

Laboratorní diagnostika Shiga toxin-produkujících *E. coli* v Národní referenční laboratoři pro *E. coli* a shigely a metodická doporučení pro klinické laboratoře

Laboratory diagnostics of Shiga toxin-producing E. coli in the National Reference Laboratory for E. coli and Shigella and methodological guidelines for clinical laboratories

Zuzana Ileninová, Petra Klimešová, Klára Schlosserová, Johana Kotiš, Julia Kseničová, Ondřej Daniel, Martina Bielaszewska, Monika Havlíčková-Marejková

Souhrn • Summary

V tomto článku podáváme metodickou informaci o laboratorní diagnostice infekcí vyvolaných Shiga toxin-produkujícími kmeny *E. coli* s důrazem na molekulární metody. Dále informujeme o zavedení celogenomového sekvenování těchto kmenů v Národní referenční laboratoři pro *E. coli* a shigely pro účely rozpoznání národních i mezinárodních epidemií.

We provide methodological information about laboratory diagnostics of infections caused by Shiga toxin-producing *E. coli* strains with a particular emphasis on molecular methods. We also report on the implementation of the whole-genome sequencing for the detection of national and international outbreaks caused by these pathogens.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2022; 31(1): 15–22

Klíčová slova: Národní referenční laboratoř pro *E. coli* a shigely, *E. coli*, patotyp, faktory virulence, Shiga toxiny, Shiga toxin-produkující *E. coli*, hemolyticko-uremický syndrom, séroskupina, patogenita, celogenomové sekvenování, klastr, metodická doporučení

Keywords: National Reference Laboratory for *E. coli* and *Shigella*, *E. coli*, pathotype, virulence factors, Shiga toxins, Shiga toxin-producing *E. coli*, hemolytic-uremic syndrome, serogroup, pathogenicity, whole genome sequencing, cluster, methodological guidelines

Analýza střevně-patogenních kmenů *E. coli* v NRL/ECS a jejich hlášení do ISIN

Hlavní náplní práce Národní referenční laboratoře pro *E. coli* a shigely (NRL/ECS) je podrobná analýza kmenů *E. coli* zaslaných do NRL/ECS k průkazu jejich patogenních vlastností. V převážné většině se jedná o kmeny *E. coli* z rektálních výtěrů a stolice od pacientů s průjmem, které však nelze běžnými metodami (tedy pomocí kultivace a následně sérotypizace) odlišit od nepatogenních kmenů *E. coli*, které jsou součástí střevní mikroflóry. V určitých závažných případech je do NRL/ECS zasílána přímo stolice pro následné zpracování specifickým postupem (viz kapitola Analýza kmenů STEC v NRL/ECS v letech 2020–2021).

Pro potvrzení patogenity kmenů *E. coli* a jejich následné zařazení do patoskupin neboli patotypů střevně-patogenních *E. coli* je nevyhnutelné použití molekulárních metod (např.

PCR), kterými lze detekovat geny kódující různé faktory virulence či jiné markery, které jsou specifické pro daný patotyp [1, 2, 3]. Přehled těchto markerových genů, které v NRL/ECS detekujeme, je uveden v **Tabulce 1**. Určení patotypu je důležité nejen z diagnostického hlediska, ale i z hlediska terapeutického a zejména epidemiologického. Infekce patogenními kmeny *E. coli* se následně hlásí do Informačního systému infekční nemoci (ISIN) pod diagnózou odpovídající detekovanému patotypu.

Jak je patrné z Tabulky 1, kmeny *E. coli* též séroskupiny mohou patřit k různým patotypům, případně se může jednat o hybridy patotypů. Např. původce rozsáhlé epidemie průjmu a hemolyticko-uremického syndromu (HUS) v Německu v roce 2011 byla *E. coli* O104 nesoucí geny *stx2* a *aggR*, tedy hybrid Shiga toxin-produkující *E. coli* (STEC) a enteroagregativní *E. coli* (EAEC) [4].

Pokud diagnostická laboratoř neprovádí testování markerových genů, není možné zařadit kmen *E. coli* (pouze na základě sérotypizace) do správného patotypu, a není tak možné nahlásit pacienta do systému ISIN pod odpovídající diagnózou. V takovém případě doporučujeme zaslat kmeny *E. coli* k dourčení patotypu do NRL/ECS ve Státním zdravotním ústavu (SZÚ) Praha. V tomto článku se dále podrobněji věnujeme laboratorní diagnostice kmenů STEC.

Laboratorní diagnostika kmenů STEC

STEC, označované také jako enterohemoragické *E. coli* (EHEC) nebo Verocytotoxin-produkující *E. coli* (VTEC), představují z klinického hlediska nejzávažnější patotyp

Tabulka 1: Přehled patotypů střevně-patogenních *E. coli* analyzovaných v NRL/ECS

Patotyp střevně-patogenních <i>E. coli</i>	Markerový gen	Typická O-skupina – vypsány pouze ty, které testuje NRL/ECS (aglutinačně nebo PCR)	Klinický obraz	Kód dg pro hlášení do ISIN
STEC (Shiga toxin-produkující)	<i>stx1, stx2</i>	asi 150 různých O-skupin! „TOP 5“: 26, 103, 111, 145, 157 časté v EU také: 55, 80, 91, 121, 128, 146, 174	Akutní vodnaté, často i krvavé průjmy – zejm. u dětí do 5 let a dospělých nad 60 let. U 5–15 % případů hrozí riziko rozvoje HUS.	A04.3 Enterohemoragické infekce, původce: <i>Escherichia coli</i>
EPEC (enteropatogenní)	<i>eae</i>	26, 55, 86, 103, 111, 114, 118, 119, 125, 126, 127, 128, 142, 157, 158	Silné vodnaté průjmy, občas i s krví, zejm. u dětí do 5 let.	A04.0 Enteropatogenní infekce, původce: <i>Escherichia coli</i>
ETEC (enterotoxigenní)	<i>elt, estIA, estIB</i>	6, 8, 15, 20, 25, 27, 29, 55, 63, 73, 78, 86, 114, 115, 119, 126, 128, 136, 148, 153, 159, 166, 167, 169	Akutní vodnaté průjmy dětí a dospělých, obvykle s cestovatelskou anamnézou.	A04.1 Enterotoxikogenní infekce, původce: <i>Escherichia coli</i>
EIEC (enteroinvazivní)	<i>ipaH</i>	28, 29, 112, 115, 121, 124, 136, 143, 144, 152, 159, 164, 167	Onemocnění klinicky podobné bacilární dysenterii, obvykle s cestovatelskou anamnézou.	A04.2 Enteroinvazivní infekce, původce: <i>Escherichia coli</i>
EAEC (enteroagregativní)	<i>aggR</i>	15, 44, 86, 104, 111, 125, 126, 128	Akutní nebo chronické průjmy dětí a dospělých, u 30 % i s krví. Obvykle s cestovatelskou anamnézou.	A04.4 Jiné střevní infekce, původce: <i>Escherichia coli</i>

Tabulka vychází z referencí [2] a [3].

střevně-patogenních *E. coli* u lidí. V průběhu infekce produkují tyto kmeny ve střevním traktu Shiga toxiny, které se po absorpci dostávají krevní cestou do cílových orgánů (ledviny, mozek), kde poškozují mikrovaskulární endotel. Rezultující trombotická mikroangiopatie je patofyziologickým podkladem závažného průběhu infekce STEC, a to hemoragické kolitidy (průjmu s masivní příměsí krve) a život ohrožujícího HUS [5]. HUS vyvolaný kmeny STEC (také označovaný jako typický HUS) se rozvíjí u cca 5–15 % pacientů s infekcí STEC, a to zejména u dětí do 5 let a starších lidí [6, 7]. V případě rozvoje HUS hrozí ve 3–5 % úmrtí a až u 30 % přeživších pacientů se mohou rozvinout pozdní komplikace (proteinurie, hypertenze, neurologické příznaky, snížená glomerulární filtrace a chronické renální selhání, které může vést až k nutnosti transplantace ledvin) [8, 9].

STEC jsou také původci nekomplikovaných vodnatých průjmů, u cca 50 % pacientů bez přítomnosti zvýšené teploty; popsáno bylo také asymptomatické nosičství STEC v rodinách s výskytem tohoto onemocnění [10]. Infekční dávka STEC je nízká (< 50 bakterií), fekálně-orální přenos je proto snadný; dominantním rezervoárem je hovězí dobytek [3, 7].

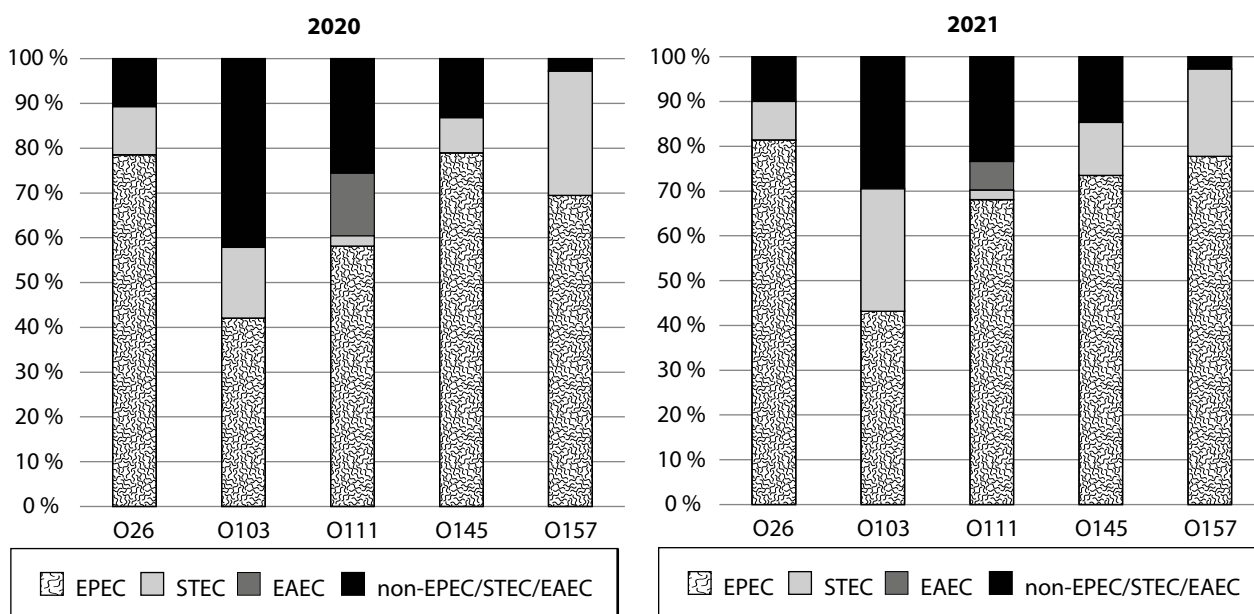
Z důvodu závažnosti průběhu infekcí způsobených kmeny STEC jsou tyto infekce zařazeny do **systemu epidemiologické bdělosti** dle vyhlášky 473/2008 Sb. ve znění pozdějších předpisů [11]. Dle této vyhlášky jsou mikrobiologické laboratoře v České republice povinné zasílat suspektní kmeny STEC do NRL/ECS v SZÚ Praha, a to zejména séro skupiny patřící do tzv. „TOP 5“: O26, O103, O111, O145 a O157. Tato pětice představuje séro skupiny nejčastěji detekované u kmenů STEC zodpovědných za závažná lidská onemocnění včetně HUS [7, 12]. Je však nutno dodat, že ne

všechny kmeny „TOP 5“ séro skupin patří k patotypu STEC. **Patotyp kmenů *E. coli* není dán séro skupinou, nýbrž přítomností faktorů virulence charakteristických pro daný patotyp** (Tabulka 1).

Pro potvrzení patotypu STEC je vždy nutná detekce genů pro Shiga toxiny nebo detekce vyprodukovaných Shiga toxinů. Evropská legislativa připouští ještě další dvě kritéria pro laboratorní diagnostiku STEC, a to průkaz specifických anti-O protilátek (pouze u pacientů s HUS) a kultivační průkaz sorbitol-nefermentujících kmenů *E. coli* O157 [13]. I když sorbitol-nefermentující *E. coli* O157 patří mezi nejčastější séro skupiny STEC vyvolávající lidská onemocnění, je nutné zdůraznit, že nepřítomnost fermentace sorbitolu neznamená, že kmen *E. coli* O157 automaticky obsahuje gen pro produkci Shiga toxinu, a tudíž je STEC; toto je nutné v každém případě ověřit metodou PCR. Rádi bychom dále upozornili, že existují také sorbitol-fermentující kmeny STEC O157, které byly popsány jako původci průjmu a HUS především v Evropě [7, 12, 14]. Z diagnostického hlediska je také důležité připomenout, že naprostá většina séro skupin *E. coli* (včetně O26, O111, O103 a O145) jsou kmeny sorbitol-fermentující. Proto laboratorní diagnostika STEC založená pouze na sledování fermentace sorbitolu není správná.

Analýza kmenů *E. coli* „TOP 5“ v NRL/ECS v letech 2020–2021

V NRL/ECS jsme v letech 2020–2021 analyzovali 1 305 humánních kmenů *E. coli*, a to převážně od pacientů s průjmovou diagnózou. U 43,5 % analyzovaných vzorků (568 kmenů) jsme aglutinačně nebo metodou PCR prokázali

Graf 1: Podíl patotypů u kmenů *E. coli* patřících k „TOP 5“ séro skupinám, které byly vyšetřovány v NRL/ECS v roce 2020 a 2021

jednu z „TOP 5“ séro skupin, které jsou nejčastějšími producenty Shiga toxinů.

Gen pro Shiga toxin jsme (v obou letech shodně) potvrdili u **12 % všech kmenů patřících k „TOP 5“ doručených do NRL/ECS**: v roce 2020 u 32 z 267 kmenů, v roce 2021 u 36 z 301 kmenů. Nejvyšší podíl STEC mezi zaslanými kmeny dané séro skupiny jsme v roce 2020 zaznamenali u séro skupiny O157, kde 27,8 % (10 z 36) kmenů bylo pozitivních na gen *stx1*, *stx2* nebo jejich kombinaci. Druhý nejvyšší podíl kmenů STEC jsme v roce 2020 zaznamenali u séro skupiny O103 (15,8 %, tj. 6 z 38 kmenů). V roce 2021 se stala majoritní séro skupinou O103; až 27,3 % (12 ze 44) kmenů *E. coli* O103 patřilo k patotypu STEC. Druhý nejvyšší podíl kmenů STEC jsme v roce 2021 zaznamenali u séro skupiny O157; gen *stx* jsme detekovali u 19,4 % (7 z 36) všech zaslaných kmenů. Nejnižší podíl kmenů STEC jsme v obou letech detekovali u séro skupiny O111 (2,3 % resp. 2,1 %) (Graf 1).

Častěji se v rámci těchto „TOP 5“ séro skupin jednalo o patotyp enteropatogenní *E. coli* (EPEC). Až 68,9 % (184 z 267) kmenů zaslaných v roce 2020 a 72,4 % (218 z 301) kmenů zaslaných v roce 2021 bylo pozitivních na gen *eae* kódující intimin a zároveň negativních na geny *stx* (Graf 1). Nejvyšší podíl kmenů EPEC jsme zaznamenali u séro skupiny O26, kde 78,6 % (88 ze 112) kmenů v roce 2020 a 81,4 % (114 ze 140) kmenů v roce 2021 patřilo do tohoto patotypu (Graf 1).

Zhruba 15 % kmenů z „TOP 5“ zaslaných v letech 2020–2021 nepatřilo k žádné z testovaných patoskupin střevně-patogenních *E. coli*. Nejvyšší podíl takových kmenů jsme zaznamenali u séro skupiny O103 (42,1 % v roce 2020 a 29,5 % v roce 2021), naopak nejnižší podíl (2,7 % v obou letech) u séro skupiny O157. Dá se proto říci, že

pokud je ve vzorku detekován kmen *E. coli* O157, bude vysoce pravděpodobně patogenní, a to buď jako patotyp EPEC nebo STEC. U ostatních séro skupin z „TOP 5“ se pravděpodobnost patogenity (EPEC nebo STEC) pohybuje v rozmezí 58–90 %.

U kmenů *E. coli* nepatřících k „TOP 5“ byl nejčastěji detekován patotyp EPEC, a to u 15,1 % (111 ze 737) kmenů zaslaných do NRL/ECS v letech 2020–2021. Nejčastěji se jednalo o séro skupiny O55 (23 kmenů), O128 (16 kmenů) a O127 (11 kmenů).

Analýza kmenů STEC v NRL/ECS v letech 2020–2021

Kromě kmenů *E. coli* patřících k „TOP 5“ séro skupinám testujeme v NRL/ECS na přítomnost genu *stx* i všechny ostatní doručené kmeny *E. coli*. Důvodem je, že přítomnost genů *stx* není omezena jenom na výše zmíněné „TOP 5“ séro skupiny. V literatuře se udává více než 150 různých séro skupin *E. coli*, u kterých byly Shiga toxiny (nebo jejich geny) detekovány [2]. V rámci laboratorní diagnostiky je důležité mít na paměti, že **Shiga toxin může produkovat kmen *E. coli* jakékoliv séro skupiny**, protože *stx* gen se nachází v genomu bakteriofága, který se může integrovat do bakteriálního chromozomu různých kmenů *E. coli*, ale také vyčlenit a následně infikovat další kmeny *E. coli* [15]. Podle zpráv EFSA a ECDC se v Evropě kromě „TOP 5“ séro skupin často vyskytují u kmenů STEC také séro skupiny O55, O80, O91, O121, O128, O146 a O174 [3] (Tabulka 1). Při zasílání pouze „TOP 5“ séro skupin *E. coli* do NRL/ECS mohou být tak další kmeny STEC nezachyceny, a tudíž poddiagnostikovány.

Celkově jsme v roce 2020 diagnostikovali 35 případů infekcí STEC, v roce 2021 41 případů infekcí STEC, a to převážně u dětí do dvou let. Ve většině případů se jednalo

Tabulka 2: Zastoupení séro skupin u kmenů STEC analyzovaných v NRL/ECS v roce 2020 a 2021

Séro skupina STEC	Rok 2020					Rok 2021				
	počet (%)	průměr	krvavý průměr	HUS	asympt. průběh	počet (%)	průměr	krvavý průměr	HUS	asympt. průběh
O26	12 (34,3)	8	0	4	0	12 (29,3)	6	2	2	2
O103	6 (17,1)	6	0	0	0	12 (29,3)	9	1	0	2
O111	1 (2,9)	1	0	0	0	1 (2,4)	1	0	0	0
O145	3 (8,6)	2	0	1	0	4 (9,8)	1	1	2	0
O157	10 (28,6)	6	1	3	0	7 (17,1)	4	2	0	1
ONT	1 (2,9)	0	0	0	1	2 (4,9)	0	0	1	1
jenom gen <i>stx</i> (v případech stolic)	2 (5,7)	1	0	0	1	3 (7,3)	0	0	3	0
Celkem (%)	35 (100)	24 (68,6)	1 (2,9)	8 (22,9)	2 (5,7)	41 (100)	21 (51,2)	6 (14,6)	8 (19,5)	6 (14,6)

Pozn.: % jsou počítána z celkového počtu STEC za daný rok. Počty nezahrnují záchyty STEC z opakovaných a kontrolních odběrů. U každého pacienta je započítán nejzávažnější klinický průběh infekce (např. i u pacientů s typickým HUS je na počátku průjem, ale v tabulce je započítán HUS).

o kmeny STEC patří k séro skupinám „TOP 5“ (Tabulka 2). V roce 2020 jsme u kmenů STEC nejčastěji detekovali séro skupinu O26 (34,3 %), dále pak O157 (28,6 %) a O103 (17,1 %), méně často O111 nebo O145. V roce 2021 se v rámci kmenů STEC zvýšil podíl séro skupiny O103, u které byly geny *stx* detekovány stejně často jako u séro skupiny O26 (u obou 29,3 % kmenů); zároveň poklesl podíl kmenů STEC O157 (17,1 %). Ve třech případech se nám séro skupinu nepodařilo určit (ONT = O-antigen netypovatelný) (Tabulka 2).

V 16 případech (po 8 v obou letech) došlo v průběhu infekce k rozvoji HUS s dalšími pozdějšími komplikacemi, v jednom případě infekce skončila letálně. V převážně většině byl závažný průběh spojen s přítomností genů pro Shiga toxin 2. HUS jsme však zaznamenali i v případě dvou infekcí kmenem STEC produkujícím pouze Shiga toxin 1. I když se podle epidemiologických studií považuje za závažnější pro

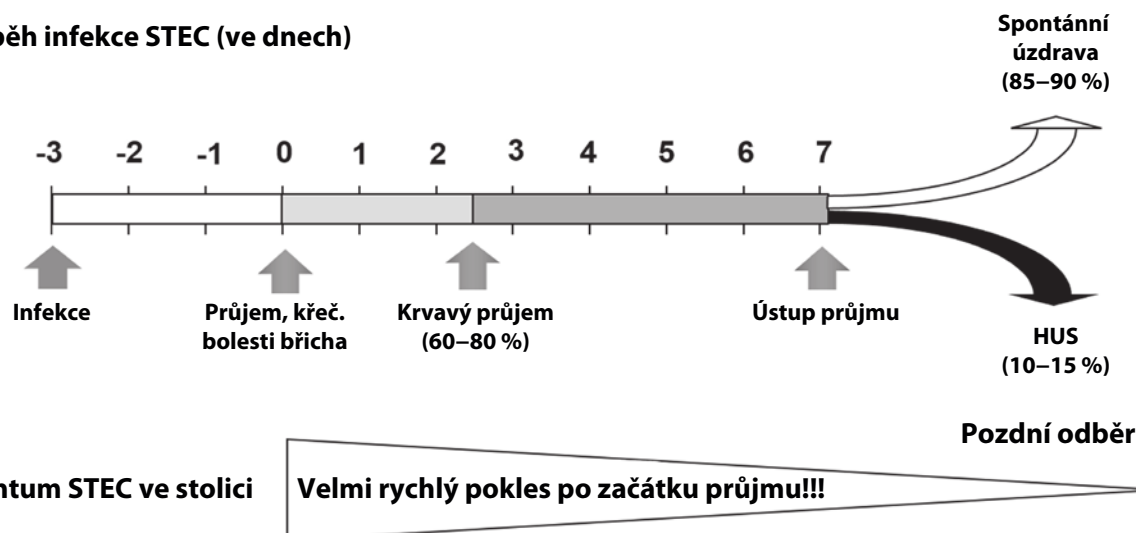
progresi infekce do HUS přítomnost Shiga toxinu 2 [7, 12, 16], potenciálně závažná je každá infekce kmenem STEC. **Průběh infekce STEC závisí také na dalších faktorech jako je věk, imunita pacienta a zejména infekční dávka, nikoliv na séro skupině** [3].

V pěti případech (4 % z analyzovaných stolic) jsme infekce STEC detekovali pouze na základě průkazu genů *stx* v primokultuře pomnožené stolice bez následné úspěšné izolace kmene obsahujícího tento gen. Pakliže stolice pocházejí od pacientů s HUS, detekce genů *stx* bez následného záchytu kmene STEC může být způsobená především těmito faktory:

a) nedodržením preanalytické fáze vyšetření, konkrétně skladováním stolice bez zmrazení, kdy může dojít k vyčlenění profágu s geny pro Shiga toxiny z bakteriálního chromozomu. V takovém případě je pomocí PCR možné prokázat gen *stx*, ale následně není možné najít kmen STEC v narostlé kultuře. I v případě detekce genů pro Shiga toxiny

Graf 2: Klinický průběh infekce STEC (adaptováno z publikace [6])

Průběh infekce STEC (ve dnech)



bez nálezu kmene STEC je však možné označit STEC za původce infekce [13].

b) pozdním odběrem stolice: od začátku průjmu do rozvoje HUS, což trvá asi týden, **množství bakterií STEC ve stolici pacienta rychle klesá (Graf 2)**, a může tak být ve stolici odebrané ve stadiu HUS na hranici detekovatelnosti pomocí kultivace. Při použití běžných postupů pro mikrobiologické vyšetření stolice v klinických laboratořích (tj. užití rektálního výtěru nebo stolice jako výchozího materiálu a jeho přímá inokulace na pevné plotny bez předchozího pomnožení) se tak kmeny STEC často nezachytí, protože jsou přerostlé kmeny *E. coli* patřícími k běžné mikroflóře. Pro zvýšení pravděpodobnosti průkazu infekce STEC u pacientů s HUS zavedla NRL/ECS optimalizovaný diagnostický postup, který kombinuje zvýšení kvantity výchozího materiálu (tj. vyšetření vzorku stolice, nikoliv pouze rektálního výtěru) s pomnožením v Hajna bujónu a následným využitím selektivních a citlivých metod ke specifickému průkazu STEC. Tyto postupy zahrnují **imunomagnetickou separaci** pro selektivní koncentraci STEC „TOP 5“ séroskupin a následnou kultivaci na sorbitol McConkey agaru (SMAC), SMAC s cefiximem a teluritem (CT-SMAC) a enterohemolysinovým agaru (EHLV agar). Narostlé kultury (směsi i jednotlivé suspektní kolonie) jsou následně testovány pomocí PCR na přítomnost genů kódujících faktory virulence (*stx* a *eae*). Tato metoda byla podrobně popsána v našich předchozích publikacích [9, 12, 17].

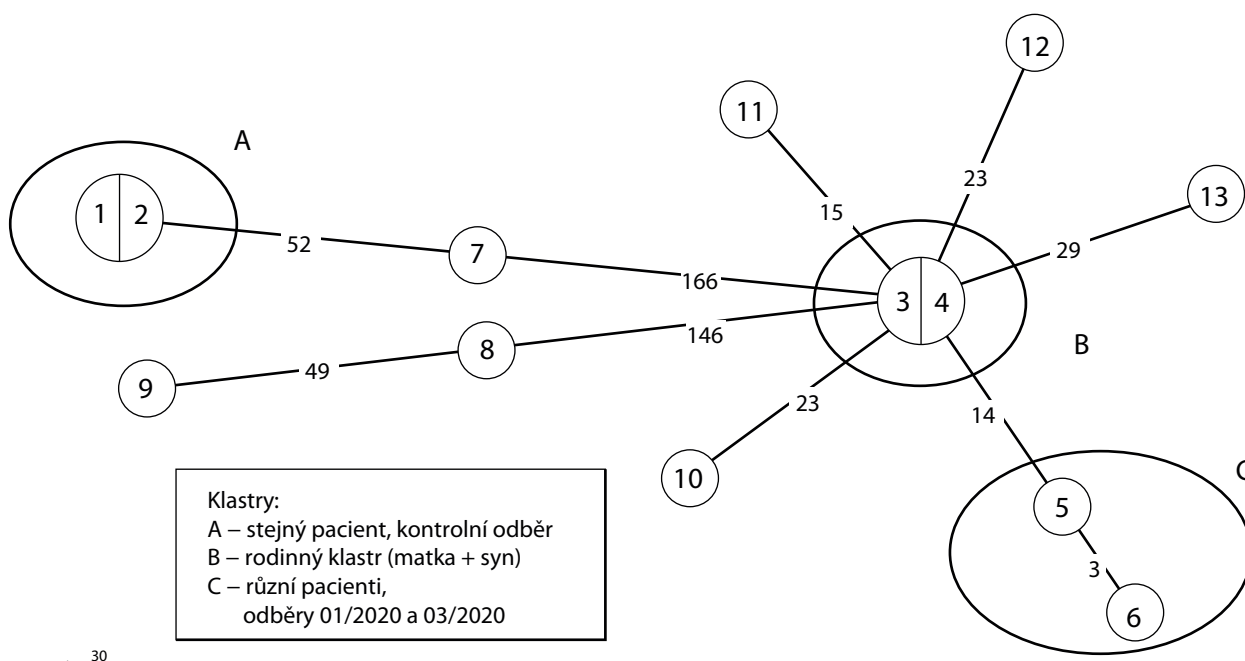
Po confirmaci přítomnosti genů *stx* v NRL/ECS jsou infekce STEC následně **hlášeny do systému ISIN pod**

diagnózou A04.3. NRL/ECS je pak dále každoročně hlásí za ČR do evropského systému TESSy. V průměru se jedná o 35 případů ročně (data za roky 2019-2021), což představuje incidenci 0,3 případů na 100 000 obyvatel. Je to výrazně méně než hlásí jiné země EU/EEA, kde se infekce STEC řadí na čtvrtou příčku nejčastěji hlášených alimentárních zoonóz (incidence za rok 2020 činila 1,59 případů na 100 000 obyvatel) [18]. Diagnostika infekcí STEC je v ČR stále založena na sérotypizaci a následném zasílání kmenů „TOP 5“ k průkazu *stx* do NRL/ECS. Efektivnější přístup k diagnostice STEC, primárně nezávislý na séroskupině, ale založený na průkazu *stx* genů (optimálně s následnou izolací kmene STEC), by velmi pravděpodobně navýšil počet případů infekce STEC v ČR. Tento postup popisujeme níže v odstavci **Metodická doporučení k detekci kmenů STEC v klinických laboratořích.**

Subtypizace a sekvenování kmenů STEC v NRL/ECS a následná detekce klastrů

Kmeny STEC jsou v NRL/ECS dále podrobeny subtypizaci genů *stx* pomocí PCR. V případě Shiga toxinu 1 testujeme subtypy *stx1a*, *stx1c* a *stx1d*, v případě Shiga toxinu 2 testujeme subtypy *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* a *stx2g* [19]. To nám umožňuje průběžně reagovat na informace z Evropského centra pro kontrolu nemocí (ECDC), které nás upozorňují na probíhající epidemie STEC v zemích EU. Pro potvrzení nebo vyloučení mezinárodní epidemie je, kromě epidemiologického šetření, nevyhnutelné porovnání českých kmenů STEC s kmeny z probíhajících epidemií

Graf 3: Vizualizace analýzy celogenomových dat třinácti kmenů STEC O26 *stx2*-pozitivních detekovaných u pacientů v ČR v letech 2020–2021



Pozn.: Vizualizace cgMLST dat použitím minimum spanning tree. Čísla v kroužcích označují jednotlivé kmeny, čísla na spojnicích označují počet odlišných alel. Písmena označují jednotlivé klastry.

z ostatních zemí. Porovnání kmenů musí být provedeno na základě dat získaných celogenomovou sekvenací (WGS).

Kromě toho je nutné v rámci surveillance průběžně sekvenovat také ostatní kmeny STEC, a to z důvodu včasné detekce suspektních klastrů, které mohou přerůst až do národních epidemií. Po úspěšném zavedení WGS v NRL pro salmonely se tuto metodu podařilo implementovat také v NRL/ECS (úspěšné absolvování externího hodnocení kvality pro NRL na úrovni EU v roce 2020). Data získaná celogenomovou sekvenací jsou průběžně vkládána do Enterobase, kde jsou vyhodnocována za využití cgMLST schématu (schéma bere v potaz 2 513 stabilních variant genů – lokusů, které se nacházejí v genomu rodu *Escherichia*) [20]. **Graf 3** uvádí příklad vyhodnocení WGS dat třinácti kmenů STEC O26 *stx2*-pozitivních, kde můžeme pozorovat 3 různé klastry. Kromě klastru dvou pacientů bez známé epidemiologické souvislosti (klastr C), se data shodovala také v případě dvou pacientů s epidemiologickou souvislostí (rodinný klastr B) a také v případě kontrolních odběrů od stejného pacienta (klastr A). Kromě těchto tří klastrů STEC O26 *stx2*-pozitivních jsme v letech 2021-2022 detekovali také dva klastry STEC O157 *stx2*-pozitivních, dva klastry STEC O103 *stx1*-pozitivních a jeden klastr STEC O26 *stx1*-pozitivních (nepublikovaná data). I zde se v několika případech jednalo o rodinné klastry nebo kontrolní odběry. Celkově tyto dosavadní výsledky považujeme za důkaz spolehlivosti fungování metodiky WGS tak, jak byla zavedena v NRL/ECS.

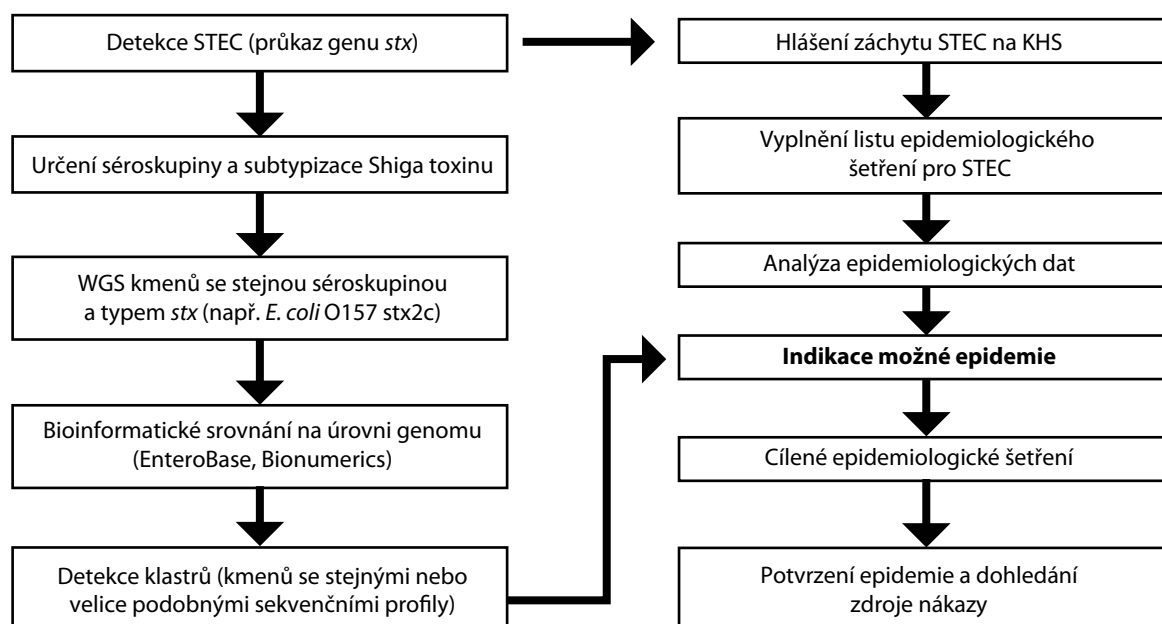
V případě identifikace klastrů jsou následně kontaktováni kolegové z Oddělení epidemiologie infekčních nemocí SZÚ a příslušná krajská hygienická stanice (KHS). Pro identifikaci vehikula, popř. zdroje nákazy, je nutné využít listu epidemiologického šetření (dotazníku) – formulář je

k dispozici na stránce NRL/ECS <http://www.szu.cz/narodni-referencni-laborator-pro-e-coli-a-shigely>. Tyto listy je vhodné průběžně vkládat k jednotlivým případům v systému ISIN. Vyhodnocení listů epidemiologického šetření nás může navést k možnému vehikulu či zdroji nákazy. Ten je možné ve spolupráci s KHS, Státní veterinární správou a Státní zemědělskou a potravinářskou inspekcí dále prošetřit. V případě záchytu kmenů STEC z potravin, vody nebo zvířat je dále nutné porovnání celogenomových sekvencí těchto kmenů s humánními kmeny tvořícími suspektní klastr. Tímto postupem se nám v roce 2020 podařilo došetřit epidemii v dětském táboře, kde u několika účastníků byly zaznamenány průjmy, někdy až krvavé; v jednom případě se rozvinul HUS s fatálním koncem. Na základě sekvenčních dat byla potvrzená shoda kmene STEC O157 izolovaným ze studniční vody s kmenem STEC O157 izolovaným ze stolice pacientky. Voda ze studny tak byla potvrzena jako vehikulum přenosu této infekce (nepublikovaná data). I z tohoto důvodu je nutné zasílat suspektní nebo potvrzené kmeny STEC z mikrobiologických laboratoří do NRL/ECS. Celý postup od detekce kmenů STEC po potvrzení epidemie znázorňuje **Graf 4**. Tento algoritmus je v NRL/ECS používán zejména pro účely surveillance; v případě explozivní epidemie je algoritmus mírně pozměněn.

Metodická doporučení k detekci kmenů STEC v klinických laboratořích

Protože přítomnost genů *stx* a produkce Shiga toxinů jsou typickými a současně jedinými společnými vlastnostmi kmenů STEC, je pro zařazení kmene *E. coli* do patotypu STEC nutný průkaz těchto vlastností. Vzhledem k této skutečnosti a k tomu, že v současné době užívaná sérotypizace nedetekuje patotypy, doporučujeme pro **zvýšení záchytu kmenů**

Graf 4: Postup v případě detekce STEC a následného šetření epidemie v NRL pro *E. coli* a shigely



Tabulka 3: Doporučený postup pro vyšetření rektálních výtěrů od pacientů s průjmem na STEC v klinických laboratořích

<p>1) Kultivace primárního materiálu*</p> <ul style="list-style-type: none"> • EHLy agar: kmeny STEC „TOP 5“ (kromě sorbitol-fermentujících STEC O157) tvoří neúplnou (EHEC-Hly) hemolýzu (není viditelná na standardním krevním agaru) – viz obr. 1. EHLy agar doporučujeme jako medium první volby. • SMAC: odlišení sorbitol-negativních <i>E. coli</i> O157 (bezbarvé) od ostatních <i>E. coli</i> (růžové) • CT-SMAC: inhibice fyziologické flóry; většina kmenů STEC „TOP 5“ roste: sorbitol-nefermentující O157 jako bezbarvé s černým středem, ostatní jako růžové kolonie. Sorbitol-fermentující O157 nerostou.
2) Screeningová PCR ze směsné kultury na geny <i>stx</i>
3) V případě pozitivní screeningové PCR konfirmační PCR z několika izolovaných kolonií různých morfologií
4) Pozitivní kolonii/kolonie zaslat do NRL/ECS (konfirmasi, subtypizace, sekvenování, uchování pro epidemiologické účely – Vyhláška 473/2008 Sb.)

* Užití kombinace několika různých selektivně-diagnostických půd zvyšuje pravděpodobnost záchytu kmene STEC.

STEC u pacientů s průjmem v klinických laboratořích následující postup (Tabulka 3).

Tento postup, který doporučujeme zejména pro vyšetření dětí s průjmem do 5 let (ale také pro dospělé s krvavým průjmem), zahrnuje: 1) kultivaci rektálního výtěru (případně stolice) na selektivně-diagnostických půdách, které umožňují odlišit potenciální kmeny STEC od fyziologické střevní flóry; 2) následný skrining směsí odebraných z diagnostických půd na geny *stx1* a *stx2* pomocí PCR (sekvence primerů poskytne NRL/ECS na požádání); 3) v případě *stx*-pozitivní směsné kultury testování suspektních kolonií různé morfologie na geny *stx*; 4) zaslání kolonií pozitivních na geny *stx* do NRL/ECS ke confirmaci a dourčení. V případě neúspěšné izolace kmene STEC z *stx*-pozitivní směsné kultury je možné se domluvit na možnosti zaslat tuto kulturu do NRL/ECS k další analýze.

V případě odběru **stolice od pacienta s HUS odešle klinická laboratoř tuto stolicí bezodkladně do NRL/**

Tabulka 4: Mikrobiologická diagnostika infekce STEC u pacientů s HUS

<p>Vzorek stolice zaslat co nejdříve do NRL pro <i>E. coli</i> a shigely, SZÚ. Zde se provádí:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Selektivní pomnožení stolice 2) Imunomagnetická separace 3) Kultivace na selektivně-diagnostických půdách 4) PCR na geny kódující Shiga toxiny (<i>stx₁</i>, <i>stx₂</i>) – ze směsi a z několika kolonií různých morfologií 5) Další typizace (sérotypizace, subtypizace, sekvenování) <i>stx</i>-pozitivního kmene
--

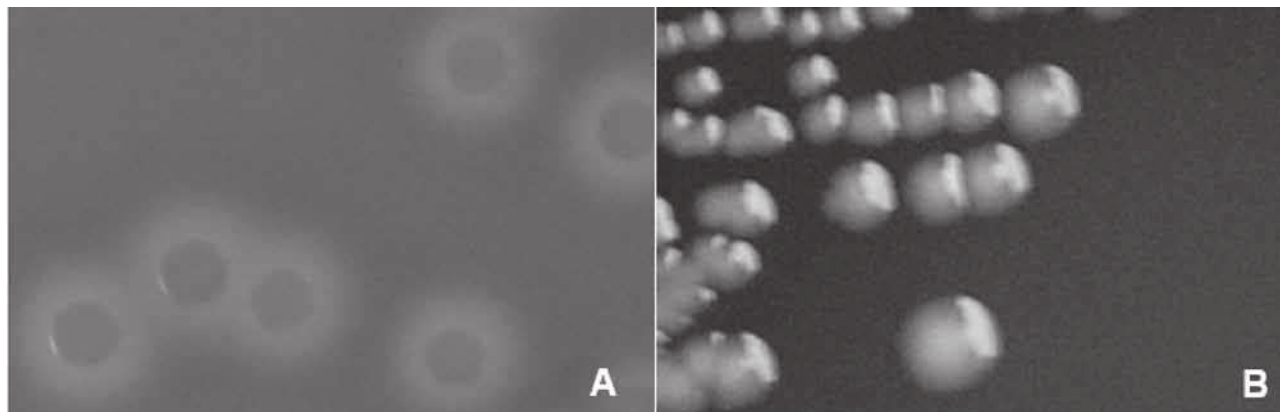
ECS. Důvodem je malé kvantum STEC bakterií ve stolici pacienta ve stadiu rozvoje HUS (**Graf 2**) a nutnost užití specializovaných metod pro průkaz STEC v těchto stolicích (viz výše a **Tabulka 4**), které jsou dostupné v NRL/ECS.

Pokyny pro uskladnění a transport stolice k průkazu STEC: Pro vyšší záchyt kmenů STEC ze stolic je potřeba dodržet preanalytickou fázi: při skladování a transportu do 24 hodin uchovávat stolice při teplotě 2-8 °C, při skladování a transportu nad 24 hodin při teplotě -20 °C. Je to důležité z důvodu minimalizace ztráty genů pro Shiga toxiny, což by znemožnilo detekci kmenů STEC.

Upozornění pro nakládání s kmeny STEC: Ve Vyhlášce č. 474/2002 ve znění pozdějších předpisů, kterou se provádí Zákon č. 281/2002 o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní [21], jsou kmeny STEC zařazeny na seznam vysoce rizikových biologických agens a toxinů (VRAT). Proto pro laboratoře, které nakládají s těmito patogeny, vyplývá řada povinností vůči Státnímu ústavu pro jadernou bezpečnost (ohlašovací povinnost, evidence a deklarace kmenů, aj.). Doporučujeme také zajistit zvýšenou ochranu pracovníků při práci s těmito patogeny (ochranné pomůcky, práce v hazard boxu).

SHRnutí

Infekce STEC patří k závažným onemocněním lidí, zejména dětí do 5 let. Diagnostika agens spočívá v detekci

Obrázek 1: Typický růst kmenů STEC na EHLy agaru (A) a standardním krevním agaru (B)

Pozn.: A: Většina kmenů STEC na EHLy agaru: neúplná hemolýza (EHEC-Hly fenotyp). B: Kmeny STEC s EHEC-Hly fenotypem na krevním agaru: žádná hemolýza!

Shiga toxinů nebo genů, které je kódují. Pro posouzení patogenity kmenů *E. coli* je proto vždy nutný průkaz specifických faktorů virulence pomocí molekulárních metod. Suspektní i potvrzené kmeny STEC je tedy nutné na základě Vyhlášky 473/2008 Sb. ve znění pozdějších předpisů zasílat do NRL/ECS pro následnou confirmaci (séroskopiny a genů *stx*) a další analýzu (subtypy Shiga toxinů, WGS).

U pacientů s diagnostikovaným HUS je kvantum bakterií STEC ve stolici velmi malé, pro jejich záchyt je nutné použití specializovaných metod včetně imunomagnetické separace, které mimo NRL nejsou běžně dostupné.

Metoda WGS je výborný nástroj pro detekci začínající, probíhající či dokonce proběhlé epidemie alimentárních infekcí na národní i mezinárodní úrovni. Z hlediska včasné detekce národních epidemií a zastavení jejich šíření, je nutné sekvenovat patogeny průběžně. V případě potvrzení klastru je třeba nastavit spolupráci s epidemiologií a hygienikou tak, aby data z epidemiologického šetření mohla být zpracována co nejdříve, což dává šanci pro odhalení vehikula či zdroje nákazy. Po úspěšném zavedení WGS pro salmonely a STEC plánujeme v NRL/ECS v blízké budoucnosti metodu WGS implementovat i pro yersinie, shigely a jiné střevní patogeny.

Poděkování

Autoři děkují NRL pro herpetické viry, SZÚ a Endokrinologickému ústavu v Praze za možnost využívat přístrojové zařízení pro celogenomovou sekvenaci. Děkujeme také mikrobiologickým laboratorům, klinickým pracovištím a hygienickým stanicím v ČR za zasílání vzorků a za spolupráci při šetření výskytu STEC.

Podpořeno MZ ČR – RVO („Státní zdravotní ústav – SZU, 75010330“).

LITERATURA

- [1] Kaper JB, Nataro J, Mobley HKL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2(2): 123–140.
- [2] Pathogenic *Escherichia coli*. Editor Stefano Morabito. Caister Academic Press, Norfolk UK, 2014. ISBN: 978-1-908230-37-9
- [3] EFSA BIOHAZ Panel, Koutsoumanis K, Allende A, Alvarez-Ordóñez A, et al. Scientific Opinion on the pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. *EFSA Journal* 2020; 18(1): 5967.
- [4] Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, et al. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis*. 2011; 11(9): 671–676.
- [5] Richardson SE, Karmali MA, Becker LE, Smith CR. The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. *Hum Pathol*. 1988; 19(9): 1102–1108.
- [6] Tarr PI, Gordon CA, Chandler, WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 2005; 365(9464): 1073–1086.
- [7] Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol*. 2005; 295(6-7): 405–418.
- [8] Rosales A, Hofer J, Zimmerhackl LB, Jungtraithmayr TC, et al. Need for long-term follow-up in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*-associated hemolytic uremic syndrome due to late-emerging sequelae. *Clin Infect Dis*. 2012; 54(10): 1413–1421.
- [9] Bielaszewska M, Bláhová K, Havlíčková-Marejková M, Malina M, et al. Trombotické mikroangiopatie. V: Dětská nefrologie, 2. přepracované a doplněné vydání, str. 337–353. Editoři T. Seeman a J. Janda. Grada Publishing, a.s., Praha 2021. ISBN 978-80-271-3283-6.
- [10] Marejková M, Petráš P. Enterohemoragické *Escherichia coli* jako původci průjmů v České republice, 1965–2013. *Epidemiol Mikrobiol Immunol*. 2014; 63(3): 173–183.
- [11] Vyhláška č. 473/2008 Sb., o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce.
- [12] Marejková M, Bláhová K, Janda J, Fruth A, et al. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* as causes of hemolytic uremic syndrome in the Czech Republic. *PLoS One* 2013; 8(9): e73927.
- [13] Prováděcí Rozhodnutí Komise (EU) 2018/945 ze dne 22. června 2018 o přenosných nemocích a souvisejících zvláštních zdravotních problémech, které musí být podchyteny epidemiologickým dozorem, a o příslušných definicích případů.
- [14] Karch H, Bielaszewska M. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H-strains: Epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(6): 2043–2049.
- [15] Herold S, Karch H, Schmidt H. Shiga toxin-encoding bacteriophages - genomes in motion. *Int J Med Microbiol*. 2004; 294(2-3): 115–121.
- [16] Bielaszewska M, Mellmann A, Bletz S, Zhang W, et al. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H-: a new virulent clone emerges in Europe. *Clin Infect Dis*. 2013; 56(10): 1373–1381.
- [17] Marejková M, Klimešová P, Papež J, Ciupek R, et al. Atypický hemolyticko-uremický syndrom komplikovaný infekcí enterohemoragickou *Escherichia coli* O157:H7. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2019; 28(6): 222–225.
- [18] ECDC, Surveillance Atlas of Infectious Diseases: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
- [19] Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(9): 2951–2963.
- [20] EnteroBase documentation, Release Jan 24, 2022, <https://readthedocs.org/projects/enterobase/downloads/pdf/latest/>
- [21] Vyhláška č. 474/2002 Sb., kterou se provádí zákon č. 281/2002 Sb., o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona.

Ileninová Z.¹, Klimešová P.¹, Schlosserová K.^{1,2}, Kotiš J.¹, Kseničová J.¹, Daniel O.^{1,2}, Bielaszewska M.^{1,2}, Havlíčková-Marejková M.¹
¹ Oddělení stafylokokových a alimentárních bakteriálních infekcí, Státní zdravotní ústav, Praha
² 2. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha