

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Katedra biologických a biochemických věd

Výskyt verotoxinogenních *E. coli* v EU

Michaela Jílková

Bakalářská práce

2019

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Michaela Jílková**  
Osobní číslo: **C16245**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Výskyt verotoxinogenních *E. coli* v EU**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Popište obecné vlastnosti bakterie druhu *E. coli*.
2. V práci uveďte patogenní druhy a jejich členění do skupin.
3. Uveďte onemocnění způsobené verotoxinogenními kmeny *E. coli*.
4. Z dostupné literatury najděte epidemie způsobené verotoxinogenními kmeny *E. coli*.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Iveta Brožková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 2.7.2019

Michaela Jílková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. za odborný dohled, spolupráci, trpělivost a čas, který mi věnovala při psaní bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala rodině a všem přátelům, kteří mi poskytli podporu po celou dobu mého studia.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce se zabývá bakterií *E. coli*. Na začátku práce jsou popsány základní vlastnosti bakterie a rozdělení patogenních druhů do skupin. Ve třetí kapitole jsou uvedena onemocnění, které způsobují verotoxinogenní kmeny *E. coli*. V poslední části jsou uvedeny epidemie způsobené verotoxinogenními kmeny v Evropské unii.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

*Escherichia*, verotoxin, onemocnění, epidemie

## **TITLE**

The incidence of verotoxinogenic *E. coli* in the EU

## **ANNOTATION**

The bachelor thesis deals with the bacterium *E. coli*. At the beginning of the work are described the basic properties of bacteria and the division of pathogenic species into groups. The third chapter presents the diseases caused by the verotoxinogenic strains of *E. coli*. The last part presents the epidemics caused by verotoxinogenic strains in the European Union.

## **KEYWORDS**

*Escherichia*, verotoxin, disease, epidemic

# OBSAH

<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	9
<b>ÚVOD</b> .....	11
<b>1 ESCHERICHIA COLI</b> .....	12
1.1 Obecné vlastnosti <i>E. coli</i> .....	12
1.2 Buněčná stěna .....	12
1.3 Antigenní struktura.....	13
1.3.1 O-antigeny.....	13
1.3.2 H-antigeny .....	14
1.3.3 K-antigeny .....	14
1.4 Faktory virulence.....	14
1.4.1 Adheziny.....	15
1.4.2 Endotoxiny.....	15
<b>2 ČLENĚNÍ E. COLI</b> .....	16
2.1 Extraintestinální patogenní kmeny .....	16
2.1.1 Uropatogenní kmeny .....	16
2.1.2 <i>E. coli</i> způsobující neonatální meningitidu.....	17
2.2 Intestinální patogenní kmeny .....	17
2.2.1 Enteropatogenní <i>E. coli</i> .....	17
2.2.1.1 Laboratorní diagnostika enteropatogenní <i>E. coli</i> .....	17
2.2.1.2 Zástupci enteropatogenní <i>E. coli</i> .....	18
2.2.2 Enterotoxigenní <i>E. coli</i> .....	18
2.2.2.1 Enterotoxiny .....	19
2.2.2.2 Laboratorní diagnostika enterotoxigenní <i>E. coli</i> .....	19
2.2.2.3 Zástupci enterotoxigenní <i>E. coli</i> .....	20
2.2.3 Enteroinvazivní <i>E. coli</i> .....	20
2.2.3.1 Laboratorní diagnostika enteroinvazivní <i>E. coli</i> .....	21
2.2.3.2 Zástupci enteroinvazivní <i>E. coli</i> .....	21
2.2.4 Verotoxinogenní <i>E. coli</i> .....	21
2.2.4.1 Verotoxiny .....	23
2.2.4.2 Laboratorní diagnostika verotoxinogenní <i>E. coli</i> .....	24
2.2.4.3 Zástupci verotoxinogenní <i>E. coli</i> .....	25
2.2.5 Enteroagregativní <i>E. coli</i> .....	26
2.2.5.1 Laboratorní diagnostika enteroagregativní <i>E. coli</i> .....	26
2.2.6 Difúzně adherentní <i>E. coli</i> .....	26

2.2.6.1	Laboratorní diagnostika difúzně adherentní <i>E. coli</i> .....	27
2.2.7	Adherentně invazivní <i>E. coli</i> .....	27
2.2.7.1	Laboratorní diagnostika adherentně invazivní <i>E. coli</i> .....	27
<b>3</b>	<b>ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBENÉ VEROTOXINOGENNÍMI KMENY <i>E. COLI</i></b> .....	<b>28</b>
3.1	Hemoragická kolitida .....	28
3.2	Hemolyticko-uremický syndrom .....	28
3.2.1	Klinické projevy .....	29
3.2.2	Patofyziologie .....	30
3.2.3	Diferenciální diagnostika a diagnóza .....	30
3.2.4	Léčba .....	31
<b>4.</b>	<b>EPIDEMIE ZPŮSOBENÉ VEROTOXINOGENNÍMI KMENY <i>E. COLI</i></b> .....	<b>33</b>
4.1	Epidemie způsobená sérotypem O104:H4 .....	33
4.2	Epidemie způsobená sérotypem O26:H11 .....	34
4.3	Epidemie způsobená sérotypem O157:H7 .....	34
<b>ZÁVĚR</b>	.....	<b>36</b>
<b>ZDROJE</b>	.....	<b>37</b>



## SEZNAM ZKRATEK

A/E léze - vazebné a efekční léze

Afa/Dr adheziny - afimbriální adheziny

AIEC - adherentně invazivní *E. coli*

aPEC - atypické kmeny enteropatogenní *E. coli*

CFU - kolonie tvořící jednotky v 1 ml

CNS - cévní nervová soustava

DAEC - difúzně adherentní *E. coli*

EAEC - enteroagregativní *E. coli*

ECNM - *E. coli* neonatální meningitidy

EHEC - enterohemoragická *E.coli*

EIEC - enteroinvazivní *E. coli*

ELISA - enzymově vázaný imunosorbentní test

EPEC - enteropatogenní kmeny *E. coli*

ETEC - enterotoxigenní *E.coli*

ExPEC - extraintestinální patogenní kmeny *E. coli*

Gb3 - globotriaosylkeramid

H<sub>2</sub>S - sirovodík

H-antigen - bičíkový antigen

HC - hemoragická kolitida

HEp-2 buňky - standardizovaná buněčná linie odvozená z lidského karcinomu hrtanu

HUS - hemolyticko-uremický syndrom

K-antigen - kapsulární antigen

LPS - lipopolysacharid

LT- tepelně labilní toxin

NaCl - chlorid sodný

O-antigen - tělový antigen

PCR - polymerázová řetězová reakce

ST - tepelně stabilní toxin

STEC - *E. coli* produkující shiga toxin

Stx - shiga toxin

Stx1 - shiga toxin 1

Stx2 - shiga toxin 2

T3SS - sekreční systém typu 3

tEPEC - typické kmeny enteropatogenní *E. coli*

TLR4 - Toll-like receptor

UPEC - uropatogenní kmeny *E. coli*

VEGF - vaskulární endoteliální růstový faktor

VTEC - verotoxinogenní *E.coli*

## ÚVOD

*Escherichia coli* je nejrozšířenější prokaryotický modelový organismus. Bakterie může být pěstována snadno a levně v laboratorním prostředí. *E. coli* byla intenzivně zkoumána více než 60 let a slouží jako významný organismus v oblasti biotechnologie a mikrobiologie pro většinu práce s rekombinantní DNA. Je významným členem střevní mikroflóry člověka, kdy střevní trakt kolonizuje během několika hodin po porodu, poté dochází ke vzájemné symbióze mezi člověkem a bakterií. Schopnost *E. coli* přežít v otevřeném prostředí je složitá, bakterie musí čelit mnoha faktorům, jako je např. teplota, osmolarita, pH, vlhkost a ostatní mikroby.

Komenzální kmeny nezpůsobí onemocnění nebo jen ve výjimečných případech u imunosupresivních hostitelů anebo tam, kde je porušena gastrointestinální bariéra. Patogenní kmeny obsahují specifické virulentní faktory, které způsobují široké spektrum onemocnění. Většina patogenních kmenů se projevuje jako rozsah klinických symptomů a může být snadno klasifikována podle přítomnosti nebo nepřítomnosti klíčových faktorů virulence. U patogenních kmenů rozlišujeme extraintestinální a intrainestinální kmeny. Extraintestinální kmeny způsobují infekci mimo střevní trakt. Všechny intrainestinální patogenní druhy napadají střevní sliznici a vyvolávají průjemové onemocnění. V mé bakalářské práci jsou charakterizovány všechny patogenní druhy, jejich laboratorní diagnostika a nejvýznamnější zástupci. Práce je poté hlavně zaměřena na způsobená onemocnění a výskyt verotoxinogenních kmenů *E. coli*.

# 1 **ESCHERICHIA COLI**

*Escherichia coli* byla dříve známá jako *Bacterium coli*. Dnešní název je odvozen od Theodora von Eschericha, který pocházel z Rakouska a bakterii vyizoloval v roce 1885 (Votava, 2003). *E. coli* se řadí mezi čeled' *Enterobacteriaceae* spolu s dalšími známými bakteriemi jako *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* atd. Kromě druhu *E. coli* jsou známé i druhy *E. vulneris* a *E. hermanii*, které však nenapadají člověka anebo jen ve výjimečných případech (Votava, 2010; Jang *et al.*, 2017).

## 1.1 **Obecné vlastnosti *E. coli***

Většina kmenů bakterie *E. coli* je neškodná, ale některé sérotypy bývají příčinou otravy jídlem u lidí, nejčastěji z důvodu fekální kontaminace. Přirozeně se vyskytuje ve zdravé střevní flóře člověka a živočichů. V jednom gramu stolice může být obsaženo až  $10^8$  mikroorganismů (Tenailon *et al.*, 2010). Hostiteli je i přínosem, protože produkuje vitamín K, který brání vzniku jiných patogenních bakterií ve střevě (Kong a Lee, 2011).

*E. coli* je fakultativně anaerobní koliformní bakterie, která má spoustu společných vlastností s ostatními bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae*. Mezi jednu z nich patří produkce enzymu katalázy a nepřítomnost enzymu oxidázy. V mikroskopu po obarvení dle Grama lze pozorovat 0,5-1  $\mu\text{m}$  široké a 2  $\mu\text{m}$  dlouhé gram-negativní červeně obarvené tyčinky. Bakterie je pohyblivá díky bičíkům, které mají peritrichiální uspořádání (Walker, 1998). Kromě bičíků má na svém povrchu četné fimbrie, které umožňují adhezi a mohou sloužit i jako sex-pili (Julák, 2006).

Bakterie je nenáročná a vyrůstá na jednoduchých médiích. K izolaci kontaminovaných vzorků se používají selektivně diagnostické půdy a k přesnějšímu určení biochemické testy. U *E. coli* si všímáme schopnosti zkvašovat laktózu a neschopnosti produkce sirovodíku ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Štěpí glukózu za tvorby plynu a vytváří indol, neštěpí močovinu. Problém může nastat u bakterií rodu *Escherichia*, které mají opožděnou sacharolytickou aktivitu a mohou se na půdách chovat jako laktóza negativní (Votava, 2003).

## 1.2 **Buněčná stěna**

Buněčná stěna obaluje a chrání celou buňku. Uvnitř gramnegativní bakterie je přetlak až 500 kPa a stěna musí celou buňku držet pohromadě (Julák, 2006). Stěna gramnegativní bakterie a tedy *E. coli* je tenčí a zároveň složitější než u grampozitivních bakterií a tvoří zhruba jen 3 % sušiny buňky. Buněčná stěna se skládá z tenké vrstvy

peptidoglykanu, periplazmatického prostoru a vnější membrány. Vnější membrána je složena z dvojvrstvy fosfolipidů, bílkovin a na peptidoglykan se váže pomocí molekul lipoproteinu. Ve vnější membráně se nachází i lipopolysacharidy, které jsou zodpovědné za antigenní specifitu (Kaprálek, 1986; Huang *et al.*, 2008).

### 1.3 Antigenní struktura

Bakterie má na svém povrchu antigeny, které určují její vlastnosti a podle antigenní struktury se dělí na jednotlivé sérotypy. Sérotypizace aglutinací je založena na tělovém antigenu (O-antigen), bičíkovém antigenu (H-antigen) a kapsulárním antigenu (K antigen). Izolované kmeny se poté označují čísly, například O111:K58:H2 (Julák, 2006).

#### 1.3.1 O-antigeny

O-antigen je somatický lipopolysacharid zakotvený do vnější membrány svým lipopolysacharidem A, který je zodpovědný za endotoxické účinky antigenu. Polysacharidový řetězec určuje složení antigenní struktury O-antigenu a je vázán přes jaderný polysacharid k lipidu A. Řetězec se skládá z imunodeterminantních monosacharidů, které se mohou lišit nejen složením, ale i samotným uspořádáním jednotek (Julák, 2006). Kromě hexózu obsahuje řetězec dideoxyhexózu jako kolutázu, abekvózu nebo tyvelózu. Somatický antigen ve většině případů prostupuje až na povrch a stává se i hlavním antigenem povrchovým (Votava, 2005; Stenutz *et al.*, 2006).

O-specifický lipopolysacharid *E. coli* může být oproti ostatním druhům, které mají jen neutrální polysacharidy i kyselý. Kyselost je způsobená ve většině případů kyselinou hexuronovou (Peutherer *et al.*, 1999). Lipopolysacharid je pyrogenní a toxický, má schopnost vyvolat akutní hypoglykémii, oběhovou hypotenzi až samotný šok. Další jeho schopností je aktivace komplementu alternativní dráhou, schopnost stimulovat makrofágy a nekrotizovat nádory. Bohužel kvůli jeho toxicitě a neschopnosti převedení na toxoid není možné využívat O-antigeny ve vakcínách (Votava, 2005).

Antigeny jsou termostabilní a mohou se částečně nebo úplně ztrácet. S tím souvisí změna vzhledu kolonií z hladké S fáze na drsnou R fázi. R fáze způsobí ztrátu virulence (Julák, 2006). Samotná aglutinace se provádí s povařenou nebo autoklávovanou kulturou z toho důvodu, aby se odstranila inaglutinabilita způsobená K-antigenem (Peutherer *et al.*, 1999).

### 1.3.2 H-antigeny

H-antigeny jsou bičíkové antigeny termolabilní povahy tvořené polymerizovanou bílkovinou zvanou flagelin (Julák, 2006). Vědcům připomínal povlak na agaru způsobený pohyblivým proteinem zamlžené sklo, proto antigeny dostaly označení H od slova *der Hauch*, neboli dech (Votava, 2003). Dnes je zaznamenáno 50 H-antigenů. Pro aglutinaci se musí vzít kultura z tuhé půdy (Peutherer *et al.*, 1999).

### 1.3.3 K-antigeny

Kapsulární K-antigeny jsou složeny ve většině případů z polysacharidových jednotek bakteriálního pouzdra, které jsou termostabilní. Kromě polysacharidových antigenů existují i termolabilní antigeny složené z proteinů, které jsou podobné bílkovinám bičíků a fimbrií. K-antigeny mají menší význam v diagnostice, než antigeny O a H, ale jsou významnými faktory virulence (Whitfield, 2006).

Dříve se antigeny rozdělovaly do skupin A, B, L podle schopnosti vázat se na protilátky nebo podle antigenity a účinku tepla na aglutinabilitu. Dnes se u bakterie *E. coli* rozdělují na skupinu I a II, které odpovídají dřívějšímu označení A a L (Julák, 2006). Skupina I má molekulovou hmotnost vyšší než 100 000, kyselou složkou je zde kyselina hexurunová a pyruvát. Vyskytuje se u O-skupin s číslem 08 a 09. II. skupina má molekulovou hmotnost pod 50 000 a kromě kyseliny hexurunové obsahuje další kyselou složku jako například fosfát. Má vyšší elektroforetickou pohyblivost (Peutherer *et al.*, 1999).

Fimbriální polypeptidové antigeny často vyvolávají s erytrocyty hemaglutinaci. Předpokládá se, že způsobují adhezi na povrch buňky a tím usnadňují kolonizaci sliznic. Mezi dva významné antigeny patří K88 a K99, které účinkují jako faktory virulence u verotoxinogenních bakterií a jsou patogenní pro nově narozená selata, telata a jehňata (Votava, 2005). Antigeny jsou schopny produkovat kolonizační faktory, které se nalézají i u enterotoxigenních lidských kmenů a způsobují močové infekce (Peutherer *et al.*, 1999).

## 1.4 Faktory virulence

Podmíněné i primární patogeny mají své faktory virulence neboli agresiny, které způsobují různá onemocnění. Na rozvoji infekce se většinou podílí více faktorů virulence, z nichž má každý svoji roli ve stádiích infekce (Peutherer *et al.*, 1999).

### 1.4.1 Adheziny

Pro začátek infekce je v první řadě důležitá adheze, tedy stabilní přilnutí bakterie k povrchu. Mezi nejčastější adheziny *E. coli* patří rozmanité, dlouhé a vláknité fimbrie. Kromě fimbriálních adhezínů existují nefimbriální adheziny, které jsou podobné polysacharidovým kapslím a pod mikroskopem jsou díky svému malému průměru špatně rozlišovány. Specifické fimbrie jsou schopny poskytnout patogenním druhům schopnost adheze s následnou kolonizací a také mohou dodávat toxiny do cílových hostitelských buněk (Krogfelt, 1991).

Většina kmenů *E. coli* produkuje fimbrie typu 1, označované jako běžné fimbrie. Fimbrie typu 1 jsou schopny vázat se na živočišné a rostlinné buňky, plísňe i kvasinky. Mezi další adheziny patří fimbrie, které dělíme podle interakcí s receptory. M fimbrie, vázající se na manózoové zbytky, G fimbrie vázající se na zbytky galaktózy a S fimbrie, které rozpoznávají sialylované sacharidy (Holst, 1996).

### 1.4.2 Endotoxiny

Endotoxin se skládá z polysacharidů a z lipidové části, je to tedy lipopolysacharid (LPS) a nachází se v buněčné stěně. Pokud se LPS dostane do krevního řečiště, může způsobit horečku, leukopenii, tachykardii, hypotenzi až septický šok nebo celkové selhání organismu. V menších dávkách může být i prospěšný, protože je schopný způsobit imunostimulaci a zvýšit odolnost proti infekcím či malignitě (Holst, 1996).

LPS většinou stimuluje transmembránový protein TLR4 (Toll-like receptor4), který se nachází na povrchu monocytů, makrofágů, neutrofilů a dendritických buněk. Při aktivaci TLR4 hrají důležitou roli fosfátové skupiny, délka a počet mastných acylových řetězců. Lipid A *E. coli* obsahuje dvě fosfátové skupiny a šest acylových zbytků, a proto je silným aktivátorem imunitního systému (Wang a Quinn, 2010).

## 2 ČLENĚNÍ *E. COLI*

Významné kmeny *E. coli* řadíme do tří hlavních skupin podle genetických a klinických kritérií na komenzální kmeny, extraintestinální patogenní kmeny a intestinální patogenní kmeny. Komenzální kmeny *E. coli* nezpůsobují onemocnění, protože postrádají specializované faktory virulence a onemocnění jsou schopny vyvolat jen u velmi oslabených pacientů. Kmeny bakterie bývají často řazeny do fylogenetických skupin A, B1, B2, C, D, E na základě elektroforetického polymorfismu enzymů, např. esteráz (Tenaillon *et al.*, 2010).

### 2.1 Extraintestinální patogenní kmeny

Mezi extraintestinální patogenní kmeny *E. coli* (ExPEC) řadíme všechny kmeny, které vyvolávají onemocnění mimo gastrointestinální trakt. U lidí způsobují infekce močových cest, neonatální meningitidu, sepse a pneumonie. ExPEC kmeny byly vyzolovány ze syrového masa drůbeže a je tedy zřejmé, že postihuje kromě lidí i domácí zvířata (Smith *et al.*, 2007). Kmeny pocházejí většinou z fylogenetických skupin A, B1 anebo v menší míře ze skupin B2 a D. Faktory virulence zahrnují adheziny, polysacharidové povlaky, toxiny, proteázy a invaziny. Faktory virulence jim umožňují kolonizaci sliznic, vyhnout se obranným mechanismům hostitele, zachytit základní živiny, zranit hostitele a stimulovat škodlivou zánětlivou látku (Johnson a Russo, 2002).

#### 2.1.1 Uropatogenní kmeny

Uropatogenní kmeny *E. coli* (UPEC) jsou hlavní příčinou cystitidy a pyelonefritidy, tedy infekce močových cest. Předpokládá se, že většina infekcí pochází z tlustého střeva, ze kterého se UPEC dostanou do močových cest ascendentní cestou (Peutherer *et al.*, 1999). Bakterie jsou schopné přetrvávat a snadno růst v nepříznivém prostředí močového traktu. Hlavními faktory virulence jsou P-fimbrie, umožňující bakteriím navázat se na hostitelskou buňku, kde jsou dále bakterie schopny ukládat železo, které uvolňují z hostitelských buněk. UPEC vylučují řadu toxinů, například hemolysin a nekrotizující faktor, který způsobí poškození tkáně a usnadní šíření infekce (Wiles *et al.*, 2008). Močové infekce se objevují častěji u žen než u mužů z důvodu kratší a širší uretry, která pak hůře zabrání vniknutí bakterie do močového měchýře. Dalšími predispozicemi může být sexuální styk, zúžení uretry, močové kameny, vrozené malformace a funkční poruchy. Nejčastější příčinou u mužů je zvětšená prostata



(Peutherer et al., 1999). Nejčastěji způsobují infekci močových cest *E. coli* s antigenem O4, O14, O22, O75 a O83 (Stenutz et al., 2006).

### **2.1.2 *E. coli* způsobující neonatální meningitidu**

*E. coli* je po B streptokokoch druhou nejčastější bakterií, která má za příčinu neonatální meningitidu a je spojená s vysokými neurologickými problémy a smrtí. Mezi nejčastější neonatální meningitidy způsobené *E. coli* (ECNM) je sérotyp O18:K1:H7, který je celosvětově rozšířen. Nejčastěji se ECNM dostane do krve ze střevního traktu, stejně jako u UPEC. Bakterie se množí v krevním řečišti a přechází přes hematolivorou bariéru do arachnoidálního prostoru. Nejvýznamnějším adhezinem u ECNM jsou S-fimbrie (Bonacorsi a Bingen, 2005).

## **2.2 Intestinální patogenní kmeny**

### **2.2.1 Enteropatogenní *E. coli***

Enteropatogenní kmeny *E. coli* (EPEC) patří mezi nejvýznamnější patogeny způsobující průjem u dětí na celém světě (Ochoa a Contreras, 2011). Nejohroženější skupinou jsou děti do jednoho roku. V zemích se špatnou hygienickou úrovní jsou běžné sporadické infekce i epidemie a EPEC jsou přítomny často v domácnostech i nemocnicích. Počet sporadických infekcí roste v letních měsících (Peutherer et al., 1999). Průjem způsobený EPEC je dlouhotrvající, vodnatý, hlenovitý a neobsahuje krev (Ochoa a Contreras, 2011).

Patogenita je způsobena připojovací fází, tvorbou lézí a dále pomocí sekrečního systému typu 3 (T3SS). EPEC patří do skupiny patogenních bakterií, které jsou schopné způsobit vazebné a efekční léze (A/E léze) na povrchu střevního epitelu, kdy kromě lidských EPEC léze způsobují i zvířecí patogeny, např. králičí a prasečí enteropatogenní *E. coli* (Croxen et al., 2013). Tvorba lézí je zprostředkována geny umístěnými na lokusu enterocytů, který kóduje intimin, T3SS a šest efektorů. Sedmáct dalších efektorů je kódováno geny mimo lokus enterocytů (Cepeda-Molero et al., 2017). Léze jsou charakteristickým znakem, při kterém dochází k úbytku mikrokloků. Po uvolnění mikrokloků vznikají aktinové podstavce, které jsou produkovány z T3SS (Croxen et al., 2013).

#### **2.2.1.1 Laboratorní diagnostika enteropatogenní *E. coli***

Diagnóza EPEC je založena na patogenních vlastnostech, které ji odlišují od ostatních druhů *E. coli*. Mezi základní vlastnosti patří A/E léze, které lze snadno vyhodnotit

pomocí mikroskopie a pomocí buněčných kultur. Většina laboratoří však nemá dostupné zařízení, a proto se nejčastěji v klinických laboratořích pro rutinní vyšetření využívají genotypové testy. Preferovanou metodou je metoda PCR (polymerázová řetězová reakce) (Croxen *et al.*, 2013).

### **2.2.1.2 Zástupci enteropatogenní *E. coli***

Všechny EPEC postrádají geny pro produkci tepelně labilního (LT) i tepelně stabilního (ST) enterotoxinu. Rozlišují se na typické (tEPEC) a atypické (aEPEC) kmeny, které se vyskytují v rozvojových zemích mnohem častěji. Rozděleny jsou na základě přítomnosti a nepřítomnosti plazmidu adherentního faktoru *E. coli* (Croxen *et al.*, 2013).

Mezi typické kmeny, které jsou pohyblivé, patří sérotypy O86:H34, O114:H2, O127:H6, O127:H40, O142:H6, O142:H34 a mezi nepohyblivé sérotypy O55:H6, O55:NM, O111:NM, O111:H2, O119:H6. Do atypických pohyblivých kmenů se řadí sérotypy O55:H34, O86:H8, O111:H25, O119:H2, O125ac:H6, O128ab:H2 a do nepohyblivých sérotypy O26:H11, O55:H7, O111:H8, O111:H9 (Croxen *et al.*, 2013).

### **2.2.2 Enterotoxigenní *E. coli***

Enterotoxigenní *E. coli* (ETEC) je příčinou průjmu v rozvojovém světě, hlavně tam, kde je nedostatečně čistá voda a celkově špatná hygiena. ETEC je nejčastějším důvodem cestovatelského průjmu. Je pozorována hlavně u dětí a svědčí o tom, že s věkem dochází k ochranné imunitní reakci (Qadri *et al.*, 2005). ETEC také způsobuje neonatální enterické infekce u zemědělských zvířat, včetně skotu, prasat a ovcí. Kmeny jsou však specifické pro zvířecí hostitele a nezpůsobují tak infekce u lidí. Patogeneze je způsobená produkcí enterotoxinů a kolonizačních faktorů. V případě ETEC jsou infekce charakterizovány vodnatým průjmem, zvracením, žaludečními křečemi a mírnou horečkou, avšak u slabších jedinců může způsobit velmi závažný stav, který je podobný choleře (Vipin Madhavan a Sakellaris, 2015). Antibiotická léčba se používá jen u cestovatelských průjmů, jinak se léčí pomocí rehydratace. Mezi nejčastější bakterie, které způsobují akutní infekční průjem patří kromě ETEC i rotavirus, *Vibrio cholerae* a *Shigella*. Všechny jsou detekovány až na ETEC standartními rychlými zkouškami (Qadri *et al.*, 2005).

Střevní kolonizace je zčásti zprostředkována kolonizačními faktory, které se liší složením, strukturou a funkcí. Většina kolonizačních faktorů jsou fimbrie a příbuzné

vláknité struktury, zatímco jiné adheziny jsou jednoduché vnější membránové proteiny. Kromě enterotoxinů hraje roli ve virulenci autotransporterový protein a cytolyzin. Autotransporterový protein je kódován genem, který je nesen na plazmidu pCS1 a bylo dokázáno, že poškozuje střevní epitel a přispívá ke ztrátě tekutin (Vipin Madhavan a Sakellaris, 2015).

### **2.2.2.1 Enterotoxiny**

Termolabilní enterotoxin je blízce příbuzný toxinu *Vibrio cholerae* a je jedním z hlavních faktorů virulence ETEC. Skládá se z pěti podjednotek B a jedné podjednotky A, která je složena ze dvou domén A1 a A2 spojených disulfidovým můstkem. Molekula A1 je molekula aktivního toxinu a molekula A2 je spirálovitá část molekuly, která drží podjednotku k B pentameru. Pentamerová B podjednotka se váže na hostitelské receptory krevní skupiny v lidském střevě (Fleckenstein et al., 2010). Po translokaci epitelových buněk katalyzuje podjednotka A aktivaci adenylátcyklázy. Koncentrace cyklického adenosin-5'-monofosfátu se zvýší u buněk klků a způsobí inhibici absorpce sodíku, který následně zapříčiní únik chloridů, vody a vede k vodnatému průjmu (Peutherer et al., 1999). Kromě své úlohy v sekreci tekutin přispívá LT k adhezaci na epitelální buňky a následné kolonizaci tenkého střeva. Dřívější výzkum ukázal, že k optimálnímu dodávání LT dochází jen tehdy, pokud bakterie přilnou k epitelálním buňkám a protilátky anti-LT nejsou schopny LT neutralizovat. (Fleckenstein et al., 2010). Existuje i enterotoxin LT-II, který se nachází pouze u zvířat. U lidí není spojen s klinickým onemocněním (Qadri et al., 2005).

Termostabilní enterotoxin je malý peptid, který se váže na guanylylcyklázu na kartáčovém lemu střevního epitelu. Navázání vede ke zvýšení cyklické guanylylcyklázy a aktivaci proteinkinázy. Dochází k fosforylaci transmembránového regulátoru cystické fibrózy, který řídí sekreci chloru a inhibuje absorpci NaCl (chlorid sodný). Následuje ztráta vody prostřednictvím průjmu (Fleckenstein et al., 2010). ST- I byly nalezeny u lidských onemocnění, ST-II lze nalézt u kmenů kolonizující zvířata. Toxiny ST se vyskytují častěji u závažných onemocněních než LT (Croxen et al., 2013).

### **2.2.2.2 Laboratorní diagnostika enterotoxigenní *E. coli***

Detekce ETEC je založena na přítomnosti enterotoxinu LT, ST nebo obou toxinů. Patogenní *E. coli* není snadno rozpoznatelná na typických médiích, jako je

např. MacConkey půda, a proto bývají používány molekulární techniky. Důležitý je screening více kolonií a velké opatrnosti se musí dbát při manipulaci, protože geny kódující toxin mohou být ztraceny. Dříve se používal test ELISA (enzymový imunisorbentní test) pro enterotoxin, ale dnes jsou metody založené spíše na detekci pomocí PCR, kde nejsou potřeba monoklonální protilátky (Croxen *et al.*, 2013).

### **2.2.2.3 Zástupci enterotoxigenní *E.coli***

Existuje nejméně 78 detekovatelných O antigenů a 34 H antigenů u ETEC. Mezi nejběžnější sérotyp, který obsahuje oba enterotoxiny je O6:H16. Sérotyp, který má jen LT toxin je O25:NM a mezi nejčastější sérotypy obsahující ST toxiny patří O8:H9, O78:H12, O148:H28 a O153:H45 (Croxen *et al.*, 2013). O a H jsou spojeny s jedním nebo s více kolonizačními faktory a velké rozdíly v nich způsobují, že sérotypizace je méně vhodná pro identifikaci (Qadri *et al.*, 2005).

### **2.2.3 Enteroinvazivní *E. coli***

Enteroinvazivní *E. coli* (EIEC) je velmi podobná bakterii *Shigella* a to všem jejím druhům, kam se řadí *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* a *S. sonnei* (Ud-Din a Wahid, 2014). *Shigella* spp. i EIEC kmeny obsahují virulentní plazmid o velikosti 220 kb, který kóduje determinanty pro vstup do epitelových buněk a přechod z buňky do buňky (Parsot, 2005). Obě bakterie vyvolávají dyzentérii, tedy zánětlivé reakce na střevním epitelu, po kterých následuje krvavý průjem nebo průjem s příměsí hlenu. Onemocnění indukované EIEC je méně závažné než onemocnění způsobené bakterií rodu *Shigella*, ale způsob onemocnění je stejný (Ud-Din a Wahid, 2014).

Při průchodu tenkým střevem musí bakterie odolat kyselému prostředí žaludku, žlučovým solím a pankreatickým enzymům. K obraně jí pomáhá polysacharidové pouzdro. Invazivita je dána bílkovinami vnější membrány, které jsou štěpeny pankreatickými enzymy v tenkém střevě. V tlustém střevě musí EIEC soutěžit s rezidentní flórou o zdroje uhlíku, hlavně o nevyčerpateľný zdroj v podobě krevní glukózy (Peutherer *et al.*, 1999). Bakterie se dostane do podslizniční vrstvy pomocí narušení těsných spojení a poškozením, které je způsobeno zánětem. Bakterie, které se přichytí na povrch epitelálních buněk zahájí endocytózu (Ud-Din a Wahid, 2014). V endocytárních vakuole krátce zůstanou bakterie a díky schopnosti virulence jsou schopny rozpustit vakuolu a tím způsobit v buňce inhibici syntézy bílkovin. Dále pokračuje transport glukózy a aminokyselin, které se využívají k pomnožení

bakterií (Peutherer *et al*, 1999). Současný model mechanismů patogeneze je odvozen ze studií *in vitro* a *in vivo* s použitím různých typů buněk (epitelových, makrofágů, červených krvinek) a u zvířecích modulů infekce, jako je rohovka u morčat či plic u myší, ve kterých bakterie indukují zánětlivou reakci a způsobí následnou destrukci epitelu (Parsot, 2005).

### **2.2.3.1 Laboratorní diagnostika enteroinvazivní *E. coli***

Kmeny EIEC lze odlišit od jiných kmenů *E. coli* testováním schopnosti invaze, ke kterému se využívá Serenyův test anebo identifikace proteinů. Tyto testy ovšem nepatří k rutinní diagnostice a často jsou EIEC identifikovány jen O sérotypizací s komerčně dostupnými antiséry (Parsot, 2005).

Rozlišení mezi organismy EIEC a bakterií rodu *Shigella* se stejným sérotypem je často velmi obtížné vzhledem k jejich identickým biochemickým vlastnostem a fyziologickým rysům (Lan *et al.*, 2004). Avšak *E. coli* je oproti *Shigella* spp. pohyblivá, schopná dekarboxylovat lyzin, fermentovat mnoho cukrů a produkovat plyn. K hlavním biochemickým vlastnostem, podle kterých jsme schopni rozlišit EIEC a bakterii rodu *Shigella* spp. je fermentace mukátu a utilizace acetátu. EIEC bývá pozitivní na 90 % u obou vlastností a *Shigella* spp. je negativní u obou testů (Ud-Din a Wahid, 2014).

### **2.2.3.2 Zástupci enteroinvazivní *E. coli***

EIEC obsahuje 21 hlavních sérotypů, které jsou definovány O antigeny a několik výjimek je označeno H antigeny (Croxen *et al.*, 2013). EIEC obsahují O antigeny O28ac, O29, O112ac, O121, O124, O135, O136, O143, O144, O152, O159, O164, O167 a O173 (5, 10, 14, 15, 21, 25, 30). Antigeny O112ac, O124 a O152 jsou identické s O-antigeny *S. boydii* sérotypu 3, 15 a *S. dysenteriae* sérotypu 2, 12. Kmeny EIEC s těmito sdílenými O antigeny vykazují vyšší metabolickou aktivitu, než je to u kmenů *Shigella* spp. (Lan *et al.*, 2004).

### **2.2.4 Verotoxinogenní *E. coli***

*E. coli* produkující shiga toxin (STEC) je obvykle klasifikována jako enterohemoragická *E. coli* (EHEC). STEC je nejběžnějším typem EHEC, a proto jsou někdy používány jako synonyma. Hlavní charakteristika STEC je produkce jednoho nebo více extracelulárních shiga toxinů (stx). Rozlišuje se shiga toxin 1 (stx1) a shiga toxin 2 (stx2). Shiga toxin je zodpovědný za většinu morbidity a mortality spojené s infekcí

EHEC. Alternativní název toxinů jsou verotoxiny, proto tedy verotoxinogenní *E. coli* (VTEC) (Bryan *et al.*, 2015).

VTEC je původcem zoonózy, vyskytuje se na celém světě a představuje vážné zdravotní riziko. Bylo vyizolováno 380 sérotypů VTEC, ale pouze malé množství sérotypů je spojeno s lidským onemocněním. Nejčastější lidský sérotyp O157:H7 je hlavní příčinou alimentární otravy ve Spojených státech. Sérotyp O157:H7 způsobuje křeče a krvavý průjem a dále z něj vzniká hemolyticko-uremický syndrom (HUS) anebo hemoragická kolitida (HC) (Nguyen a Sperandio, 2012). VTEC jsou hlavní příčinou akutního selhání ledvin u dětí. Ohniska EHEC jsou zapříčiněná nízkou infekční dávkou a kontagiozitou neboli přenosností. Ačkoliv je O157:H7 lidský patogen způsobující infekce, také je komenzální bakterie vyskytující se ve střevním traktu přežvýkavců, např. u ovce, koz a jelenů. Přežvýkavci jsou také rezervoárem ostatních VTEC (Bolton, 2011).

Člověk se nejčastěji infikuje požitím nedovařeného mletého hovězího masa. Infekce se mohou vyskytnout i z kontaminované vody, zeleniny a ovoce. Bakterie se přenáší kontaktem mezi lidmi a řadí se i mezi nozokomiální infekci, kterou se člověk může infikovat v nemocnici (Ho *et al.*, 2013). Infekční dávka pro kmeny STEC je přibližně 1 až 100 CFU (kolonie tvořící jednotky v 1ml). Dávka je o mnoho řádu nižší než u kmenů ETEC a EPEC (Melton-Celsa, 2014).

Kromě hlavního faktoru virulence verotoxinu jsou dalšími markery virulence enterohemolysin kódovaný plazmidem, autoaglutinační adhezín, kataláza, peroxidáza a extracelulární serinová proteáza. Důležitými faktory virulence bakterie jsou intimin a ostatní adheziny. Intimin je nutný pro adhezi bakterií k epiteliálním buňkám a pro vznik A/E lézí stejně jako u EPEC kmenů. Kataláza i peroxidáza mohou pomoci kolonizovat střeva hostitele snížením oxidačního stresu. Serinová proteáza štěpí pepsin A a lidský koagulační faktor V, který by mohl přispět ke krvácení sliznic. Serinová proteáza je nejrozšířenějším genem, kataláza a peroxidáza jsou přítomny jen u sérotypů O145:H a O157:H7 (Etcheverría a Padola, 2014).

Pro kolonizaci musí EHEC nejprve porušit kyselou bariéru žaludku. Bakterie je odolná vůči kyselinám díky třem systémům. První systém potlačuje glukózu, druhý je závislý na glutamátu a třetí systém je závislý na argininu. In vitro se liší v závislosti na typu použitého kultivačního média (Nguyen a Sperandio, 2012).

### 2.2.4.1 Verotoxiny

Toxiny jsou nazývány buď verotoxiny z důvodu jejich aktivity na vero buňkách nebo shiga toxiny, protože mají podobnost s toxinem produkovaným bakterií rodu *Shigella*. Ve Spojených státech je primárně používán shiga-toxin a STEC, v Evropě je více používán název verotoxin a VTEC (Bolton, 2011). Stx1 se nachází kromě *S.dysenteriae* i v některých skupinách *E. coli* a některé druhy *E. coli* produkují shiga toxin 2, který má stejný způsob účinku, ale je antigeně odlišný. *E. coli*, které obsahují geny kódující produkci stx2 jsou spojeny s vážnějším onemocněním než ty, které nesou stx1 (Melton-Celsa, 2014).

Verotoxiny jsou kódované bakteriofágem. Bakteriofágy nesoucí geny kódující produkci verotoxinů se mohou stát lytickými během bakteriálního stresu a předpokládá se, že toxiny jsou uvolňovány z lyzovaných bakteriálních buněk během lytického cyklu bakteriofága (Croxen et al, 2013). Toxiny se skládají z jedné podjednotky A a z pěti B podjednotek. Mezi sebou jsou spojeny nekovalentními vazbami. Podjednotka A poškozují eukaryotický ribozom a zastavuje v cílových buňkách syntézu proteinů (Melton-Celsa, 2014). K syntéze proteinů dochází štěpením ribozomální RNA (Serna a Boedeker, 2008). B je pentamer holotoxinu vážící se na buněčný receptor globotriaosylkeramid (Gb3), který se nachází na povrchu endotelových buněk ledvin, střev a mozku hostitele. Navázání verotoxinů je možné díky vysoké expresi Gb3 na ledvinových endotelových buňkách. Po navázání dochází k endocytóze a toxin je transportován do Golgiho aparátu a endoplazmatického retikula (Smith et al., 2014). Po přesunutí do endoplazmatického retikula je podjednotka A schopná dostat se do cytosolu a způsobit poškození (Melton-Celsa, 2014).

U stx1a rozlišujeme varianty stx1c a stx1d. Obě varianty se v lidském onemocnění vyskytují jen zřídka a jsou spojeny jen s mírným průběhem onemocnění. Stx2 má sedm variant. Stx2a způsobuje těžké onemocnění, stx2c vykazuje sníženou toxicitu na vero buňkách a odlišit od sebe je můžeme pomocí monoklonálních protilátek. Stx2b je spojen s mírným onemocněním. Stx2d je spojen s nejzávažnějším projevem infekce STEC a kmeny produkující stx2d jsou vysoce virulentní. Stx2e, stx2f a stx2g jsou spojeny se zvířecím VTEC a jediný stx2e způsobuje edémové onemocnění prasat, které má vážné neurologické následky (Melton-Celsa, 2014). VTEC mohou produkovat jeden toxin, oba toxiny společně anebo kombinaci podtypů stx2 (Croxen et al., 2013).

Strukturní rozdíly mezi stx1 a stx2 byly nalezeny v aktivním místě podjednotky A, která má jinou orientaci na vazebná místa B podjednotky. Zvýšená virulence stx2 může být spojená se strukturálními změnami, ale také může být dána hladinami každého toxinu (Serna a Boedeker, 2008). Samozřejmě se musí brát v úvahu, že interakce mezi každým toxinem a receptorem je složitá a ovlivněná více faktory (Croxen *et al.*, 2013).

#### **2.2.4.2 Laboratorní diagnostika verotoxinogenní *E. coli***

Diagnostické postupy jsou založeny na detekci přítomnosti verotoxinů anebo jsou založeny na izolaci VTEC. U cytotoxického testu je detekce verotoxinů možná kvůli vysoké citlivosti vero buněk, které obsahují vysokou koncentraci Gb3 v plazmatických membránách. Test cytotoxicity se provádí z fekální kultury a je významný hlavně tam, kde je těžké izolovat VTEC. Testování je ovlivněno celkovým množstvím VTEC, účinností toxinů a mírou, kterým jsou toxiny uvolňovány z buněk. Cytotoxicita může být způsobena i jinými bakteriemi, a proto je důležité potvrzení pomocí monoklonálních protilátek proti verotoxinům. Test je složitý na standardizaci a je časově náročný, proto se v rutinních diagnostických laboratořích nepoužívá (Paton a Paton, 1998).

Mnohem častěji se v laboratořích využívá imunologických testů na detekci verotoxinů. Metoda ELISA je založena na sendvičové technice s polyklonálními nebo monoklonálními protilátkami, které slouží jako ligandy pro zachycení verotoxinů. Verotoxiny jsou detekovány polyklonálními protilátkami konjugovanými s křenovou peroxidázou nebo alkalickou fosfatázou. Citlivost pomocí ELISA testů je sice nižší než citlivost buněčného testu na vero buňkách, ale může se zvýšit doplněním kultur mitomycinem pro zvýšení produkce a uvolnění verotoxinů (Karch *et al.*, 1999). Další imunologickou metodou je latexová aglutinace. Komerčně jsou dodávané aglutinační testy s latexem pro rychlou předběžnou identifikaci. Testy se skládají z latexových perliček potažených protilátkami, které jsou schopny aglutinovat antigeny obsažené ve vzorku a tvořit s nimi komplex antigen-protilátka. Komplex je viditelný jako sraženina (De Boer a Heuvelink, 2000).

Metody PCR se ukázaly jako účinné pro detekci a charakterizaci VTEC. Kromě genů kódujících produkci verotoxinů je metoda schopná detekovat geny kódující tvorbu intiminu nebo hemolyzinu. Zároveň je to nejrozšířenější molekulární metoda určená hlavně pro screening ostatních *E. coli* než se sérotypem O157 (Reischl *et al.*, 2002). Metoda využívá buď jeden pár primerů pro určení všech genů kódujících tvorbu



verotoxinů v jedné reakci anebo různé páry primerů, které se používají v oddělených PCR reakcích anebo mohou být kombinovány ve stejné reakci a následně rozlišeny elektroforézou na agarózovém gelu. Metody PCR jsou velice citlivé a provádí se z DNA, kterou jsme schopni izolovat z jednotlivých kolonií na kultivačních půdách anebo se DNA přímo izoluje ze stolice pacienta (Karch *et al.*, 1999; Amézquita-López *et al.*, 2018)

Mezi jednu z novějších metod VTEC patří gelová elektroforéza s pulzním polem, která má vysokou rozlišovací schopnost, opakovatelnost a snadnou standardizaci. Metoda využívá restriční enzymy k tvorbě fragmentů DNA. Často se používá jen jeden restriční enzym, avšak při použití druhého restričního enzymu dochází k diskriminaci identických vzorců, které je třeba zachytit při vyšetření rozsáhlých ohnisek (Amézquita-López *et al.*, 2018).

Stále častěji se využívá sekvenování celého genomu oproti jiným genotypovým metodám. Sekvenování celého genomu poskytuje lepší rozlišení a největší výhodou je zkoumání celého genomu oproti zkoumání specifické genomové oblasti. Nevýhodou metody jsou vysoké náklady. V budoucnu se očekává snížení nákladů na vzorek a s tím by souviselo zvýšení efektivity. Sekvenování celého genomu by mohlo nahradit několik jednotlivých testů a zrychlit identifikaci kmene (Amézquita-López *et al.*, 2018).

VTEC sérotyp O157 je negativní na sorbitol i P-glukuronidázu. Sérotyp O157 se proto očkuje na MacConkey agar obsahující sorbitol anebo na médium obsahující D- glukuronid. Částečně je rezistentní na telurit či cefixim (Scheutz *et al.*, 2004). Žluté kolonie VTEC O157 jdou snadno rozlišit od červených kolonií sorbitol fermentujících *E. coli*. Obecně všechny VTEC kmeny mají sníženou schopnost fermentovat sacharidy (Bettelheim a Beutin, 2003).

#### **2.2.4.3 Zástupci verotoxinogenní *E. coli***

Existují čtyři různé linie VTEC. První skupina je EHEC 1, která zahrnuje sérotyp O157:H7 a SFO157:NM. Do druhé skupiny EHEC 2 patří ostatní sérotypy VTEC než O157 jako např. O111:H8 a O26:H11. Do třetí skupiny s názvem VTEC 1 se řadí sérotypy nevytvářející léze O113:H21 a O91:H21. Do poslední skupiny VTEC 1 patří sérotypy způsobující léze VTEC O45:H2 a O103:H2/H6. Kmeny VTEC O157:H7 byly klasifikovány do dvou odlišných linií na základě polymorfismu (Croxen *et al.*, 2013).

### **2.2.5 Enteroagregativní *E. coli***

Enteroagregativní *E. coli* (EAEC) je významný patogen spojovaný s průjmem u dětí v rozvojových zemích, ale mimo to je spojován s průjmem u dospělých lidí s imunodeficiencí a je příčinou ohnisek potravy v průmyslovém světě (Harrington *et al.*, 2006). Způsobuje vodnatý, hlenovitý a u třetiny případů krvavý průjem spojený se zvýšenou teplotou. EAEC mohou způsobit kromě akutního průjmu chronický zánět zapříčiněný perzistentní infekcí, který vede dále k podvýživě a ke sníženému psychickému a fyzickému vývoji dítěte (Okhuysen a DuPont, 2010).

Patogeneze má tři základní fáze, a to adhezaci na střevní sliznici, produkci enterotoxinů a následný zánět sliznice (Harrington *et al.*, 2006). Definice EAEC spočívá v schopnosti mikroorganismu přilnout k epiteliálním buňkám HEp-2 (standardizovaná buněčná linie odvozená z lidského karcinomu prostaty). Kmeny EAEC zvyšují sekreci hlenu ze sliznice, při kterém dochází ke vzniku biofilmu a mimo jiné indikují mírné, ale významné poškození sliznice. Některé kmeny nesou plazmid s vysokou molekulovou hmotností 55-65 MDa spojený s agregační adhezí, na kterém jsou umístěny počty genů virulence. Obsahuje tepelně stabilní toxin a agregační adhezní fimbrie. Kromě toho je na plazmidu umístěn gen aktivující transkripci, gen proti agregačnímu proteinu a gen pro transport anti-agregačního proteinu. Kmeny obsahující plazmid s vysokou molekulovou hmotností představují důležitou podskupinu a označují se jako typické EAEC. Kmeny, které adherují k buňkám a neobsahují daný plazmid, bývají často označovány jako atypické EAEC (Weintraub, 2007).

#### **2.2.5.1 Laboratorní diagnostika enteroagregativní *E. coli***

Test přilnavosti HEp-2 buněk je „zlatým standardem“ pro identifikaci EAEC. Test vyžaduje specializovaná zařízení, a proto je prováděn jen v referenčních laboratořích. Pro identifikaci se dnes používá DNA sonda při PCR testu, která je dostatečně citlivá a specifická (Harrington *et al.*, 2006).

### **2.2.6 Difúzně adherentní *E. coli***

Difúzně adherentní *E. coli* (DAEC) jsou kmeny, které se váží na HEp-2 buňky svojí difúzní adhezí, ke které dochází na celém povrchu buňky. DAEC se rozdělují do dvou tříd, kde první třída zahrnuje kmeny, které obsahují Afa/Dr adheziny podílející se na infekcích močových cest. Do druhé třídy patří kmeny, které exprimují adheziny

AIDA-I, který je příčinou infantilního průjmu (Servin, 2005). U kmenů se vyskytuje podobný mechanismus adhezin-receptor-efektorový protein, který je podobný EPEC kmenům. DAEC mají přítomen secernovaný autotransportní toxin, který je schopen způsobit léze na těsných spojeních epiteliálních buněk a tím zvýšit jejich permeabilitu (Mansan-Almeida *et al.*, 2013).

Prototypový kmen C1845 kóduje Afa/Dr adheziny mezi které patří adhezin F1845, který se spolu s Dr adhezinem váže na rozpadový akcelerační faktor, molekulu, která je silně exprimována na povrchu polarizovaných epiteliálních buňkách. Po navázání dochází ke změně cytoskeletu buňky a ke zničení nebo přeskupení mikrotubulů (Croxen *et al.*, 2013).

#### **2.2.6.1 Laboratorní diagnostika difúzně adherentní *E. coli***

Byl navržen difúzní shlukovací test, který spojuje buněčnou difúzní adhezi Afa/Dr kmenů s vlastnostmi Afa/Dr adhezínů na podporu shlukování receptorů kolem adherujících bakterií. Nevýhodou testu je, že nedetekuje všechny DAEC kmeny. Proto byly vyvinuty sondy a PCR primery (Servin, 2014).

#### **2.2.7 Adherentně invazivní *E. coli***

Adherentně invazivní *E. coli* (AIEC) souvisí s patogenezí zánětlivého onemocnění střev, především Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy. Zánětlivá onemocnění střev vznikají díky genetickým predispozicím, změně vnitřní mikroflóry a faktorům prostředí. Kmeny AIEC jsou schopny adhezace k intestinálním epiteliálním buňkám za použití bičků typu 1, které se váží na karcinoembryonální antigen na enterocytech. Enterocyty jsou u lidí se zánětlivým onemocněním nadměrně exprimovány (Lee *et al.*, 2019). Translokace AIEC je možná také prostřednictvím M buněk v Peyerových plátech. Translokované buňky mohou přežít pohlcení makrofágem a jsou schopny se v něm i množit. To má za následek sekreci cytokinů a indukci cytotoxické odpovědi (Camprubí-Font *et al.*, 2019).

#### **2.2.7.1 Laboratorní diagnostika adherentně invazivní *E. coli***

K identifikaci kmenů ve střevních vzorcích slouží vyšetření schopnosti invaze do epitelových buněk, přežití a množení v makrofázích pomocí standartního gentamicinového testu (Croxen *et al.*, 2013). Zvolením vhodných primerů lze určit faktory virulence pomocí PCR testu. PCR produkty je dále možné rozdělit pomocí elektroforézy na agarózovém gelu (Lee *et al.*, 2019).

## **3 ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBENÉ VEROTOXINOGENNÍMI KMENY *E. COLI***

### **3.1 Hemoragická kolitida**

Hemoragická kolitida je spojena nejčastěji se séro skupinou O157, která způsobuje břišní křeče a vodnatý průjem bez horečky následovaný charakteristickým otevřeným krvácením ve stolici. Patologické změny v tlustém střevě zahrnují kromě krvácení i edém. Vzorky biopsie tlustého střeva mohou vykazovat nekrózu a infiltraci leukocytů (Karmali, 2004).

HC může být způsobena i jinými bakteriemi jako je *Campylobacter*, *Shigella*, *Salmonella*, *Clostridium difficile* a EIEC. Dále je třeba vzít při diagnóze v úvahu i neinfekční chronickou Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu. Předpokládá se však, že průjem spojený s EHEC a onemocnění HC se objeví v krátkém časovém období u více pacientů (Cramer, 2014).

Terapeutický přístup HC je založen na symptomatické terapii, prevenci a monitorování potenciálních komplikací. Pacienti by měli být sledováni nejméně 7 dní po nástupu příznaků a každý den by se měli provádět klinická vyšetření a krevní analýzy, aby se co nejdříve odhalily komplikace, kam se řadí i hemolyticko-uremický syndrom. Doporučuje se zvýšený příjem tekutin (Cramer, 2014).

### **3.2 Hemolyticko-uremický syndrom**

Hemolyticko-uremický syndrom je hemolytická anémie spojená s trombocytopenií končící akutním selháním ledvin. Vyskytuje se kromě velkých ohnisek nákazy i u malých ohnisek či sporadicky. U 15 % nakažených VTEC se projeví HUS, nejnáchylnější jsou děti a starší osoby. Byla hlášena ohniska přenášená potravou, především ze syrového mletého hovězího masa, nepasterizovanou šťávou, mlékem, čerstvou zeleninou, kontaminovanou vodou a dále se může šířit z osoby na osobu anebo kontaktem se zvířaty nesoucí kmen způsobující onemocnění (Karpman *et al.*, 2017).

Gasser a spolupracovníci v roce 1955 popsali pět případů, kdy pacienti zemřeli na projevy hemolytické anémie s renální insuficiencí a nízkým počtem krevních destiček. O 30 let později Karmali a spolupracovníci zjistili příčinu onemocnění způsobené VTEC díky kultivaci na vero buňkách (Scheiring *et al.*, 2008).

Rozlišuje se typický HUS, který se objeví dva týdny po akutním průjmovém onemocnění a atypický HUS, který představuje jen 10-20 % hlášených případů. Atypický HUS mohou způsobit léky, vrozené chyby metabolismu, těhotenství nebo jiné infekční agens. Atypický HUS je spojen s vyšším výskytem záchvatů a jiných neurologických komplikací. Nejčastěji postiženou věkovou skupinou jsou děti do pěti let. Úmrtnost na atypický HUS je až 7 % (Webster a Schnitzler, 2014).

### **3.2.1 Klinické projevy**

Po inkubační době 3-8 dnů se u pacientů vyvine vodnatý průjem, po kterém následuje průjem krvavý doprovázený křečemi. U půlky pacientů se rozvine nevolnost, zvracení a jen třetina pacientů má horečku. Po příznacích následují typické hematologické a nefrologické změny, ke kterým se přidávají další znaky jako např. arteriální hypertenze, proteinurie a hematurie. Dalšími charakteristikami jsou fragmentované erythrocyty, rozpad hemoglobinu, rapidní nárůst laktátdehydrogenázy a trombocytopenie. V závislosti na poškození ledvin lze nalézt snížení clearance kreatininu (Scheiring et al., 2008). Fyzikální vyšetření může prokázat petechie anebo slizniční krvácení (Webster a Schnitzler, 2014).

HUS způsobuje neurologické komplikace. Uvádí se, že až polovina nakažených dětí s HUS bude mít postižení cévní nervové soustavy ve formě záchvatů, změny duševního zdraví nebo kómy. Obvykle je pozorován edém mozku s bolestí hlavy, zvracením a slabostí šestého nervu. HUS s časnými příznaky a symptomy CNS (cévní nervová soustava) je spojen s vyšší úmrtností (Webster Schnitzler, 2014).

Ve vzácných případech dochází k postižení kosterního svalstva, myokardu anebo slinivky břišní (pankreatu). Pankreatitida je pak dále detekována pomocí ultrazvuku nebo počítačovou tomografií. U postižení myokardu může být zvýšená hladina troponinu, která odráží ischemii (Scheiring et al., 2008).

Neurologické zhoršení pozorované u HUS s akutním selháním ledvin souvisí s urémií, hypertenzí a změnou metabolismu tekutin a elektrolytů vedoucí k hyponátrémii. Urémie je způsobena poškozením glomerulů. Následkem dochází k vylučování toxických katabolitů proteinů doprovázené acidózou, ztrátou bikarbonátů a zvýšenou hladinou draslíku v séru. Včasná uremická encefalopatie je charakterizována jemnými změnami duševního zdraví včetně podrážděnosti, nepozornosti, zmatenosti, únavy

a nedostatku zájmu. Symptomy jsou později doprovázeny pohybovými poruchami, zejména třesem (Webster a Schnitzler, 2014).

### **3.2.2 Patofyziologie**

Patologická léze pozorovaná v ledvinách pacientů s HUS se nazývá trombotická mikroangiopatie, která se skládá z glomerulární trombotické mikroangiopatie, arteriální trombotické mikroangiopatie a kortikální nekrózy. Glomerulární trombotickou mikroangiopatii charakterizuje zesílení kapilární stěny s výsledným zúžením lumenu a rozšíření subendotelového prostoru. Glomeruly jsou oteklé, zachycují se na nich červené krvinky a to následně vede k ucpání fibrinových agregátů. Vzniklé léze jsou pozorovány ve většině případů HUS. Arteriální trombotická mikroangiopatie zahrnuje extraglomerulární arterioly a mezibuněčné tepny s edémem a nekrózou arteriální stěny. Postižené glomeruly jsou scvrknuté a ischemické. Často je spojena s těžkou hypertenzí. Kortikální nekróza může být pozorována ve všech formách HUS, ale většinou bývá ve spojení s extraglomerulárním arteriálním postižením (Amirlak a Amirlak, 2006). Střevní léze jsou spojeny s ulcerací, která vede k edému, zánětlivým infiltrátům, tvorbě pseudomembrán a nekróze (Karpman *et al.*, 2017).

Trombóza je možná díky B podjednotkám prostřednictvím stimulace sekrece von Willebrandova faktoru. Kromě přímého působení toxinů se předpokládá, že i komplement ovlivňuje onemocnění, protože v plazmě a séru pacientů byly nalezeny aktivační produkty komplementu a nízké koncentrace glykoproteinu C3 v plazmě i séru. Dále byla C3 přítomna na komplexech krevních destiček s leukocyty, které ovlivňují během onemocnění samotnou indukci komplementu. Komplement indukuje tvorbu C3a a C5a, čímž zvyšuje expresi selektinu a snižuje syntézu thrombomodulinu, který podporuje srážení krve. C3a i C5a patří mezi anafylatoxiny, které jsou mimo jiné mediátory zánětu a aktivátory leukocytů a destiček (Picard *et al.*, 2015).

### **3.2.3 Diferenciální diagnostika a diagnóza**

Mnoho onemocnění má podobné klinické a laboratorní nálezy s HUS. U jiných střevních infekcí způsobených např. bakteriemi *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* mohou být klinicky závažné bolesti břicha, krvavý průjem i leukocytóza, které jsou běžnými příznaky typického hemolyticko-uremického syndromu. Rozdělit HUS od ostatních bakteriálních onemocnění lze prokázat přítomností trombocytopenie

a mikroangiopatické anémie. Diagnostická triáda HUS může být pozorována u těžké sepsy či systémové vaskulitidy. Systémová vaskulitida má kromě stejných příznaků i jiné projevy, jakou je vyrážka a normální počet krevních destiček (Amirlak a Amirlak, 2006).

Diagnóza typického HUS se provádí na základě laboratorních nálezů a na základě zdravotní dokumentace předešlých onemocnění pacienta. Všichni pacienti musí mít nakultivovanou stolici na selektivním agaru, který se odečítá po 24 hodinách. K dalšímu testování pomocí PCR nebo enzymové imuno-analýzy by se měly používat kolonie, které již byly vyizolovány na kultivační plotně nebo z pomnožného média. Kromě stolice se může použít pro kultivaci moč, protože se dříve ukázalo, že je pozitivní na VTEC i v nepřítomnosti průjmu (Webster Schnitzler, 2014).

### **3.2.4 Léčba**

Neexistuje žádná specifická léčba HUS, jen symptomatická léčba k prevenci komplikací vznikajících při selhání ledvin (Amirlak a Amirlak, 2006). Důležitá je včasná rehydratace, která zachová diurézu. Pacienti se v případě dobré rehydratace často vyhnou následné dialýze. Bez rehydratace dochází k anurii. Antibiotická léčba během infekce se nedoporučuje, protože může zvýšit syntézu a uvolnění toxinů, které by mohly vést k vyššímu riziku onemocnění. Navzdory tomu, někteří odborníci radí použití antibiotik pro léčbu infekce VTEC. Rozdílné názory na používání antibiotik při různých fázích léčby HUS, budou vyřešeny až po zjištění výsledků z dalších experimentálních studií aplikovaných na člověka (Picard *et al.*, 2015).

Léčba zahrnuje více látek, které jsou namířeny proti základním nebo předpokládaným patogenním mechanismům HUS. Mezi ně patří antitrombotika, výměna plazmy a aktivátor plazminogenu. U žádného z nich není prokázáno, že by byli účinné. Důležitá je výměna plazmy u pacientů s těžkým postižením CNS (Boyer a Niaudet, 2011).

Mezi možnou budoucí léčbu patří léčba pomocí vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF). U myši bylo zjištěno, že VEGF je syntetizován ledvinovými podocyty a injekce obsahující stx může inhibovat syntézu způsobující mikroangiopatii. Dnes se anti-VEGF využívají i při léčbě některých druhů rakovin (Picard *et al.*, 2015).

Mezi další budoucí léčbu patří perorální podání toxinových receptorů, které blokují toxin dříve, než vstoupí do celkové cirkulace. V Kanadě byla vyvinuta pryskyřice, která

působí jako toxinové pojivo před fixací toxinu na enterocyty. Vazba toxinu na peptid způsobuje zvláštní transport, který je normální jen po Golgiho komplex. Následně je toxin přeměrován do kyselého prostředí ke zničení, místo toho, aby pokračoval do endoplazmatického retikula (Picard *et al.*, 2015).



## **4. EPIDEMIE ZPŮSOBENÉ VEROTOXINOGENNÍMI KMENY *E. COLI***

Epidemiologické vyšetření ohnisek je zaměřeno na kombinování přístupů a rekonstrukci řetězce událostí, které vedly k vypuknutí epidemie. Genetické informace, jako jsou genetické odlišnosti mezi izoláty, mohou pomoci při sledování původu a přenosu patogenů (Grad *et al.*, 2012).

### **4.1 Epidemie způsobená sérotypem O104:H4**

Od května do července v roce 2011 došlo v Německu a ve Francii k jednomu z největších hlášených případů HUS a krvavých průjmu způsobených VTEC sérotypu O104:H4. Kmen vznikl kombinací EHEC a EAEC. Kombinace agregační schopnosti EAEC a schopnosti odolávat proti antibiotikům a produkce stx2 EHEC významně ovlivnily závažnost epidemie. Sérotyp O104 se již dříve objevil v Německu v roce 2001, ve Francii v roce 2004 a ve Finsku v roce 2010. U 20 % pacientů se objevil HUS, což bylo mnohem vyšší procento ve srovnání s jinými ohnisky. HUS postihl hlavně dospělé, převážně ženy. Důvod, proč jsou většinou více nakaženy ženy, než muži není znám. Jako jeden z důvodů se uvádí, že ženy více konzumují ovoce a zeleninu (Soon *et al.*, 2013).

K 27. červenci bylo potvrzeno 3126 případů průjmu spojených se sérotypem O104:H4 včetně s 17 úmrtími. Kromě toho bylo v EU hlášeno 773 případů HUS s 29 úmrtími. Vypuknutí onemocnění souviselo s konzumací syrové zeleniny a uvádí se, že naklíčená semena byla zdrojem obou ohnisek. Německo i Francie hledali zdroj onemocnění a došlo se k závěru, že semena pískavice řecké byly dovezeny z Egypta. Německá epidemie se rozšířila hlavně v Německu, ale případy byly hlášeny v patnácti okolních zemích, včetně České republiky, Dánska, Polska a Norska (Rubino *et al.*, 2011; European Food Safety Authority, 2011).

Vzácný sérotyp O104:H4 nebyl dříve popsán u zvířat, jen vzácně u lidí. Zvýšený faktor adherence může usnadnit absorpci stx a způsobit tím vyšší riziko HUS. Kombinace faktorů virulence může vést k silnější střevní kolonizaci a uvolnění toxinů (Soon *et al.*, 2013). Sérotyp fermentuje sorbitol do 24 hodin, je pozitivní na laktózu a beta-glukuronidázu. Chybí mu další typické geny pro VTEC, jako je např. stx1. Kmen je rezistentní na beta-laktamová antibiotika (ampicilin) a cefalosporiny (Frank *et al.*, 2011).

Infekce byla diagnostikována soukromými mikrobiologickými laboratořemi screeningem pro průkaz stx pomocí enzymové imunoanalýzy nebo pomocí PCR. Národní referenční centrum potvrdilo přítomnost VTEC pomocí kultivovaných izolátů z místních nebo regionálních laboratoří. Biochemická charakteristika kmene byla provedena pomocí komerčně dostupných testů. Přítomnost genů virulentních faktorů byla detekována pomocí PCR (Frank *et al.*, 2011).

#### **4.2 Epidemie způsobená sérotypem O26:H11**

Nejběžnějším sérotypem mimo sérotyp O157:H7 se ukázal sérotyp O26:H11, který způsobuje mimo Evropu onemocnění i ve Spojených státech, Asii a Austrálii. Může způsobit stejně závažná onemocnění. EHEC O26:H11 produkuje stx1a i stx2a (Bielaszewska *et al.*, 2013).

Byla provedena studie v 7 státech od roku 1996-2012 na výskyt EHEC sérotypu O26. Sledováno bylo Rakousko, Belgie, Česká republika, Německo, Itálie, Slovensko a Spojené království. Nejvíce kmenů se objevilo v Německu v počtu 86. V České republice se našlo 16 kmenů. V této studii na tom bylo nejlépe Slovensko, Anglie a Irsko, kde byl izolován pouze jeden kmen (Bielaszewska *et al.*, 2013).

V létě 2013 byl zvýšený výskyt HUS u dětí v Itálii. Pacienti s krvavým průjmem byli testováni mikrobiologickými a sérologickými metodami na přítomnost *E. coli* O26. Infekce VTEC byla identifikována u dvaceti dětí, z nichž dvě měly vážné neurologické následky. Studie prokázala souvislost mezi infekcí a místními rostlinnými produkty. Věk dětí byl od 11 do 78 měsíců, ve většině případů se jednalo o dívky. Epidemie *E. coli* O26 byla zaznamenána také ve stejný rok ve Francii, kde příčinou šestnácti případů HUS byl sýr hermelín. (Germinario *et al.*, 2016).

V roce 2016 bylo v Rumunsku pozorováno zvýšení počtu HUS. Po mikrobiologickém vyšetření se zjistilo, že většina izolovaných kmenů byl sérotyp O26. Pomocí PCR bylo rozpoznáno 5 genotypů. Všechny kmeny obsahovaly stx1 a intimin (Usein *et al.*, 2017).

#### **4.3 Epidemie způsobená sérotypem O157:H7**

V srpnu 2004 bylo zjištěno 7 případů infekce v jihozápadní Anglii. Předpokládá se, že infekce byla způsobena kontaminací sladkovodní řeky ústími do moře. Před vypuknutím onemocnění byly vydatné silné srážky, které mohly strhnout exkrementy zvířat a kontaminovat vodu. Kontrolní opatření zahrnovala oplocení části toku, kde si děti hrály a vyvěšování výstražných značek po pláži (Ihekweazu *et al.*, 2006).

Bylo hlášeno 157 případů infekce způsobené VTEC O157 do 3. října 2005 v jižním Walesu ve Spojeném království. 65 % případů bylo u dětí ve školním věku a došlo ke smrti pětiletého chlapce. Důkazy naznačovaly, že ohniskem nákazy je vařené maso, které bylo dodáváno od jediného dodavatele. Kontrolní opatření vedlo k odstranění potravin nevařených v prostorách škol (Salmon *et al.*, 2005).

V roce 2005 se na západním pobřeží Švédska nakazilo bakterií *E. coli* O157:H7 120 lidí. Gelová elektroforéza v pulzním poli potvrdila jeden dominantní kmen. Většina nakažených byly ženy. U sedmi pacientů se vyvinul HUS. Zdrojem nákazy byl hlávkový salát od místního producenta zeleniny, který byl zavlažován kontaminovanou vodou (Söderström *et al.*, 2005).

Na podzim roku 2007 došlo v Nizozemsku a na Islandu k současnému výskytu *E. coli* O157 negativní na sorbitol produkující stx1, stx2 a intimin. Nejpravděpodobnější příčinou byl kontaminovaný salát, který byl zpracovaný a zabalený v Nizozemsku. Ke kontaminaci salátu mohlo dojít během růstu prostřednictvím vody, půdy, hnoje anebo v důsledku křížové kontaminace během zpracování. Od poloviny září do poloviny října bylo diagnostikováno celkem 50 případů. Nebyly hlášeny žádné případy spojené s HUS (Friesema *et al.*, 2008).

V jižní Francii v roce 2011 došlo k epidemii způsobené *E. coli* O157:H7. Bylo zjištěno 18 případů HUS u dětí od 6 měsíců do 10 let. V deseti případech byl izolován kmen, který fermentuje sorbitol a produkuje stx2. Epidemiologické a mikrobiologické vyšetření prokázalo výskyt kmene *E. coli* v kontaminovaném mraženém hovězím masu zakoupeném v supermarketu. Kromě hovězího masa jsou rezervoárem různé potravinářské výrobky včetně jablečného moštu, tvarohového sýra, klobás a syrového kravského mléka (King *et al.*, 2014).

## ZÁVĚR

Intestinální patogenní *E. coli* způsobují infekci močových cest a neonatální meningitidu. Extraintestinální kmeny způsobují onemocnění od lehkých cestovatelských průjmů až po krvavé průjmy, které jsou velmi závažné a mohou vyústit v trvalé následky až smrt. Nejčastěji se bakterie vyskytují v zemích, kde je špatná hygiena a nedostatečně čistá voda. Bakterie se množí v teple, a proto je hlášeno více infekcí v letních měsících. Infekce jsou pozorovány hlavně u dětí, protože s věkem dochází k ochranné imunitní reakci. U bakterie je důležitá včasná identifikace, a proto se vyvíjí stále nové metody pro důkaz patogenní *E. coli*.

U krvavých průjmů je důležité myslet na to, že hemoragickou kolitidu a hemolytický uremický syndrom nezpůsobuje jen kmen O157:H7, ale existují i jiné kmeny, které jsou dokonce v Evropě rozšířeny častěji a je tedy nutné přizpůsobit tomu identifikaci. VTEC se šíří kvůli své malé infekční dávce, která je dále komplikována schopností bakterie ve stresu z prostředí vytvářet životaschopné, nekultivovatelné buňky, které se přenáší potravinami a jsou stále schopné produkovat verotoxin. Maso může být kontaminováno kontaktem s exkrementy zvířat během porážky nebo zpracováním kolonizovaných zvířat. Zelenina může být infikována použitím kontaminovaného hnoje nebo vody. Důležité je dbát na správné tepelné zpracování masa a řádné umytí syrové zeleniny.

Počet patogenních kmenů *E. coli* vyskytujících se v potravinách se stále zvyšuje. Je to způsobeno distribucí potravin v rámci Evropské unie a díky širokému dovozu potravin z ostatních kontinentů. Analýzy dat a shromažďování informací z více zemí zvyšuje možnost odhalit potenciální zdroje, předcházet epidemii a tím snížit počet onemocnění.

## ZDROJE

- AMÉZQUITA-LÓPEZ, B. A., M. SOTO-BELTRÁN, B. G. LEE, J. C. YAMBAO a B. QUIÑONES. Isolation, genotyping and antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology*. 2018, 51(4), 425-434. ISSN 16841182.
- AMIRLAK, I. a B. AMIRLAK. Haemolytic uraemic syndrome: An overview (Review Article). *Nephrology*. 2006, 11(3), 213-218. ISSN 1320-5358.
- BETTELHEIM, K.A. a L. BEUTIN. Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). *Journal of Applied Microbiology*. 2003, 95(2), 205-217. ISSN 1364-5072.
- BIELASZEWSKA, M., A. MELLMANN, S. BLETZ *et al.* Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26: H11/H-. *Clinical Infectious Diseases*. 2013, 56(10), 1373-1381 ISSN 1537-6591.
- BOLTON, D. Verocytotoxigenic (Shiga Toxin–Producing) *Escherichia coli*: Virulence Factors and Pathogenicity in the Farm to Fork Paradigm. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2011, 8(3), 357-365. ISSN 1535-3141.
- BONACORSI, S. a E. BINGEN. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis. *International Journal of Medical Microbiology*. 2005, 295(6-7), 373-381. ISSN 14384221.
- BOYER, O. a P. NIAUDET. Hemolytic Uremic Syndrome: New Developments in Pathogenesis and Treatment. *International Journal of Nephrology*. 2011, 1-10. ISSN 2090-2158.
- BRYAN, A., I. YOUNGSTER a A. MCADAM. Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2015, 35(2), 247-272 ISSN 02722712.
- CAMPRUBÍ-FONT, C., C. EWERS, M. LOPEZ-SILES a M. MARTINEZ-MEDINA. Genetic and Phenotypic Features to Screen for Putative Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*. 2019, 10. ISSN 1664-302X.
- CEPEDA-MOLERO, M., C. BERGER, A. WALSHAM *et al.* Attaching and effacing (A/E) lesion formation by enteropathogenic *E. coli* on human intestinal mucosa is dependent on non-LEE effectors. *PLOS Pathogens*. 2017, 13(10). ISSN 1553-7374.

- CRAMER, J. P. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Emerging Infectious Diseases*. 2014, 213-227. ISBN 9780124169753.
- CROXEN, M., R. LAW, R. SCHOLZ, K. KEENEY, M. WLODARSKA a B. FINLAY. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013, 26(4), 822-880. ISSN 0893-8512.
- DE BOER, E. a A.E. HEUVELINK. Methods for the detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*. 2000, 88(1), 133-143. ISSN 13645072
- ETCHEVERRÍA, A. a N. PADOLA. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Virulence*. 2014, 4(5), 366-372. ISSN 2150-5594.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104: H4 2011 outbreaks in Europe. *EFSA Journal*. 2011, 9(10). ISSN 18314732.
- FLECKENSTEIN, J., P. HARDWIDGE, G. MUNSON, D. RASKO, H. SOMMERFELT a H. STEINSLAND. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes and Infection*. 2010, 12(2), 89-98. ISSN 12864579.
- FRANK, C., D. WERBER, J.P. CRAMER *et al.* Epidemic Profile of Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* O104: H4 Outbreak in Germany. *New England Journal of Medicine*. 2011, 365(19), 1771-1780. ISSN 0028-4793.
- FRIESEMA, I, G SIGMUNSDOTTIR, K VAN DER ZWALUW *et al.* An international outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection due to lettuce, September – October 2007. *Eurosurveillance*. 2008, 13(50). ISSN 1560-7917.
- GERMINARIO, C., A. CAPRIOLI, M. GIORDANO *et al.* Community-wide outbreak of haemolytic uraemic syndrome associated with Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* O26: H11 in southern Italy, summer 2013. *Eurosurveillance*. 2016, 21(38). ISSN 1025-496X.
- GRAD, Y. H., M. LIPSITCH, M. FELDGARDEN *et al.* Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104: H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012, 109(8), 3065-3070. ISSN 0027-8424.

- HARRINGTON, S., E. DUDLEY a J. NATARO. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiology Letters*. 2006, 254(1), 12-18. ISSN 03781097.
- HOLST, O. Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 1996, 16(2), 83-104. ISSN 09288244.
- HO, N. K, A. C HENRY, K. JOHNSON-HENRY a P. M. SHERMAN. Pathogenicity, Host Responses and Implications for Management of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 Infection. *Canadian Journal of Gastroenterology*. 2013, 27(5), 281-285. ISSN 0835-7900.
- HUANG, K. C., R. MUKHOPADHYAY, B. WEN, Z. GITAI a N. S. WINGREEN. Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008, 105(49), 19282-19287. ISSN 0027-8424.
- IHEKWEAZU, C., M. BARLOW, S. ROBERTS, H. CHRISTENSEN, B. GUTTRIDGE, D. A. LEWIS a S. PAINTER. Outbreak of *E. coli* O157 infection in the south west of the UK: risks from streams crossing seaside beaches. *Eurosurveillance*. 2006, 11(4), 5-6. ISSN 1560-7917.
- JANG, J., H.-G. HUR, M.J. SADOWSKY, M.N. BYAPPANAHALLI, T. YAN a S. ISHII. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *Journal of Applied Microbiology*. 2017, 123(3), 570-581. ISSN 13645072.
- JOHNSON, J. a T. RUSSO. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E coli*". *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 2002, 139(3), 155-162. ISSN 00222143.
- JULÁK, J. Úvod do lékařské bakteriologie. Vyd. 1. Praha: Karolinum. 2006. ISBN 80-246-1270-4.
- KAPRÁLEK, F. Fyziologie bakterií. Vyd. 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. 1986.
- KARCH, H., M. BIELASZEWSKA, M. BITZAN a H. SCHMIDT. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1999, 34(3), 229-243. ISSN 07328893.

KARMALI, M. A. Infection by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: An Overview. *Molecular Biotechnology*. 2004, 26(2), 117-122. ISSN 1073-6085.

KARPMAN, D., S. LOOS, R. TATI a I. ARVIDSSON. Haemolytic uraemic syndrome. *Journal of Internal Medicine*. 2017, 281(2), 123-148. ISSN 09546820.

KING, L.A., E. LOUKIADIS, P. MARIANI-KURKDJIAN *et al.* Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157: [H7] via ground beef. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014, 20(12), 1136-1144. ISSN 1198743X.

KONG, M. K. a P. C. LEE. Metabolic engineering of menaquinone-8 pathway of *Escherichia coli* as a microbial platform for vitamin K production. *Biotechnology and Bioengineering*. 2011, 108(8), 1997-2002. ISSN 00063592.

KROGFELT, K. A. Bacterial Adhesion: Genetics, Biogenesis, and Role in Pathogenesis of Fimbrial Adhesins of *Escherichia coli*. *Clinical Infectious Diseases*. 1991, 13(4), 721-735. ISSN 1058-4838.

LAN, R., M. ALLES, K. DONOHOE, M. MARTINEZ a P. REEVES. Molecular Evolutionary Relationships of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infection and Immunity*. 2004, 72(9), 5080-5088. ISSN 0019-9567.

LEE, J., D. HAN, S. JO, A. LEE, C. PARK, C. EUN, Y. LEE a E. MIZOGUCHI. Characteristics and pathogenic role of adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease: Potential impact on clinical outcomes. *PLOS ONE*. 2019, 4(4), ISSN 1932-6203.

MANSAN-ALMEIDA, R., A. PEREIRA a L. GIUGLIANO, 2013. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. *BMC Microbiology*. 2013, 13(1). ISSN 1471-2180.

MELTON-CELSA, A. Shiga Toxin (Stx): Classification, Structure, and Function. *Microbiology Spectrum*. 2014, 2(4). ISSN 2165-0497.

NGUYEN, Y a V. SPERANDIO. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2012, 2. ISSN 2235-2988.

OCHOA, T. a C. CONTRERAS. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2011, 24(5), 478-483 ISSN 0951-7375



- OKHUYSEN, P. C. a H. L. DUPONT. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): A Cause of Acute and Persistent Diarrhea of Worldwide Importance. *The Journal of Infectious Diseases*. 2010, 202(4), 503-505. ISSN 0022-1899.
- PARSOT, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiology Letters*. 2005, 252(1), 11-18. ISSN 03781097.
- PATON, J.C. a A. W. PATON. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998, 11(3), 450-479. ISSN 0893-8512.
- PEUTHERER, J., R. SLACK a D. GREENWOOD. Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie. Vyd. 1., čes. Praha: Grada. 1999. ISBN 80-7169-365-0.
- PICARD, C., S. BURTEY, C. BORNET, C. CURTI, M. MONTANA a P. VANELLE. Pathophysiology and treatment of typical and atypical hemolytic uremic syndrome. *Pathologie Biologie*. 2015, 63(3), 136-143. ISSN 03698114.
- QADRI, F., A.-M. SVENNERHOLM, A. FARUQUE a R. SACK. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005, 18(3), 465-483. ISSN 0893-8512.
- REISCHL, U., M. YOUSSEF, J. KILWINSKI, N. LEHN, W. ZHANG, H. KARCH a N. STROCKBINE. Real-Time Fluorescence PCR Assays for Detection and Characterization of Shiga Toxin, Intimin, and Enterohemolysin Genes from Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002, 40(7), 2555-2565. ISSN 0095-1137.
- RUBINO, S., P. CAPPUCINELLI a D. J. KELVIN. *Escherichia coli* (STEC) serotype O104 outbreak causing haemolytic syndrome (HUS) in Germany and France. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2011, 5(06), 437-440. ISSN 1972-2680.
- SALMON, R a Collective OUTBREAK CONTROL TEAM. Outbreak of verotoxin producing *E.coli* O157 infections involving over forty schools in south Wales, September 2005. *Weekly releases (1997–2007)*. 2005, 10(40). ISSN 9999-1233.

- SERNA, A. a E. BOEDEKER. Pathogenesis and treatment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2008, 24(1), 38-47. ISSN 0267-1379.
- SERVIN, A. Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005, 18(2), 264-292. ISSN 0893-8512.
- SERVIN, A. Pathogenesis of Human Diffusely Adhering *Escherichia coli* Expressing Afa/Dr Adhesins (Afa/Dr DAEC): Current Insights and Future Challenges. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014, 27(4), 823-869. ISSN 0893-8512.
- SCHEIRING, J., S. P. ANDREOLI a L. B. ZIMMERHACKL. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatric Nephrology*. 2008, 23(10), 1749-1760. ISSN 0931-041X.
- SCHEUTZ, F., L. BEUTIN a H. SMITH. Clinical Detection of Verocytotoxin-Producing *E. coli* (VTEC). *Verocytotoxigenic E. coli*. 2004, 25-56 ISBN 9780470385098.
- SMITH, J., P. FRATAMICO a N. GUNTHER. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2007, 4(2), 134-163. ISSN 1535-3141.
- SMITH, J., P. FRATAMICO a N. GUNTHER. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Elsevier*. 2014, 145-197. ISBN 9780128002629.
- SÖDERSTRÖM, A., A. LINDBERG a Y. ANDERSSON. EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August-September 2005. *Weekly releases (1997–2007)*. 2005, 10(38). ISSN 9999-1233.
- SOON, J.M., P. SEAMAN a R.N. BAINES. *Escherichia coli* O104: H4 outbreak from sprouted seeds. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2013, 216(3), 346-354. ISSN 14384639.
- STENUTZ, R., A. WEINTRAUB a G. WIDMALM. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiology Reviews*. 2006, 30(3), 382-403. ISSN 1574-6976.
- TENAILLON, O., D. SKURNIK, B. PICARD a E. DENAMUR. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2010, 8(3), 207-217. ISSN 1740-1526.

- UD-DIN, A. a S. WAHID. Relationship among *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and their differentiation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2014, 45(4), 1131-1138. ISSN 1517-8382.
- USEIN, C.-R., A. S. CIONTEA, C. M. MILITARU *et al.* Molecular characterisation of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains: results of an outbreak investigation, Romania, February to August 2016. *Eurosurveillance*. 2017, 22(47). ISSN 1560-7917.
- VIPIN MADHAVAN, T.P. a H. SAKELLARIS. Colonization Factors of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Elsevier*. 2015, 155-197. ISBN 9780128022757.
- VOTAVA, M. Lékařská mikrobiologie speciální. *Brno: Neptun*. 2003. ISBN 80-902896-6-5.
- VOTAVA, M. Lékařská mikrobiologie obecná. 2. přeprac. vyd. *Brno: Neptun*. 2005. ISBN 80-86850-00-5.
- VOTAVA, M. Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody. *Brno: Neptun*. 2010. ISBN 978-80-86850-04-7.
- WALKER, T. Microbiology. *Philadelphia: W.B. Saunders Co.* 1998. ISBN 0721646417.
- WANG, X.a P. QUINN. Endotoxins: Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria. *Springer Netherlands*. 2010, 3-25. ISBN 978-90-481-9077-5.
- WEBSTER, K. a E. SCHNITZLER. Hemolytic uremic syndrome. *Neurologic Aspects of Systemic Disease Part II. Elsevier*. 2014, 1113-1123. ISBN 9780702040870.
- WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. *Journal of Medical Microbiology*. 2007, 56(1), 4-8. ISSN 0022-2615.
- WHITFIELD, C. Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annual Review of Biochemistry*. 2006, 75(1), 39-68. ISSN 0066-4154.
- WILES, T., R. KULESUS a M. MULVEY. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*. 2008, 85(1), 11-19. ISSN 00144800.