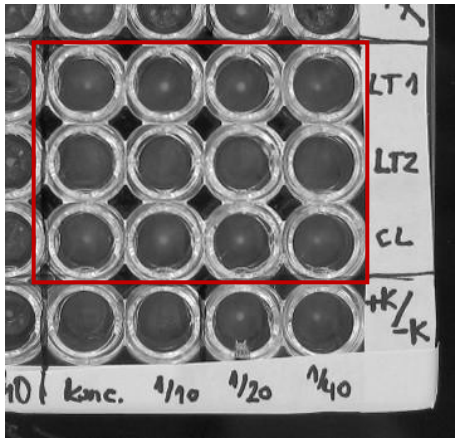
stx+

Fenotypová charakterizace:
Potvrzení *E. coli* (bioch., MALDI-TOF)
Sérotypizace (sklíčk. 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

- **Průkaz infekce EHEC u pacienta s HUS je rozhodující pro volbu správného terapeutického postupu**
  (ten 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 přimo ve stolici (rychlé, ale nízká citlivost!) nebo v pomnožené kultuře

➢ **Stx ELISA** (několik komerčních kitů):
- Detekce Stx1+Stx2 společně – nerozlišeny
- Premier EHEC (Meridian)
- RidaScreen Verotoxin (R-Biopharm)

➢ **Imunochromatografie**
- Detekce Stx1 a Stx2 zvlášť => rozlišují Stx1 a Stx2
  => klinicky důležité – produkce Stx2 spojena se zvýšeným rizikem rozvoje HUS!

➢ **Průkaz genů kódujících Stx1 a Stx2 (PCR)** – součást komerčních enterických panelů (dg *E. coli* patotypů a jiných střevních patogenů)

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

Hlášení infekcí vyvolaných EHEC

➢ **Izolace EHEC se povinně hlásí do:**

- **Informačního systému infekčních nemocí (ISIN)**
- **Evropského surveillance systému TESSy v ECDC (Evropské centrum pro kontrolu infekčních nemocí, Stockholm)**

=> národní i celoevropská evidence

Léčba onemocnění vyvolaných EHEC

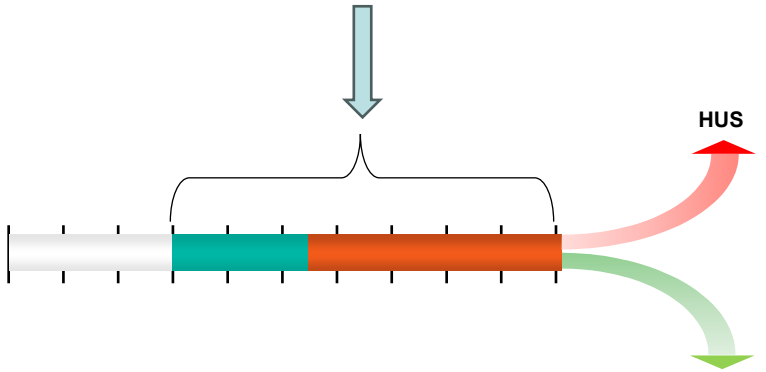
- **Průjem**

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

- **HUS**

Kauzální léčba již rozvinutého HUS neexistuje!

Pouze podpůrná léčba (dialýza, transfuze erytrocytů, atd.)



- **Prevence HUS ve stadiu průjmu**

- **Early volume expansion** (= včasné i.v. podání izoton. roztoků) => prevence ischem. orgánových změn a CNS komplikací
- **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** => snížení kvanta Stx ve střevě - nutno podat co nejdříve po začátku průjmu! (v praxi zatím neužívány, pouze klin. studie)

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**

=> endemické, 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 (travelers´ diarrhea)** – průjmová onemocnění turistů, kteří se nakazili při pobytu v oblastech vysokého výskytu ETEC
- obvykle mírný průběh, neohrožují život

- **Zdroj infekce**

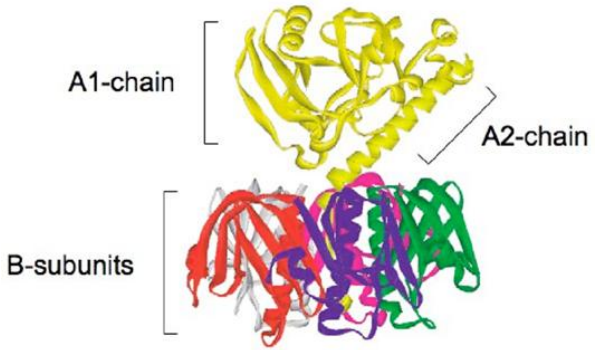
- Fekálně kontaminovaná voda a potraviny (infekční dávka ca. 10^9 baktérii)

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

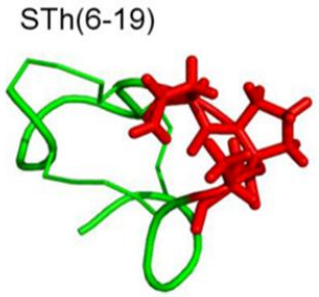
- **Léčba**

- Rehydratace (náhrada vody a elektrolytů)!

ETEC



Struktura LT (Lena Jansson, 2009)

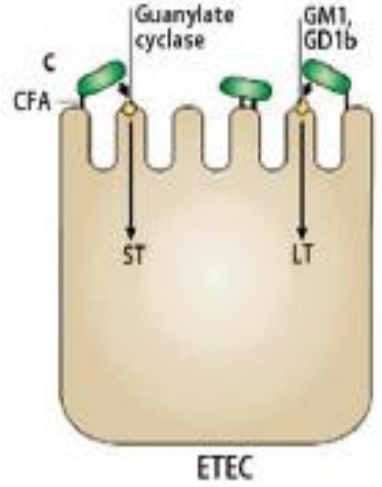


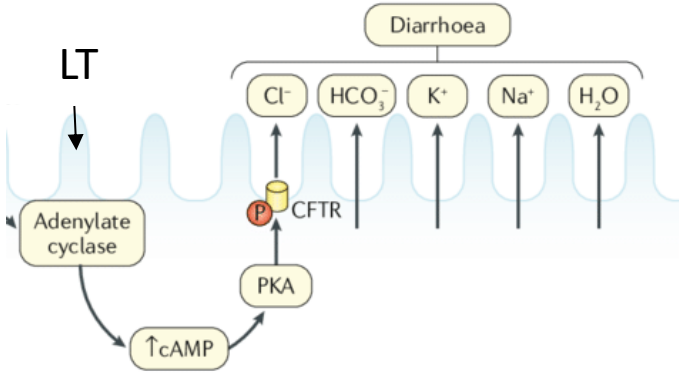
Struktura STh (Matecka et al., 2008)

- **Faktory virulence (kódované na plasmidech):**
  - Enterotoxiny – termolabilní (LT), termostabilní (STa)
  - Adheziny (kolonizace tenkého střeva)

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

- LT (podobný cholerovému toxinu, AB_5 toxin)
  => aktivace adenylcyklázy => zvýšení cAMP
- STa (oligopeptid)
  => aktivace guanylcyklázy => zvýšení cGMP





⇒ Porucha transportu iontů (Na^+,K^+) =>
⇒ zvýšená sekrece H_2O z buněk
⇒ **vodnatý průjem** (střevní tekutina bez příměsi krve, hlenu, hnisu)

ETEC

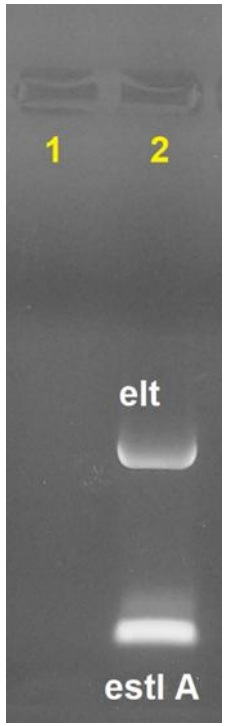
Mikrobiologická diagnostika

- **Materiál**: rektálni 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 (persistentni) průjmy u dětí => malnutrice, poruchy růstu, smrt

- I rozvinuté země
  - Průjmy cestovatelů (importované infekce)
  - Akutní a chronické průjmy u imunokompromitovaných osob (HIV pacienti)
  - Průjmy dětí

- **Zdroj infekce**
- Kontaminovaná voda a potraviny
- Mezilidský přenos (infekční dávka 10^6 baktérii)

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

EAEC

- **Faktory virulence:**
- Heterogenní sady faktorů virulence – kmenově specifické
- Společné pro všechny EAEC **agregativní fimbrie (AAF)**

  => umožňují adherenci ke střevnímu epitelu i mezi bakteriemi

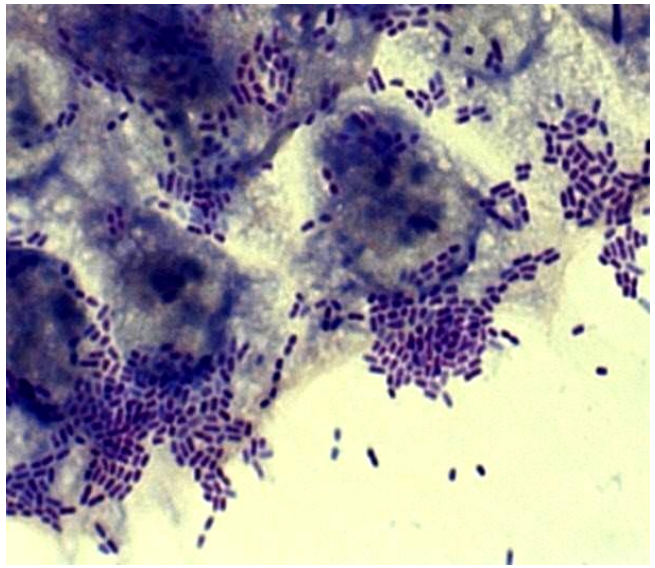
  => velké agregáty baktérii na povrchu epitelu

- **Patogeneze**
- Agregativní adherence hlavní patogenetický mechanismus

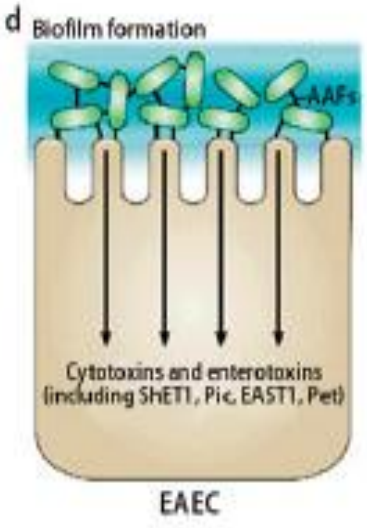
  => velká kvanta adherujících bakterii produkují toxiny (enterotoxiny, cytotoxiny, atd.) a další produkty

  => poškození střevního epitelu => redukce resorpční schopnosti

=> **Chronický průjem a malnutrice**



Adherence EAEC ke kultivovaným střevním epitelovým buňkám linie Caco-2 (zdroj: NRL/ECS)



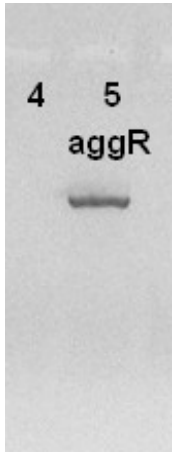
EAEC

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



Enteroinvazivní *E. coli* (EIEC)

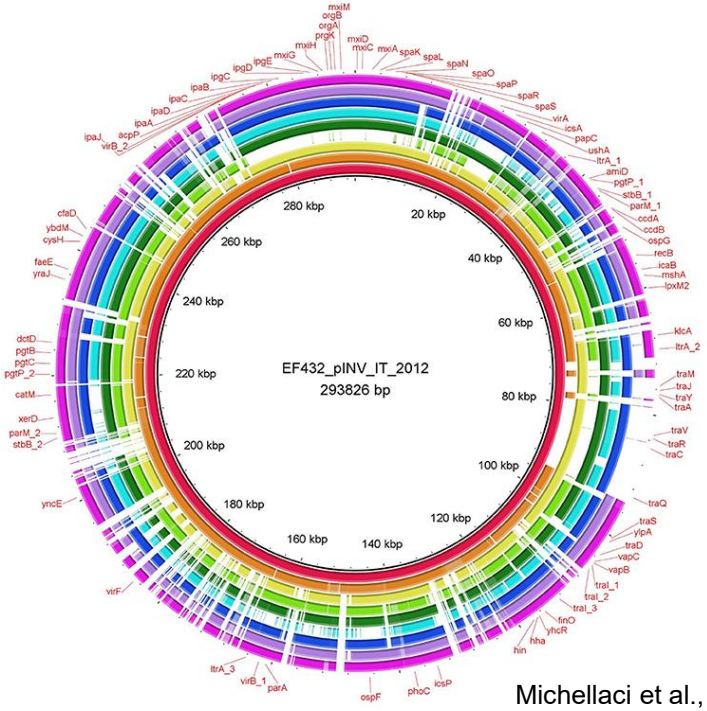
- **Onemocnění a výskyt**
- **Onemocnění podobné shigelóze** = průjmy s příměsí hlenu a krve, břišní křeče, zvracení, horečka – děti i dospělí

- **Hlavní výskyt rozvojové země teplého pásma s nízkým hyg. standardem**
- Vzácné v rozvinutých zemích mírného pásma (většinou 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 baktérii)

- **Léčba**
- Rehydratace
- Antibiotika (dle citlivosti v případě nutnosti)

EIEC



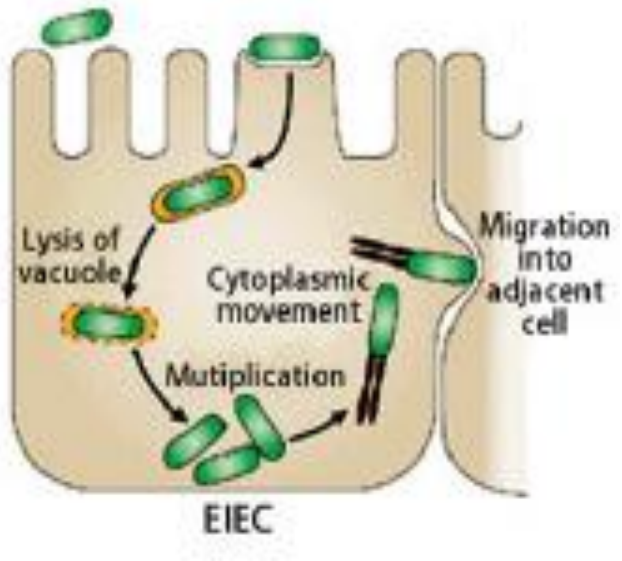
Michellaci et al., 2020

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

- **Patogeneze**
- <u>Fakultativně intracelulární patogén</u>
  (na rozdíl od ostatních diarhogenních *E. coli*)!

- <u>Invaze</u> do epitelových buněk <u>tlustého střeva</u> hlavní patogenetický mechanismus!
  => intracelulární množení => šíření baktérii z buňky do buňky
  => destrukce epitelu => slizniční léze
  => zánětlivá infiltrace sliznice

- **Průjem s příměsi 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)

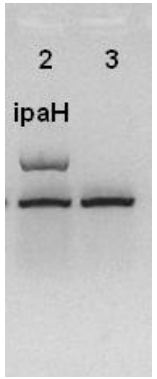
- **Identifikace**

  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 možné pouze pomocí dlouhé řady bioch. testů (odlišné laktát-dehydrogenáza, acetát, mukát) – pozit. u EIEC, negat, u shigel
  - MALDI-TOF – neodliší EIEC od shigel! – výsledek: *E. coli*/shigella
  - 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 - zkřížené reakce se shigelami

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

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

zdroj: Pathogenic Escherichia coli, Caister Academic Press, 2014

Hybridní patotypy *E. coli*

- Obsahují kombinaci faktorů virulence více patotypů

- Ve zvýšené míře identifikovány s rozvojem celogenomového sekvenování (WGS)

Podmínky umožňující vznik hybridních patotypů

- Lokalizace genů kodujících faktory virulence *E. coli* na mobilních genetických elementech (bakteriofágy, plasmidy)

- Častá výměna těchto genů mezi různými patotypy v GIT pacienta nebo zvířecího reservoiru => vyšší pravděpodobnost vzniku hybridů je u patotypů, které mají zvířecí rezervoár

- Často jsou hybridy zvýšeně patogenní, protože obsahují novou, neobvyklou, kombinaci faktorů virulence

- Klinicky nejzávažnější jsou hybridy produkující Shiga toxin = hybridy EHEC a dalších patotypů (EHEC/EAEC, EHEC/ETEC, EHEC/ExPEC = extraintestinálně patogenní *E. coli*)

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

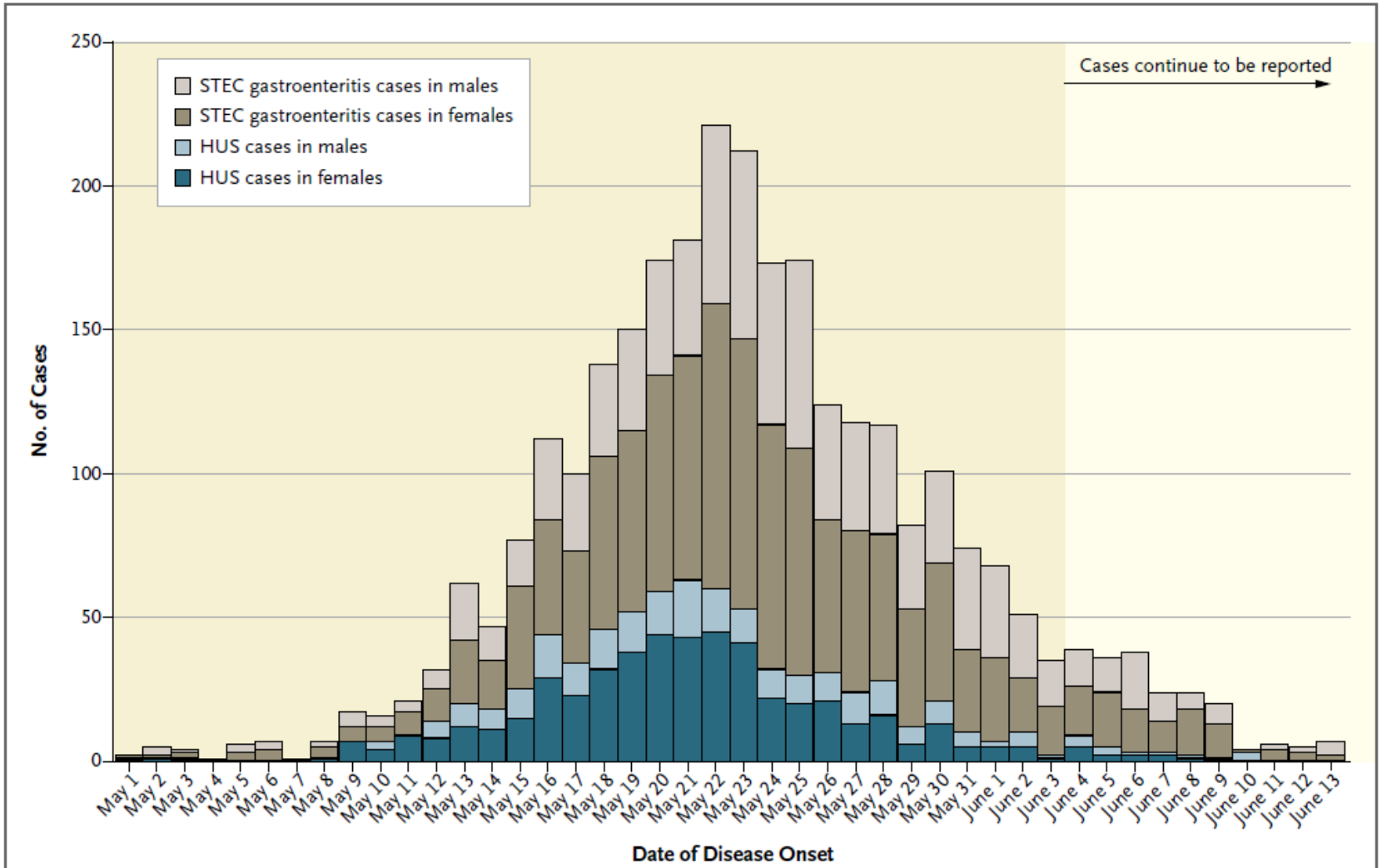


Figure 1. Epidemiologic Curve of the Outbreak.

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.

Frank et al., N. Engl. J. Med., 2011

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

↓

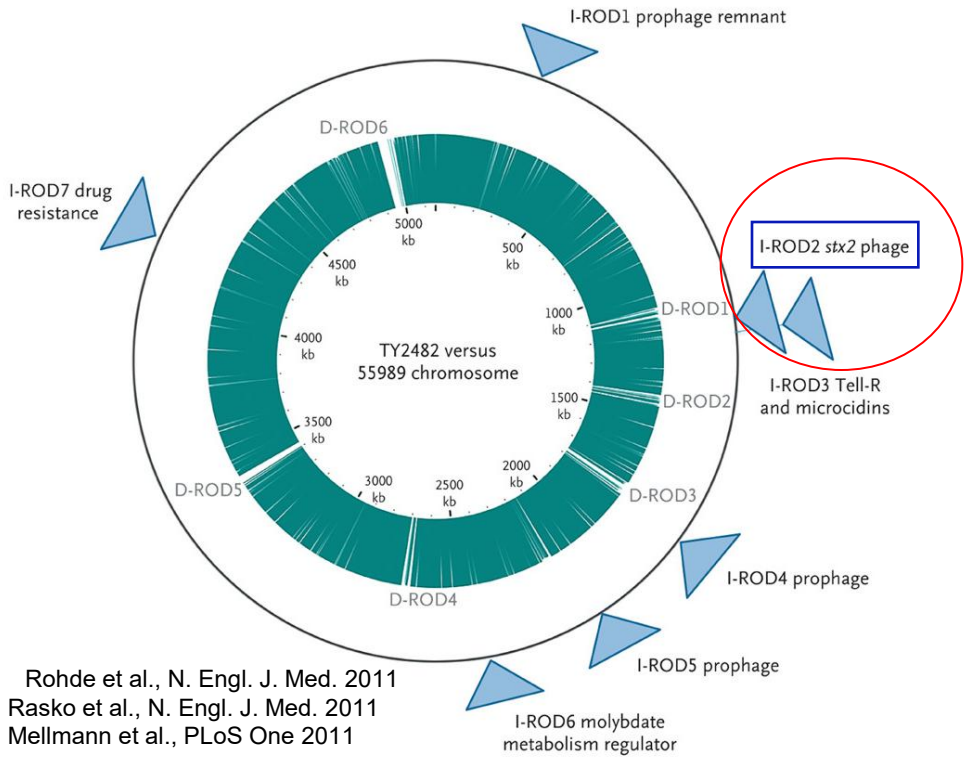
Největší a nejzávažnější epidemie HUS v historii!

Zdroj:
klíčky pískavice řecké seno
- přidavané do salátů
(kontaminovaná semena dovezena z Egypta)

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

Hybrid EHEC/EAEC, sérotyp O104:H4

- **Vznik:** EAEC O104:H4 lyzogenizovaný bakteriofágem nesoucím gen *stx2* kódujícím Stx2

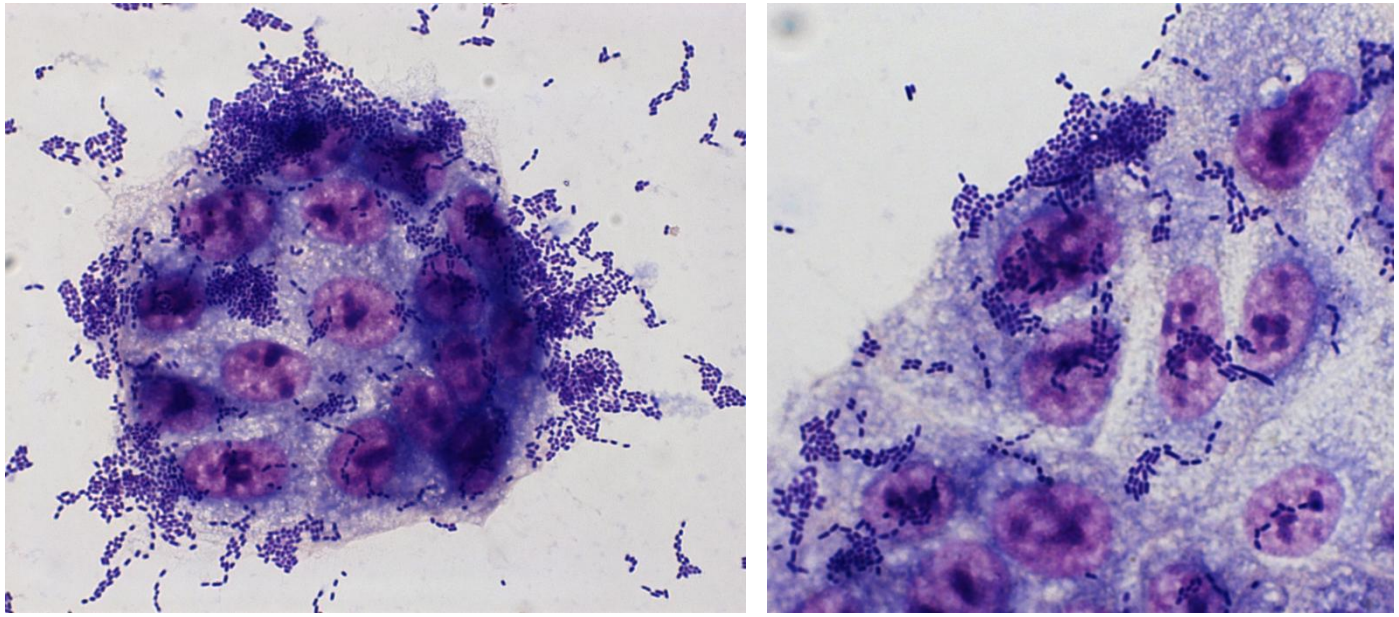


Rohde et al., N. Engl. J. Med. 2011
Rasko et al., N. Engl. J. Med. 2011
Mellmann et al., PLoS One 2011

Celogenomové sekvenování (WGS) O104:H4 epid. kmene:
- Core (základní) genom typický pro EAEC, plasmidy EAEC
=> typické faktory virulence EAEC => schopnost intenzivní adherence ke střevnímu epitelu
- do chromosomu integrován *stx*$_2$-bakteriofág kódující Stx2

=> **EHEC/EAEC hybrid**

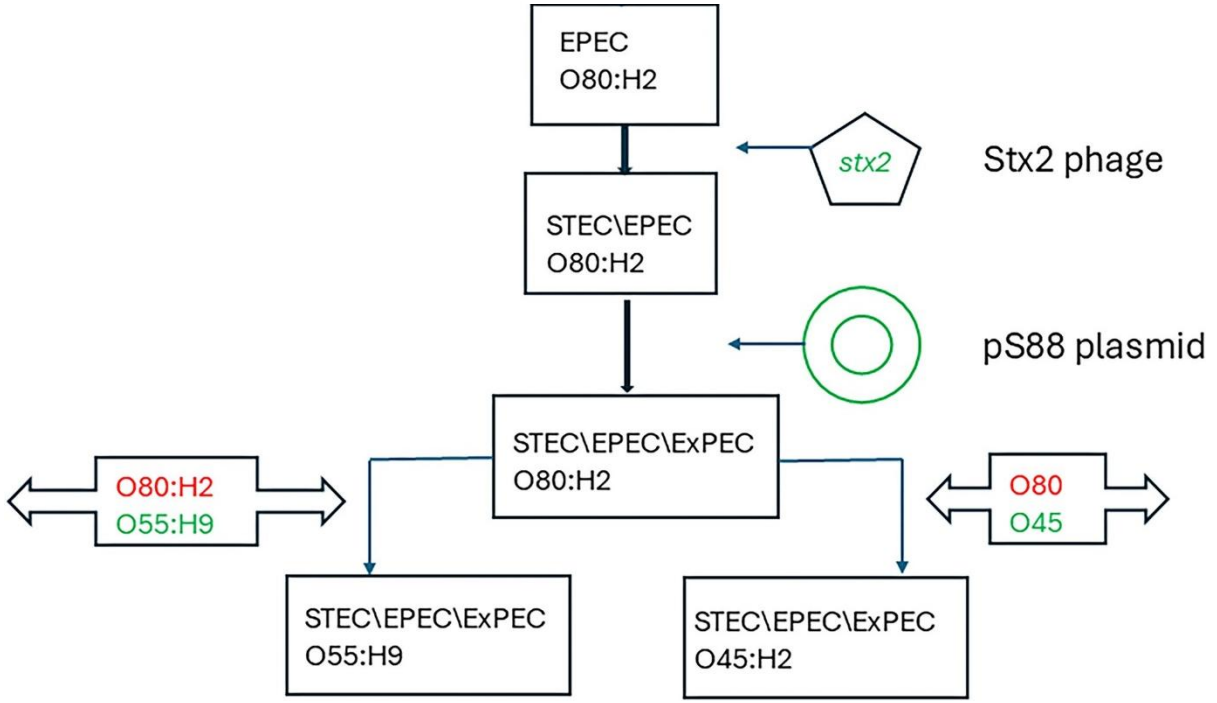
Hypotéza: Masivní adherence ke střevní sliznici zvýšila množství Stx2 absorbované do krevního oběhu
=> **Vysoká virulence - progrese infekce do HUS 22%!**



Adherence EHEC/EAEC O104:H4 ke střevnim epitelovým buňkám (linie HCT-8) (zdroj: Bielaszewska, Uni Muenster)

Hybrid EHEC/ExPEC, sérotyp O80:H2

- Poprvé identifikován v r. 2014 ve Francii u pacienta s HUS
- **Vznik:** EPEC O80:H2, který získal:
- 1) bakteriofága nesoucího gen *stx*$_2$
  2) plasmid (pS88) nesoucí geny ExPEC pro invazi ze střeva do krevního oběhu a přežití v extraintestinálních lokalizacích (pS88 se typicky vyskytuje u ExPEC, které vyvolávají meningitidy, sepse, infekce moč. cest a kóduje systémy pro utilizaci železa, serum rezistence, hemolysin)



WGS hybridu EHEC/ExPEC O80:H2

- Core genom typický pro EPEC
⇒ do chromosomu integrován *stx*$_2$-bakteriofág kódující Stx2
⇒ získán plasmid nesoucí faktory virulence ExPEC a kazetu genů kódujících rezistenci k několika ATB (multirezistenci)

Přítomnost faktorů virulence ExPEC umožňuje invazi hybridu O80:H2 mimo střevo (na rozdíl od EHEC!!!) a vznik extraintestinálních komplikací (bakteriémie, multiorgánové selhání)

⇒ Vysoká virulence, těžké, fatální případy HUS s atypickým průběhem

⇒ **Výskyt**: řada evropských zemí (Francie, Holandsko, Německo, Rakousko, Dánsko, UK) **=> emerging pathogen!**
⇒ v ČR zatím 1 kmen izolovaný v r. 2022 od dítěte s HUS

⇒ Další hybridy EHEC/ExPEC: O55:H9, O45:H2

Modifikováno z Jenkins et al., J. Appl. Microbiol., 2025

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 baktérii)
- Kontaminovaná voda a potraviny

➢ Léčba

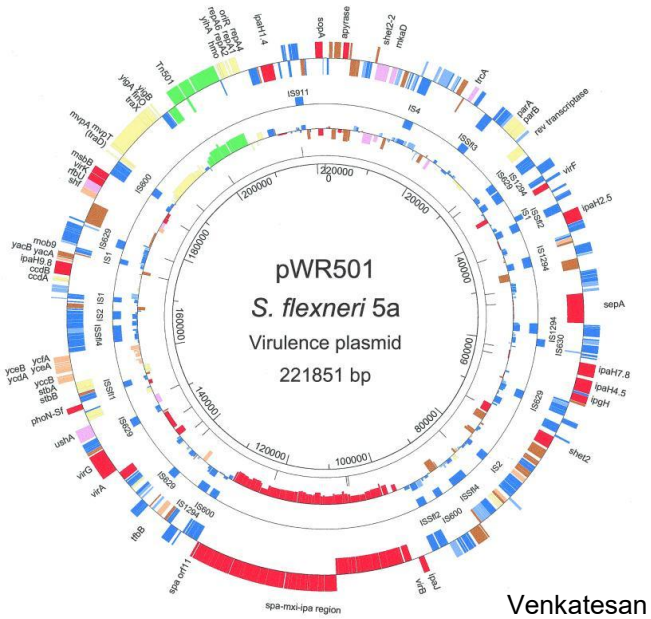
- Rehydratace
- Antibiotika (dle citlivosti); shigely mají tendenci perzistovat intracelulárně!

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

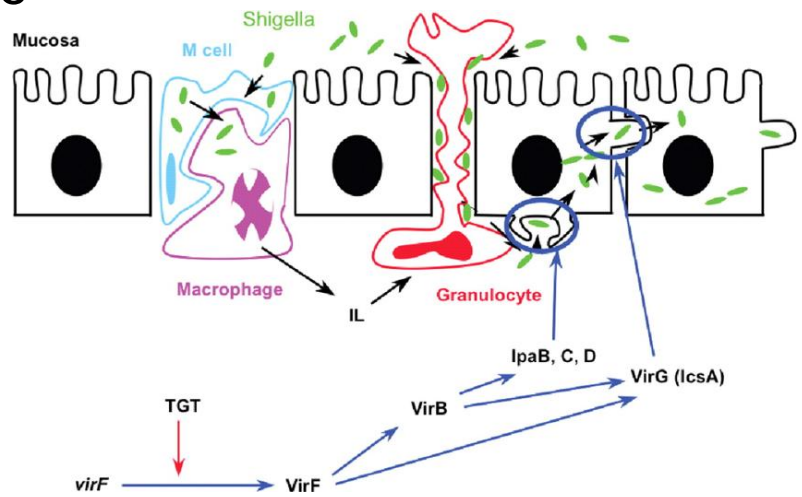


Venkatesan et al., 2001

➢ **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 příměsi 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

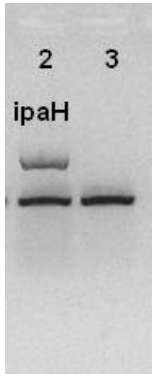
➢**Identifikace**

Obtížně odlišitelné od EIEC, s nimiž mají společné genetické, fenotypové a antigenní vlastnostnosti 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 ☺