

zdá, že léčivo je mnohem účinnější než Tamiflu. V případě významné mutace viru H5N1 jsou schopni modifikovat výrobek do 3 týdnů. Podobně testují i lék s účinkou proti vzteklině a proti dalším nemocem (dengue, hemoragické horečky apod.). Zřejmě již velmi blízká budoucnost ukáže případný potenciál léčiv připravených pomocí nanotechnologií.

T. Ziegler z finského National Public Health Institute (KTL) se věnoval problematice diagnostiky suspektních a pravděpodobných případů ptačí chřipky u lidí v době před začátkem pandemie. Obvykle se jedná o značné diagnostické rozpaky u importovaných případů respiračních onemocnění, pokud v zahraničí došlo k možné expozici nakaženým či „podezřelým“ zvířatům či osobám.

Je užitečné mít možnost provést široké spektrum laboratorních vyšetření včetně rychlých testů a kultivace viru (která v prepandemickém období vyžaduje prostředí BL3).

Lze shrnout, že řada závěrů z vystoupení jednotlivých účastníků jednání v zásadě odpovídá doporučením ECDC pro další aktivity, které by Česká republika měla zintenzivnit či dále rozpracovat v rámci průběžného zkvalitňování pandemické připravenosti. Společným mottem mnoha sdělení byl fakt, že národní pandemický plán i regionální plány musí být vzhledem ke své komplexnosti týmovou prací.

MUDr. Jan Kynčl, Ph.D.
Odb. skup. epidemiologie
CEM - SZÚ

Zjišťování přítomnosti genů kódujících produkci Shiga toxinů Stx1 a Stx2 u klinických izolátů *Escherichia coli*

Detection of genes encoding Shiga toxins Stx 1 and Stx 2 in E. coli clinical isolates

Monika Marejková, Petr Petráš, Miluše Vašáková

Souhrn • Summary

Kmeny *Escherichia coli* s produkcí Shiga toxinů jsou nejzávažnější z patogenních *E. coli*, vyvolávajících střevní onemocnění. Jsou příčinou hemoragické kolitidy (HK), která se může rozvinout v závažnou systémovou infekci, hemolyticko-uremický syndrom (HUS). V NRL pro *E. coli* a shigely jsme v roce 2006 zavedli zjišťování přítomnosti genů *stx1* a *stx2*, které kódují produkci Shiga toxinů Stx1 a Stx2, pomocí metody PCR. Dosud jsme vyšetřili 92 klinických izolátů *E. coli*. Přítomnost genů pro produkci Shiga toxinů jsme prokázali u 22 izolátů (24%). Sérotypově se jednalo o *E. coli* O157, O26 a O111. Schopnost produkovat Shiga toxiny je u kmenů *E. coli* důležitou informací při stanovení diagnózy vážných onemocnění HK a HUS. Metodou PCR jsme schopni zjistit tuto vlastnost nejpozději do 48 hodin.

Shiga toxin producing strains are the most serious of pathogenic Escherichia coli involved in intestinal infections. They cause hemorrhagic colitis (HC) that may progress to hemolytic uremic syndrome (HUS), a serious systemic infection. This year, NRL for E. coli has implemented PCR detection of the stx1 and stx2 genes encoding Shiga toxins Stx1 and Stx2. To date, the presence of genes encoding Shiga toxins was detected in 22 (24 %) of 92 clinical E. coli isolates tested. Shiga toxin producing isolates were classified into serotypes O157, O26 and O111. Detection of the capacity for producing Shiga toxins, crucial in diagnosis of HC and HUS, is currently feasible within 48 hours at the National Institute of Public Health.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2006; 15(10–11): 464–468.

Escherichia coli, snad nejznámější bakterie, je nejběžnější součástí střevní mikroflóry u zdravých lidí. Je většinou neškodným komenzálem či saprofytem, ale člověku též svým symbiotickým působením pomáhá (např. tvorbou kolicinů, či vitaminů). *E. coli* může ale být i příčinou střevních a mimostřevních onemocnění. Je jednou z nejčastějších příčin infekcí močových cest, dále může vyvolat respirační infekce, sepse, ranné infekce a další závažná onemocnění – většinou u hospitalizovaných pacientů a novorozenců [1].

Shigatoxigenní kmeny *E. coli* (STEC)

Kmeny *E. coli*, vybavené faktory virulence, mohou vyvolat vážná střevní onemocnění. Nejzávažnějšími jsou shigatoxigenní kmeny *E. coli* (STEC). Byly tak pojmenovány proto, že jejich toxin je velmi příbuzný Shiga toxinu kmenů *Shigella dysenteriae* sérotyp 1.

Kmeny STEC mohou produkovat další faktory virulence, především intimin a hemolysin. Intimin, kódovaný genem *eae*, je důležitý adhezenční faktor odpovědný za

„attaching – effacing léze“. Podstatou jeho působení je těsná vazba bakterií na enterocyty tlustého střeva [2].

Tyto vysoce virulentní kmeny vyvolávají hemoragické kolitidy s krvácením ve střevě. Označují se pak enterohemoragické *E. coli* (EHEC), které jsou podskupinou kmenů STEC. (Intimin mohou produkovat i kmeny ze skupiny enteropatogenních *E. coli*, označované EPEC). Hemoragická kolitida se v horším případě může rozvinout v hemolyticko-uremický syndrom (HUS). HUS je velice závažné systémové onemocnění, charakterizované triádou příznaků: mikroangiopatická anémie hemolyticko-neimunitního původu, snížení počtu trombocytů a akutního poškození ledvin. Onemocnění má nejvyšší incidenci u dětských pacientů do věku pěti let. U nemocných hrozí přechod do stádia chronického selhání ledvin, v nehorších případech i s letálním koncem [4, 5]. Je popisováno, že kmenů STEC je řádově 200 sérotypů, kmenů EHEC více jak 50, nejčastěji se uvádí O157, O111, O26, O91, O103, O145 a O113 [4].

Zatímco ve vyspělých zemích je většina případů HUS vyvolána kmeny STEC, v rozvojových zemích jsou to shigatoxigenní kmeny *Shigella dysenteriae* [4].

Shiga toxin kmenů STEC

Pionýrská práce, která vedla k objevení Shiga toxinu *E. coli*, byla provedena dr. Konowalchukem a jeho spolupracovníky v 70. letech v Kanadě. V průběhu výzkumu, zaměřeného na detekci termo-labilního enterotoxinu *E. coli* na buněčných liniích ledvin kočkodana bělozeleňého (tzv. Vero buňkách) pozorovali, že filtrát kultury některých kmenů *E. coli* vykazuje ireverzibilně cytopatický efekt, na rozdíl od reverzibilního cytotoxického efektu termo-labilního enterotoxinu jiných kmenů [6]. Shiga toxin kmenů STEC se proto původně označoval Verotoxin (VT) a kmeny, které jej produkovaly, se nazývaly verotoxigenní *E. coli* (VTEC). Shiga toxin je cytotoxin a kromě buněk linie Vero vykazuje též cytopatické účinky k buněčným liniím HeLa, Daudi a dalším [7]. Shigatoxiny patří k neúčinnějším bakteriálním látkám v působení na eukaryotické buňky [4].

Shiga toxiny *E. coli* se dělí do dvou typů: Shiga toxin 1 (Stx1) a Shiga toxin 2 (Stx2). O'Brien et al. prokázali, že Stx1 i Stx2 vykazují podobnou strukturu a biologickou aktivitu jako Shiga toxin *Shigella dysenteriae* sérotyp 1 (Stx) [8], proto se taky dnes preferuje toto označení, které navrhnul Calderwood et al. [9], ale řada autorů používá starší nomenklaturu (Verotoxin, Shiga-like toxin), dnes považovanou za nesprávnou. Biochemicky mají tyto toxiny složené molekuly, sestávající z jedné subjednotky A o velikosti 32 kDa (má katalytickou funkci), a pěti subjednotek B o velikosti 7,7 kDa (váží se k glykolipidovému receptoru cílových buněk) [4].

Byly izolovány a popsány další varianty Stx1 i Stx2, lišící se v nukleotidové sekvenci obou subjednotek [10]. Shiga toxiny Stx1 a Stx2 jsou kódovány geny *stx1* a *stx2* na bakteriofágu [11].

Kmeny STEC s produkcí Stx1 nebo s kombinací obou toxinů Stx1 + Stx2 zpravidla způsobují průjemová onemocnění méně závažného průběhu, zatímco výluční pro-

ducenti Stx2 jsou obvykle nalezeni u pacientů s onemocněním HUS [10].

Kmeny *E. coli* O157:H7

Nejběžnějším zástupcem kmenů STEC je *E. coli* O157:H7 [12]. Z laboratorně diagnostického hlediska se tyto kmeny vyznačují neschopností štěpit sorbitol během 24 hod. To se využívá v modifikaci obvyklé půdy ve střevní bakteriologii, MacConkeyho agar, kdy je laktóza nahrazena sorbitolem a *E. coli* O157:H7 na těchto půdách roste v bezbarvých koloniích. Dalším užitečným znakem je i negativní test na beta-glukuronidázu (známý Colitest fy Pliva-Lachema diagnostika, s.r.o.). Tyto kmeny jsou vysoce infekční, podobně jako u shigel stačí malá infekční dávka asi 10 až 100 bakterií [1, 7]. Kmeny *E. coli* O157:H7 jsou zařazeny do 3. bezpečnostní kategorie (biosafety level) mezi mikroby, podobně jako *Salmonella* Typhi, *Shigella dysenteriae* 1, *Vibrio cholerae*, *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis* nebo původce antraxu *Bacillus anthracis*.

Průkaz Shiga toxinů

Průkaz Shiga toxinů se provádí klasicky na Vero buňkách, ale dnes spíše jednoduššími a ve formě kitu komerčně dostupnými imunodetekčními metodami jako jsou latexová aglutinace, enzymatická imunoassay (EIA) nebo metoda imunoblotu.

Průkaz genů kódujících Shiga toxiny (*stx1*, *stx2*) se provádí buď pomocí genetických sond, nebo metodou polymerázové řetězové reakce (PCR).

České kmeny STEC izolované od dětí s onemocněním HUS v pražské nemocnici Motol poprvé prezentovala Bielaszewska se spolupracovníky v roce 1990 [13] a později, v rozšířené studii, v roce 1996 [14]. První kmeny s prokázanou produkcí Shiga toxinů v naší laboratoři publikovala Lhotová et al. [15, 16].

NAŠE VÝSLEDKY

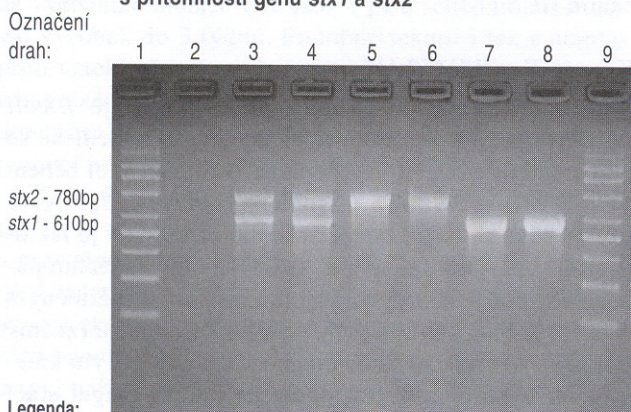
V SZÚ-CEM jsme zavedli zjišťování přítomnosti genů *stx1* a *stx2*, které kódují produkci Shiga toxinů Stx1 a Stx2, pomocí PCR, na začátku roku 2006. Metodou PCR diagnostikujeme i přítomnost genu *eae*, který je zodpovědný za produkci adhezinu intiminu.

Stručná metodika

Kmeny *E. coli* byly inkubovány 18 hodin na krevním agaru. Genomová DNA byla izolována pomocí činidla Chelex, nebo Insta Gene Matrix (firma Biorad). Do reakce byly použity primery pro detekci genů *stx1*, *stx2* a *eae*. Oligonukleotidové primery byly navrženy podle publikovaných sekvencí [17]. PCR byla prováděna podle metody Crothers a spol. [17].

Po amplifikaci byl výsledný produkt analyzován elektroforézou v 2% agarózovém gelu s přídavkem etidium bromidu. Elektroforéza proběhla 40 min. při 120V. Vizualizace byla provedena prosvícením gelu UV lampou (Obrázek 1).

Obrázek 1: Elektroforetogram vybraných kmenů s přítomností genů *stx1* a *stx2*



Legenda:

- Dráha č. 1 a 9: marker,
č. 2: kmen bez přítomnosti *stx1* i *stx2*,
č. 3 a 4: kmeny s geny kódujícími *Stx1* a *Stx2*,
č. 5 a 6: kmeny s genem *stx2*,
č. 7 a 8: kmeny s genem *stx1*.

Produkce Shiga toxinů byla potvrzena metodou reverzní pasivní latexové aglutinace (latexové kity VTEC-RPLA Denka Seiken a Oxoid).

Diagnostikované kmeny

Dosud jsme vyšetřili celkem **117** kmenů *E. coli* (92 klinických izolátů a 25 vzorků z externího hodnocení kvality) na přítomnost genů kódujících oba typy Shiga toxinů.

Celkem **92** izolátů pocházelo z klinického materiálu pacientů z let 1980–2006. Nejčastěji (74 kmenů, tj. 80 %) to byly kmeny ze stolice. Celkem 61 kmenů bylo ze sbírky NRL pro *E. coli* a shigely a dále bylo diagnostikováno 31 izolátů z roku 2006, které byly již cíleně zaslány k vyšetření na produkci Stx. V posledních 4 letech nám byly zaslány čtyři kmeny v souvislosti s onemocněním HUS: dva kmeny v roce 2003 a dva v r. 2006.

Celkem **25** kmenů se k nám dostalo k vyšetření na přítomnost genů kódujících shigatoxiny *Stx1* a *Stx2* z mezinárodního hodnocení kvality laboratoří zabývajících se problematikou střevních bakterií, organizovaného mezinárodním WHO *Escherichia* a *Klebsiella* Centrem z Kodaně v Dánsku.

Výsledky

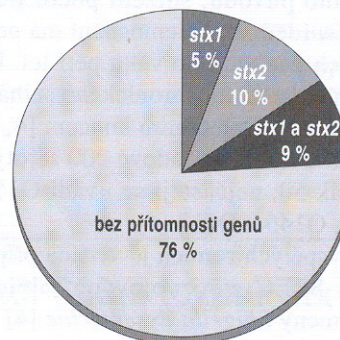
V souboru **92** klinických kmenů jsme prokázali přítomnost genů pro Stx u **22** (24%). Z toho **5** bylo *stx1* po-

zitivních, **9** *stx2* pozitivní, a **8** izolátů obsahovalo v DNA geny pro oba typy Stx (viz graf 1).

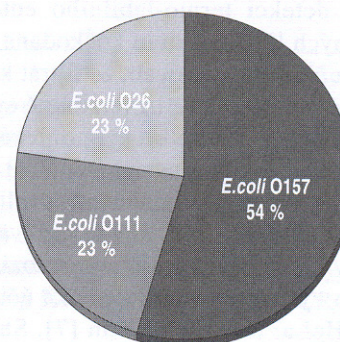
U **18** Stx pozitivních STEC byl též prokázán gen *eae*, kódující adhezní faktor intimin.

Podle sérotypizace bylo mezi 22 kmeny STEC 12 izolátů *E. coli* O157 a po pěti izolátech *E. coli* O26 a *E. coli* O111 – viz graf 2.

Graf 1: Přítomnost genů kódující produkci shigatoxinů *Stx1* a *Stx2*. Celkem 92 klinických izolátů *E. coli*



Graf 2: Rozdělení klinických izolátů shigatoxigenních *E. coli* podle sérotypu. Celkem 22 klinických izolátů STEC



V posledních 4 letech byly do SZÚ zaslány 4 kmeny *E. coli* z případů HUS. U všech byla zjištěna produkce Stx, DNA všech čtyř kmenů rovněž obsahovala gen kódující adhezín intimin. Sérotypově byly dva izoláty O157, po jednom O26 a O111 – viz tabulka 1.

Tabulka 1: Diagnostikované kmeny *E. coli* z případu HUS

Případ:	1.	2.	3.	4.
Datum	18.7.2003	1.10.2003	14.3.2006	6.6.2006
Pacient	chlapec	dívka	chlapec	dívka
Věk	1 rok	2 roky	5 roků	3 roky
Lokalita	Praha 2, VFN	Praha 5, Motol	Praha 5, Motol	Praha 5, Motol
Materiál	moč	stolice	stolice	stolice
Sérotyp <i>E. coli</i>	O157	O111	O157	O26
Produkce shigatoxinu	Stx1+Stx2	Stx1+Stx2	Stx1+Stx2	Stx2
Gen pro intimin	přítomen	přítomen	přítomen	přítomen

V tabulce 2 jsou uvedeny sérotypy kmenů STEC, které nám byly zaslány jako okružní vzorky „Ring trial of sero- and virulence typing of Verocytotoxin-producing *E.coli* (VTEC)“ z „International *Escherichia* and *Klebsiella* Centre (WHO)“ v Kodani v Dánsku. Mezi 25 kmeny STEC bylo diagnostikováno 15 různých sérotypů, nejčastěji opět *E.coli* O157 a *E.coli* O26.

Tabulka 2: Sérotypy kmenů STEC z mezinárodního hodnocení kvality

č.	sérotyp <i>E.coli</i>	počet kmenů s genem <i>stx1 a/nebo stx2</i>
1	O26	4
2	O38	1
3	O51	1
4	O55	1
5	O91	1
6	O103	2
7	O113	1
8	O117	1
9	O121	1
10	O128	1
11	O145	2
12	O146	1
13	O154	1
14	O157	6
15	O174	1
Celkem		25

(Ring trial of sero- and virulence typing of Verocytotoxin-producing *E.coli* (VTEC) z International *Escherichia* and *Klebsiella* Centre (WHO) v Kodani v Dánsku.

Závěr

Schopnost produkovat shigatoxiny je u kmenů *E.coli* důležitou informací při stanovení diagnózy onemocnění, které patogenní *E.coli* mohou vyvolat, především hemoragická kolitida a hemolyticko-uremický syndrom. Kmeny izolované s podezřením na tuto závažná onemocnění pošlete do NRL pro *E.coli* a shigely SZÚ–CEM. Metodou PCR jsme schopni zjistit tuto vlastnost nejpozději do 48 hodin, v optimálním případě i do 6 hodin.

Poděkování

Autoři děkují dr. Martině Bielaszewské z Münsteru za cenné a podnětné rady. Poděkování patří i dr. Čestmíru Benešovi, vedoucímu Centra pro analýzu epidemiologických dat SZÚ a kolegům z VFN Praha 2 a z FN Praha 5 Motol za poskytnutí dokumentace k případům HUS.

LITERATURA

- Votava M, a kol. Lékařská mikrobiologie speciální, Brno, Neptun 2003; str. 64–66.
- McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MNS, Kaper JB. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1664–1668.
- Jürgens D, Özel M, Takaisi–Kikuni NB. Production and characterization of *E.coli* enterohemolysin and its effects on the structure of erythrocyte membranes. *Cell Biology International* 2002; 26(2): 175–186.
- Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews* 1998; 11(3): 450–479.
- Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *E.coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 2005; 365(9464): 1073–1086.
- Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *E.coli*. *Infect Immun* 1997; 18(3): 775–779.
- Karmali AM. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Klin mikrobiol Rew* 1989; 2(1): 15–38.
- O' Brien AD, La Veck GD. Purification and characterization of *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *E.coli*. *Infect Immun* 1983; 40: 675–683.
- Calderwood SB, Auclair F, Donohue–Rolfe A, et al. Nucleotide sequence of shiga-like toxin genes of *E.coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 4364–4368.
- Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, et al. *Escherichia coli* harboring shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *The Journal of Infectious Diseases* 2002; 185: 74–84.
- Muniesa M, Recktenwald J, Bielaszewska M, et al. Characterization of a Shiga Toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin. *Infection and Immunity* 2000; 68: 4850–4855.
- Cryan B. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Scand J Infect Dis* 1990; 22: 1–4.
- Bielaszewska M, Sramkova L, Janda J, Blahova K, Ambrozova H. Verotoxigenic (enterohaemorrhagic) *Escherichia coli* in infants and toddlers in Czechoslovakia. *Infection* 1990; 18(6): 352–356.
- Bielaszewska M, Janda J, Blahova H, et al. Verocytotoxin-producing *E.coli* in children with hemolytic uraemic syndrome in the Czech Republic. *Clin Nephrol* 1996; 46: 42–44.
- Lhotová H, Ševčíková A. Závažný průběh hemolyticko-uremického syndromu u dítěte vyvolaný kmenem *E.coli* O157:H7 produkujícím verocytotoxin. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2000; 9(10): 405–406.
- Lhotová H. Výskyt shigatoxin produkujících kmenů *E.coli* v České republice. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2001; 10(11): 438–439.
- Crothers JLD, Moore JE, Miller BC, et al. Determination of verocytotoxin and *eae* gene loci by multiplex PCR in *Escherichia coli* O157: H7 isolated from human faeces in Northern Ireland: a four-year study of trends, 1997–2000. *British Journal of Biomedical Science* 2004; 61(1): 1–7.

ing. Monika Marejková
dr. Petr Petráš
Miluše Vašáková
OS střešní bakteriální infekce
SZÚ – CEM

