

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Lucia Karnišová

Patogenetické mechanismy podmiňující vznik a rozvoj hemolyticko-
uremického syndromu u dětí

Pathogenetic mechanisms determining the origin and development
of a hemolytic-uremic syndrome in children

Disertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Květa Bláhová, CSc.

Konzultant: Doc. MUDr. Filip Fencel, PhD.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 04.02.2021

Lucia Karnišová

Podpis

Identifikační záznam:

KARNIŠOVÁ, Lucia, *Patogenetické mechanismy podmiňující vznik a rozvoj hemolyticko-uremického syndromu u dětí [Pathogenetic mechanisms determining the origin and development of a hemolytic-uremic syndrome in children]*. Praha, 2021. 83 stran. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Pediatrická klinika 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol.

Vedoucí závěrečné práce: Doc. MUDr. Květa Bláhová, CSc.

Poděkování

V první řadě chci poděkovat mé školitelce, paní doc. MUDr. Květě Bláhové, CSc., a mému konzultantovi doc. MUDr. Filipu Fenclovi Ph.D. za jejich pomoc a vedení během mého doktorandského studia.

Moje práce by nebyla možná bez dlouhodobé podpory mikrobiologů, kteří mi svou nezištnou pomocí a odborným přístupem v problematice STEC/EHEC pomohli v dokončení mé práce. Děkuji RNDr. Jaroslavovi Nunvářovi Ph.D. z Ústavu mikrobiologie 2.LF UK FNM za intenzivní vedení v bioinformatice, ve zpracování výstupů z celogenomového sekvenování a celkově vedení studie s EHEC O26. Dále Ing. Monice Marejkové, Ph.D. za pomoc při mikrobiologickém testování EHEC a doc. MUDr. Martině Bielaszewske, CSc. mimo jiné za pomoc při provedení testů na Vero-buňkách. Univ.Prof.Dr. med. Alexandrovi Mellmannovi z Institut für Hygiene v Münsteru za zpracování genomů EHEC formou next generation sequencing.

Velké poděkování patří také kolegům z Pediatrické kliniky 2.LF UK a FNM, a to jmenovitě doc. MUDr. Jakubovi Ziegovi, Ph.D. za pomoc při přípravě publikací a doc. MUDr. Ondřeji Hradskému, Ph.D. za statistické zpracování výsledků.

Grantová podpora

Projekty byly financovány Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (GAUK): 194215, Molekulární a epidemiologické faktory vzniku těžkých forem STEC-HUS

ABSTRAKT

Hemolyticko-uremický syndrom (HUS) vyvolaný Shiga-toxin produkujícími *E. coli* (STEC) je jednou z nejčastějších příčin akutního poškození ledvin v dětském věku. Terapie daného onemocnění je symptomatická a hlavní patofyziologické faktory vedoucí k rozvoji těžkého průběhu STEC-HUS jsou stále neznámé. Cílem této disertační práce byla analýza faktorů vedoucích k rozvoji těžkého průběhu STEC-HUS jak na straně hostitele, tak na straně STEC. Retrospektivní analýzou průběhů STEC-HUS u dětí v České republice jsme zjistili, že nejčastějším původcem STEC-HUS byl sérotyp O26 a HUS nejvíce postihoval děti do 3 let, u 63,8 % s nutností dialýzy, smrtnost byla 8,62 %. Na straně hostitele jsme se dále zaměřili na vztah mezi aktivací alternativní cesty komplementu a závažností průběhu HUS. Nalezli jsme signifikantní rozdíl v koncentraci C3 složky komplementu u pacientů, kteří potřebovali dialýzu a u kterých dialýza nebyla nutná. Stanovili jsme mezní hodnotu cut-off pro C3 složku komplementu a její snížení pod 0,825 g/l bylo spojeno s nutností dialyzační léčby a vyšším výskytem extrarenálních komplikací. Na základě nejen našich výsledků lze předpokládat, že by terapeutické ovlivnění komplementu mohlo mít vliv na závažnost onemocnění. Dalším cílem bylo porozumět vlastnostem STEC O26. Hlavní metodou bylo celogenomové sekvenování (WGS) 32 kmenů a genomová analýza celkem 159 kmenů. Analýza nám umožnila sledovat evoluci i geografické šíření nového evropského klonu STEC O26 (nEC), který se rozdělil na dva klony- Early (EnEC) a námi nově identifikovaný Late New Clone (LnEC). U 4 kmenů LnEC byla dosud nepopsaná mutace v A podjednotce Stx2a, která však nebyla více patogenní. Navrhli jsme PCR metodu cílenou na mutaci v *sen/ent* genu charakteristickou pro LnEC, která představuje jednoduchou metodu k rozlišení EnEC a LnEC v klinických mikrobiologických laboratořích. Věříme, že naše výsledky přispěly k poznání patogeneze STEC-HUS, a že se jejich poselství uplatní v klinické péči o děti s tímto onemocněním.

Klíčová slova: Hemolyticko-uremický syndrom (HUS), Shiga toxin-produkující *E. coli* (STEC), STEC-HUS, shiga toxin (Stx), enterohemoragická *E. coli* O26 (EHEC), alternativní cesta komplementu, eculizumab

ABSTRACT

Hemolytic uremic syndrome (HUS) induced by Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) is the most common causes of acute kidney injury in children. The therapy of the disease is symptomatic and the main factors leading to the development of severe course of a STEC-HUS are still unknown. In our study, we dealt with factors leading to development of a severe course of STEC-HUS in pediatric patients on both the host and pathogen side. Using retrospective analysis of the courses in children in the Czech Republic, we found that the most common cause of STEC-HUS was serotype O26 and HUS most often affected children under 3 years of age. 63,8 % required dialysis and mortality was 8.62 %. On the host side we focused on the relationship between the activation of the alternative complement pathway and the severity of the course of HUS. We found a significant difference in the level of the C3 part of complement in patients who required dialysis and patients for whom dialysis was not necessary. We also a cut-off value for the C3 part of complement and its reduction below 0.825 g / l was associated with the need for dialysis treatment and a higher incidence of extrarenal complications. Based not only on our results, it can be assumed that the therapeutic effect of complement could affect the severity of the disease. Further aim of our work was to understand STEC O26. The main method was whole genome sequencing (WGS) of 32 strains and genomic analysis of a total of 159 strains. The analysis allowed us to monitor the evolution and geographical spread of the new European clone STEC O26 (nEC), which was divided into two clones - Early (EnEC) and newly identified Late New Clone (LnEC). In 4 strains LnEC we discover yet undescribed mutation in the A subunit of Stx2a. The PCR method proposed in our study targeting a mutation in the *sen/ent* gene, which is characteristic of Late nEC, represents a fast and simple method for distinguishing Early and Late nEC in clinical microbiological laboratories. We believe that our results have contributed to the understanding of pathogenesis of the STEC-HUS and its message will be applied in the clinical care of children with this disease.

Keywords: *Hemolytic-uremic syndrome (HUS), Shiga toxin-producing E. coli (STEC), STEC-HUS, shiga toxin (Stx),, enterohemorrhagic E.coli O26 (EHEC), alternative complement pathway, eculizumab*

SEZNAM ZKRATEK

aHUS	atypický HUS
APL	akutní poškození ledvin
CKD	chronic kidney disease
CNS	Centrální nervová soustava
D+HUS	Diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome
eGFR	odhadovaná glomerulární filtrace
EHEC	Enterohemoragické <i>Escherichiae coli</i>
EnEC	Early new European clone EHEC O26
HUS	hemolyticko-uremický syndrom
LnEC	Late new European clone EHEC O26
LEE	locus of enterocyte effacement
MAC	membrane attac complex
nEC	New European clone EHEC O26
PCR	polymerázová řetězová reakce
PFGE	pulzní gelová elektroforéza
PLT	Trombocyty
RLPA	reverzní pasivní latexová aglutinace
ROC	receiver operator curve
SNP	single nucleotide polymorphism
STEC	Shiga toxin-produkující <i>Escherichiae coli</i>
STEC-HUS	Shiga toxin-asociovaný HUS
Stx	Shiga toxin
<i>stx</i>	shiga toxin gen
T3SS	type III secretion system
TM	trombomodulin
TMA	trombotická mikroangiopatie
TTP	trombotická trombocytopenická purpura
WGS	whole genome sequencing

OBSAH

1. ÚVOD	10
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
2.1. Trombotické mikroangiopatie (TMA).....	12
2.2. Typický hemolyticko-uremický syndrom, STEC-HUS.....	15
2.2.1. <i>Etiologie a epidemiologie STEC-HUS</i>	15
2.2.1.1. Shiga toxin-produkující E.coli (STEC) a enterohemoragické E.coli (EHEC).....	15
2.2.1.2. STEC O26:H11.....	17
2.2.1.3. Epidemie STEC celosvětově a v ČR.....	18
2.2.1.4. Cesty přenosu infekce STEC.....	19
2.2.2. <i>Patofyziologie STEC-HUS</i>	20
2.2.2.1. Stx jako hlavní faktor virulence STEC.....	21
2.2.2.2. Stx- indukovaná endoteliální dysfunkce.....	22
2.2.2.3. Podocyty a Stx.....	23
2.2.2.4. Komplementová kaskáda a Stx.....	24
2.2.3. <i>Klinický obraz infekce STEC a STEC-HUS</i>	26
2.2.4. <i>Mikrobiologická diagnostika STEC-HUS</i>	28
2.2.5. <i>Terapie STEC-HUS</i>	30
2.2.5.1. Symptomatická terapie.....	30
2.2.5.2. Eculizumab.....	31
3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE A PRACOVNÍ HYPOTÉZY.....	33
4. METODIKA.....	35
4.1. Studie 1: Retrospektivní analýza průběhů STEC-HUS u dětských pacientů v České republice.....	35
4.1.1. <i>Pacienti a design studie</i>	35
4.1.2. <i>Statistická analýza dat</i>	36
4.2. Studie 2: Aktivace komplementu je asociována s těžším průběhem STEC-HUS	36
4.2.1. <i>Pacienti a sběr dat</i>	36
4.2.2. <i>Statistická analýza dat</i>	36
4.3. Studie 3: Charakteristika dvou příbuzných kmenových linií Enterohemoragické <i>Escherichiae coli</i> O26 pomocí WGS	37
4.3.1. <i>Metodika a bakteriální kmeny</i>	37
4.3.1.1. Databázové mínování.....	37
4.3.1.2. Celogenomové sekvenování (WGS).....	37
4.3.1.3. Bioinformatická analýza.....	38
4.3.1.4. Fylogenetická rekonstrukce.....	38
4.3.1.5. In silico analýza molekulárních markrů.....	39
4.3.1.6. Stx-konvertující profág.....	39
4.3.1.7. PCR k odhalení Late new clone.....	39
4.3.1.8. Detekce produkce Stx a cytotoxicita.....	40
5. VÝSLEDKY.....	41
5.1. Studie 1: Retrospektivní analýza průběhů STEC-HUS u dětských pacientů v České republice.....	41
5.1.1. <i>Klinická a biochemická charakteristika kohorty pacientů</i>	41
5.1.2. <i>Etiologie STEC-HUS</i>	44
5.1.3. <i>Porovnání klinických průběhů HUS u úcienců s infekcí O26 a O157</i>	45
5.2. Studie 2: Aktivace komplementu je asociována s těžším průběhem	

STEC-HUS.....	47
5.2.1. <i>Klinická charakteristika souboru pacientů</i>	47
5.2.2. <i>Laboratorní nálezy a koncentrace C3 složky komplementu</i>	48
5.2.3. <i>Porovnání pacientů s vyšší a nižší koncentrací C3</i>	51
5.3. Studie 3: Charakteristika dvou příbuzných kmenových linií	
Enterohemoragické <i>Escherichiae coli</i> O26 pomocí WGS.....	54
5.3.1. <i>Struktura populace EHEC O26 založená na WGS</i>	54
5.3.2. <i>Evoluce, diverzifikace a rozšíření nEC</i>	56
5.3.3. <i>nEC kmeny nesou odlišné stx2a-konvertující profágy</i>	58
5.3.4. <i>Produkce Stx a cytotoxicita nEC</i>	59
6. DISKUSE	61
7. ZÁVĚR	66
8. SOUHRN.....	68
9. SEZNAM LITERATURY.....	73
10. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA.....	83

1. ÚVOD

Hlavní příčinou vzniku hemolyticko-uremického syndromu (HUS), zejména u malých dětí, je infekce Shiga-toxin produkujícími *Escherichia coli* (STEC). Jedná se o klasickou formu, tzv. typický HUS, nebo v novější literatuře spíše užíván termín STEC-HUS s charakteristickým infekčním průjmovitým předchorem.

Hlavním patofyziologickým mechanismem STEC-HUS je Shiga toxiny (Stx) mediované poškození glomerulárního endotelu a vznik mikroangiopatické trombózy. Stx způsobuje inhibici proteosyntézy a apoptózu Stx senzitivních buněk. Simultánně dochází k aktivaci silné prozánětlivé odpovědi s následným uvolněním cytokinů a chemokinů, atrakci leukocytů, tvorbě trombů a k aktivaci komplementu.

STEC-HUS je nejčastější příčinou akutního poškození ledvin v batolecím a předškolním věku. Spontánní remise onemocnění nastane většinou za 1-3 týdny, avšak u více než 20 % dětí přetrvává po překonání akutní fáze onemocnění různě závažná reziduální symptomatologie a mortalita v akutní fázi je 1-5 % (Tarr et al. 2005).

I přes rozsáhlé epidemiologické studie, pokroky v diagnostice či léčbě, která je prozatím pouze symptomatická, je terapeutický úspěch závislý především na včasné identifikaci rizikových faktorů na počátku onemocnění. Hlavní faktory vedoucí k rozvoji těžkého průběhu STEC-HUS u dětí jsou stále neznámé. Mohou být jak na straně hostitele, tak na straně patogena.

V rámci této disertační práce jsem se v první části věnovala retrospektivní studii případů STEC-HUS u dětských pacientů hospitalizovaných ve třech dialyzačních centrech v České republice, a taky porovnáním klinických průběhů u jednotlivých séro skupin STEC.

V druhé části jsem se zabývala faktory na straně hostitele vedoucími k rozvoji těžkého průběhu onemocnění u dětských pacientů se STEC-HUS, a to aktivaci alternativní cesty komplementu, jelikož je v posledních letech diskutována účinnost léčby anti-c5-monoklonální protilátkou eculizumab u pacientů se závažným průběhem s CNS symptomatologií (Lapeyraque 2011; Noris et al. 2012; Arvidsson et al. 2015).

Ve třetí části jsme se na straně patogena zaměřili na hledání nových faktorů virulence u *E. coli* O26:H11/H, která je nejčastější příčinou vzniku typického HUS v České republice. Detailnější charakteristika patogenů pomocí nových molekulárně biologických

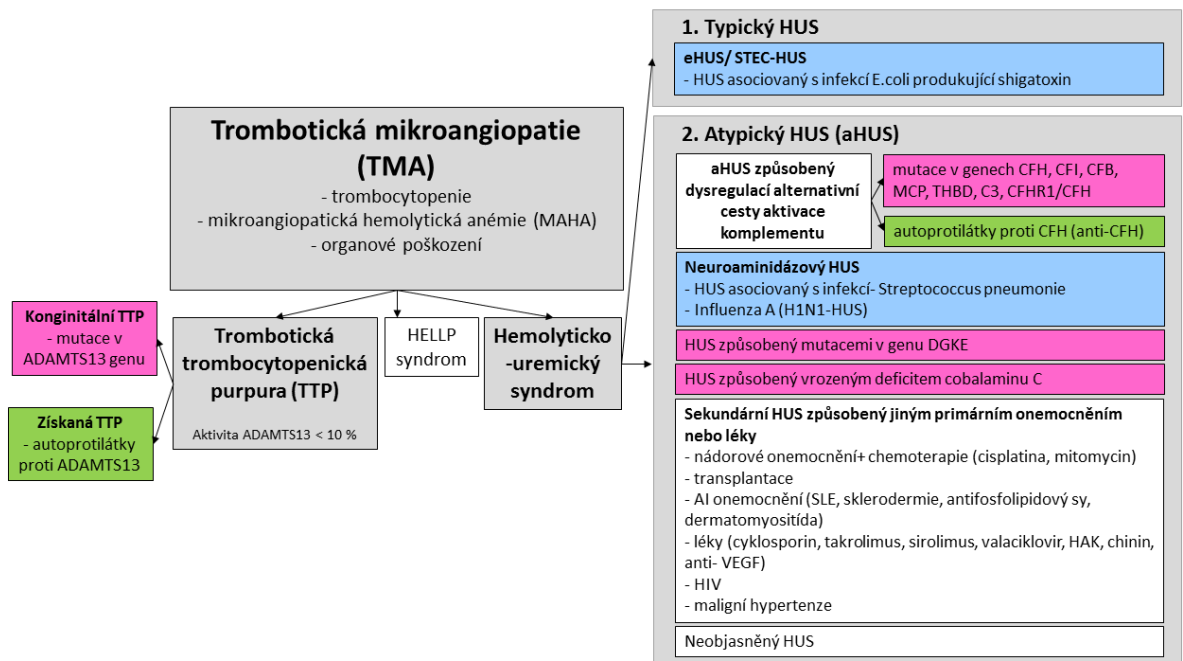
metod by tak mohla přispět k určení rizika progresu do závažnějších forem infekce a rychlejší diagnostiku patogenějších kmenů.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Trombotické mikroangiopatie

Hemolyticko-uremický syndrom (HUS) patří do heterogenní skupiny onemocnění označujících se společným názvem trombotické mikroangiopatie (TMA), pro které je charakteristický vznik trombů v mikrovaskulárním řečišti s následnou trombocytopenií, mikroangiopatickou hemolytickou anémií a postižením orgánů z důvodu ischemizace (Ruggenti et al. 2001).

Primárním patogenetickým mechanismem TMA je endoteliální dysfunkce, která vzniká z různých příčin, a proto jednotlivé choroby mají odlišnou léčbu a prognózu. TMA se podle etiopatogeneze dělí do tří hlavních skupin na typický HUS (STEC-HUS), atypický HUS (aHUS) a trombotickou trombocytopenickou purpuru (TTP) (obrázek 1).



Obrázek 1 Dělení trombotických mikroangiopatií (TMA) podle etiopatogeneze (modifikováno podle Loirat et al. 2016)

Příčinou vzniku trombotické trombocytopenické purpury (TTP) je nedostatečná aktivita proteázy ADAMTS13, která je zodpovědná za štěpení ultra velkých multimerů

von Willebrandova faktoru (uLVWM) (Noris et al. 2012). To vede k systémové agregaci destiček a ischemizaci CNS a dalších orgánů.

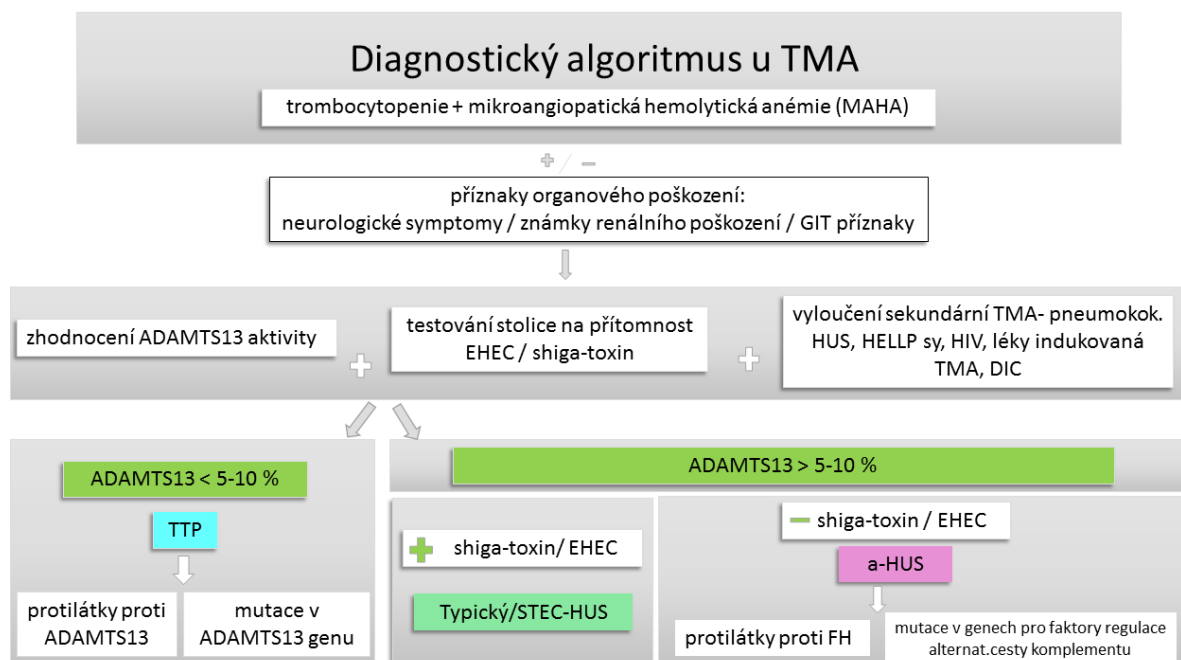
V případě HUS je predominantně postiženo renální cévní řečiště, což vyúsťuje v akutní poškození ledvin (APL). Nejčastější formu HUS představuje typický HUS (90 % ze všech případů), pro který je charakteristické infekční průjemové předchorobí a je způsoben infekcí Shiga-toxin produkujícími kmeny *E.coli* (STEC, STEC-HUS). Ve zbylých 10 %, vzniká tzv. atypický HUS (aHUS), nejčastěji z důvodu genetické nebo získané funkční poruchy alternativní cesty komplementu, nebo může být způsoben infekcí *Streptococcus pneumoniae* (neuraminidázou indukovaný HUS) (Noris et al. 2012).

Klinický průběh HUS a TTP může být na začátku onemocnění stejný, proto pokud se u pacienta projeví známky TMA (mikroangiopatická hemolytická anemie a trombocytopenie), je nutné co nejrychleji objasnit příčinu daného onemocnění a následně zahájit cílenou léčbu, která se u jednotlivých forem TMA liší. K rychlé diferenciální diagnostice nám může pomoci jak laboratorní vyšetření, tak i základní klinické charakteristiky různých forem TMA (tabulka 1, obrázek 2).

Tabulka 1 Diferenciální diagnostika a charakteristika hlavních forem TMA (upraveno podle Loirat et al., 2016)

	Typický HUS	aHUS	Neuraminidázový HUS	Kongenitální TTP	Získaná TTP
Věk (roky)	< 0,5: 5 % 0,5-3: 65 % > 3: 30 %	do 0,5: 28 % 0,5-2: 28 % 2-15: 44 %	< 2	Perinatální období 50-75 %	< 2: 15 % 2-9 > 20 % 9-16: 60 %
Průjem (%)	95 % Krvavý > 60 %	39 %	ne	možný	možný
Náhlý a závažný začátek (%)	ne	možný	Pneumonie: 70 % Meningitida: 30 %	možný	možný
Hematologická zvláštnost (%)	PLT > 30x10 ^{exp9} /L často leukocytóza	PLT > 30x10 ^{exp9} /L	Coombs + leukocytóza	PLT < 30x10 ^{exp9} /L	PLT < 30x10 ^{exp9} /L
AKI (%)	95 % Dialýza 50 %	85 % Dialýza 60 %	100 % Dialýza 40 – 80 %	zřídka	zřídka
Neurologické komplikace (%)	20 %	16 %	30 % (meningitida)	35 %	70 %
KV komplikace (%)	2-5 %	2 %	možné	možné	možné
Terapie první volby	symptomatická	Eculizumab, PE	ATB, FP, speciálně upravené ERY	FP	PE, KS, Rituximab
Pozitivní RA	ano	27 % AD /AR	ne	AR	ne
Mortalita (%)	5 %	20-30 % před érou eculizumabu	10 %	15 %	10 %

PLT, trombocyty; KV, kardiiovaskulární; AKI, akutní poškození ledvin; RA, rodinná anamnéza; PE, plasamfereza; AD, autosomálně dominantní; AR, autosomálně recesivní; ATB, antibiotická terapie; FP, čerstvá mražená plazma; KS, kortikosteroidy



Obrázek 2 Diagnostický algoritmus u pacientů se známkami TMA (modifikováno podle <https://ahussource.com/Physician/Diagnosis>)

Vzhledem k výsledkům recentních studií se zdá, že ve všech případech TMA dochází k hyperaktivaci komplementu (Noris et al. 2012). U STEC-HUS je spouštěčem komplementové kaskády Stx, který mimo jiné zvyšuje regulaci P-selektinu a interferuje s aktivitou komplementových regulačních molekul. U aHUS jsou to mutace v genech kódujících regulační faktory komplementu, které predisponují k hyperaktivaci alternativní cesty komplementu. U TTP vede deficit ADAMTS13 k tvorbě masivních destičkových trombů, které mohou způsobit aktivaci komplementu. Proto léčba monoklonální protilátkou proti C5 složce komplementu eculizumab může být efektivní nejen v pacientů s aHUS, ale za určitých podmínek i u jedinců se STEC-HUS či TTP (Lapeyraque 2011; Scully and Goodship 2014; Wurzner et al. 2014; Mannucci and Cugno 2015; Picard et al., 2015).

V této práci se budu věnovat jen STEC- HUS, jelikož je to nejčastější forma TMA u dětí.

2.2. Typický hemolyticko-uremický syndrom, STEC-HUS

HUS vyvolaný Shiga-toxin produkujícími *E. coli* (STEC) je jednou z nejčastějších příčin akutního poškození ledvin (APL) v batolecím a předškolním věku.

Jedná se o klasickou formu, tzv. typický HUS, Diarrhea-associated D+HUS, nebo v novější literatuře spíše užíván termín STEC-HUS s charakteristickým infekčním průjmovitým předchorobím. Vyvíjí se jako systémová komplikace průjmu v důsledku toxémie po absorpci Shiga toxinu (Stx) ze střeva do krevního oběhu. Vzniká na podkladě Stx-indukované trombotické mikroangiopatie s následným rozvojem hemolytické anémie, trombocytopenie a mikrovaskulární trombózy vedoucí k ischemickému poškození orgánů, zejména ledvin, mozku a jiných parenchymových orgánů (Tarr et al. 2005; Gerber et al. 2002).

2.2.1. Etiologie a epidemiologie STEC-HUS

Výskyt onemocnění je vyšší v teplých měsících s maximem od června do září (Tarr et al. 2005). Incidence onemocnění se uvádí 2 případy na 100000/rok, s maximem incidence u dětí do 5 let (6,1/100 000/rok) (Mele et al. 2014). Celkový výskyt HUS s laboratorně potvrzenou infekcí STEC se v České republice pohybuje od roku 2012 kolem 4–5 případů ročně (Marejková et al. 2013; Marejková et al. 2014).

2.2.1.1 Shiga toxin- produkující *E. coli* (STEC) a enterohemoragické *E. coli* (EHEC)

Shiga toxin-produkující *Escherichia coli* (STEC) jsou jedním ze závažných patogenů způsobující gastrointestinální onemocnění a jsou také považovány za nejčastější původce HUS u dětí. Pro STEC je charakteristická schopnost produkce cytotoxinů Stx, které inhibují proteosyntézu eukaryotických buněk. Avšak ne všechny kmeny STEC jsou patogenní pro člověka. STEC vyvolávající onemocnění u lidí se též označují jako enterohemoragické *E. coli* (EHEC) na základě jejího prvního záchytu u pacientů s hemoragickou kolitidou, a dané označení bývá zejména použito v mikrobiologických studiích.

První souvislost mezi *E. coli* produkující Stx a rozvojem HUS popsali v Kanadě v roce 1983 Karmali a spol., kdy ve vzorcích stolice osmi dětí s HUS vykultivovali kmeny *E. coli* produkující toxin, který způsoboval ireverzibilní poškození buněčné linie Vero (proto dřívější označení toxinu jako Verotoxin, VT) (Karmali et al. 1983). Bezprostředně poté Riley a spol. publikovali výsledky studie dvou epidemií, které byly spojeny s konzumací hamburgerů z nedostatečně tepelně upraveného hovězího masa. U většiny pacientů se rozvinula závažná hemoragická kolitida a ve stolicích a vzorku masa byl kultivačně prokázán do té doby neobvyklý sérotyp *E. coli* O157:H7 (Riley 1987; Riley and Remis 1983). Souvislost mezi toxigenitou *E. coli* O157:H7 a *Shigella dysenteriae* typu 1 byla popsána O'Brienem se spolupracovníky. Vzhledem ke skutečnosti, že aktivita Verotoxinu byla neutralizována protilátkami proti Shiga toxinu *S. dysenteriae*, byly hlavní faktory virulence STEC později přejmenovány z Verotoxinů na Shiga toxiny (Stx), které se užívají jako synonyma (O'Brien et al. 1982).

Hlavním faktorem virulence je tedy Stx složený z enzymaticky aktivní podjednotky A a z 5 vazebných podjednotek B. Podle současné nomenklatury existují dva hlavní typy toxinů, Stx1a a Stx2a (Scheutz et al. 2012). Stx1a je většinou přítomen u kmenů STEC izolovaných od pacientů s nekomplikovaným průjmem a je téměř identický se Shiga toxinem *S. dysenteriae* typu 1. Stx2a je obecně virulentnější, vykazuje vyšší cytotoxicitu vůči endoteliím, a proto bývá významně častěji identifikován u STEC izolovaných od pacientů s HUS (Tarr et al. 2005; Bielaszewska et al. 2013). Přítomnost *stx2a* a/nebo produkce samotného Stx2a je prediktorem závažného průběhu onemocnění a progresu STEC infekce v HUS (Bielaszewska et al. 2013).

V současné době je známo přes 400 sérotypů STEC, z nichž více než 100 bylo popsáno ve spojitosti s lidským onemocněním a lze je tedy klasifikovat jako EHEC. Celosvětově nejvíce rozšířeným sérotypem STEC je O157:H7, který byl po dlouhou dobu považován za jediný sérotyp způsobující typickou formu HUS (Fakhouri et al. 2017). Během doby však byly v souvislosti s rozvojem HUS izolovány i další sérotypy STEC, tzv. non-O157:H7 STEC, z nichž nejčastější jsou O103:H2, O111:H8, O145:H28/25 a O26:H11 (Bielaszewska et al. 2013; Mellman et al. 2008; Luna-Gierke et al. 2014).

2.2.1.2. STEC O26:H11

V poslední době se v Evropě zvyšuje proporce izolace STEC O26 u pacientů se STEC infekcí. V některých státech je dokonce častější příčinou HUS než dosud uváděná O157 a je nejčastěji zastoupeným sérotypem STEC vyvolávající HUS v České republice (Marejková et al. 2013). STEC O26 způsobuje stejně závažnou formu HUS jako STEC O157 a dlouhodobé následky po prodělání akutní fáze onemocnění se u obou kmenů signifikantně neliší (Byrne et al. 2015; Marejková et al. 2013; Karch et al. 2005; Tozzi et al. 2003).

Většina O26 kmenů izolovaných od pacientů nese geny kódující Stx dvou hlavních typů, a to Stx1a a/nebo Stx2a. Ačkoliv část kmenů obsahuje geny kódující i jiné subtypy Stx, jako například Stx2d, Stx2b, Stx2f. STEC O26:H11 nesoucí *stx2a* patří do dvou hlavních sekvenčních typů (STs) ST21 a ST29, kdežto kmene nesoucí *stx1a* samotné/ anebo spolu s *stx2a* patří do ST21 (Bielaszewska et al. 2013; Ishijima et al. 2017). Kmene ST29 jsou heterogenní a jsou tvořeny několika klonálními liniemi, které se od sebe liší jinými *stx2* alelami a plasmidovým genovým profilem (Bielaszewska et al. 2013; Delannoy et al. 2017).

Nový vysoce virulentní ST29 klon nesoucí jen *stx2a* byl poprvé zachycen v Německu v devadesátých letech minulého století a od té doby se rapidně rozšířil do celé Evropy. Daný klon byl pojmenován jako “nový německý klon” anebo “nový evropský klon” (nEC). Vyznačuje se přítomností určitého plasmidového virulentního profilu, který je charakterizován přítomností EHEC-*hlyA* (kódující EHEC hemolysin) a *etpD* (kódující efektor II typu) a absencí genů pro *katP* (kódující kataláza-peroxidázu) a *espP* (kódující serinovou proteázu EspP) (Bielaszewska et al. 2013). V roce 2015 byl také popsán “nový francouzský klon” O26, který patří do jiné klonální linie ST29, nese *stx2a* a/nebo *stx2d* a postrádá plasmidový virulenční profil (EHEC –*hlyA*, *katP*, *espP*, *etpD*) (Delannoy et al. 2017; Delannoy et al. 2015). Recentně se v Japonsku rozšířil další klon ST29, který nese jen *stx2a* gen a liší se od evropského a francouzského klonu jiným plasmidovým profilem (EHEC –*hlyA*+, *katP*-, *espP*+, *etpD*-). Tento japonský klon (ST29C1) je fylogeneticky nepříbuzný k novému evropskému (ST29C2) a francouzskému klonu (ST29C3) (Ishijima et al. 2017).

2.2.1.3. Epidemie STEC celosvětově a u nás

Většina infekcí vyvolaných STEC se vyskytuje jako sporadické případy. Byly ovšem popsány i epidemie průjmového onemocnění a HUS (tabulka 2) (Besser et al. 1993; Bell et al. 1994; Kemper 2012). Poslední a dosud největší epidemie STEC, co do počtu případů HUS, propukla v roce 2011 v Německu a postihla i další státy Evropy a USA. Původcem byla enteroagregativní *E. coli* O104:H4 s produkcí Stx2a (Bielaszewska et al. 2011) a zdrojem infekce byly epidemiologicky potvrzeny kontaminované klíčky pískavice. Infikováno bylo 3816 osob, z nichž u 845 (22 %) se rozvinul HUS a 54 pacientů zemřelo (1,4 %). Od jiných epidemií se tato lišila vysokou frekvencí progresu střevní infekce do HUS (u 22 % případů), častým výskytem neurologických komplikací, vysokou mortalitou a vyšší frekvencí onemocnění u dospělých (88 % infikovaných byli dospělí, v 68 % to byly ženy) (Frank et al. 2011). V České republice byl zaregistrován jeden případ onemocnění americké turistky, která se nakazila v severním Německu (Marejková et al. 2014).

Tabulka 2 Největší epidemie STEC-HUS celosvětově

Země	STEC sérotyp	Počet případů	Počet hospitalizací	Počet případů HUS	Počet úmrtí	Vehikulum přenosu
USA (Washington, Idaho, Nevada, Kalifornie, 12/1992-1/1993)	O157:H7	732	195	55	4	Hamburgery
Velká Británie (Lothian, Skotsko, 5/1994)	O157:H7	Nad 100	173	9	1	Nepasterizované kravské mléko
Austrálie (Adelaide, 1-2/1995)	O111:H-	Nad 200	Nezjištěno	22	0	Fermentované párky
Japonsko (Sakai City, 7/1996)	O157:H7	8576	606	106	3	Výhonky bílé ředkve
Německo (Sasko, 5/2011)	O104:H4	3862		855	53	Pískavice

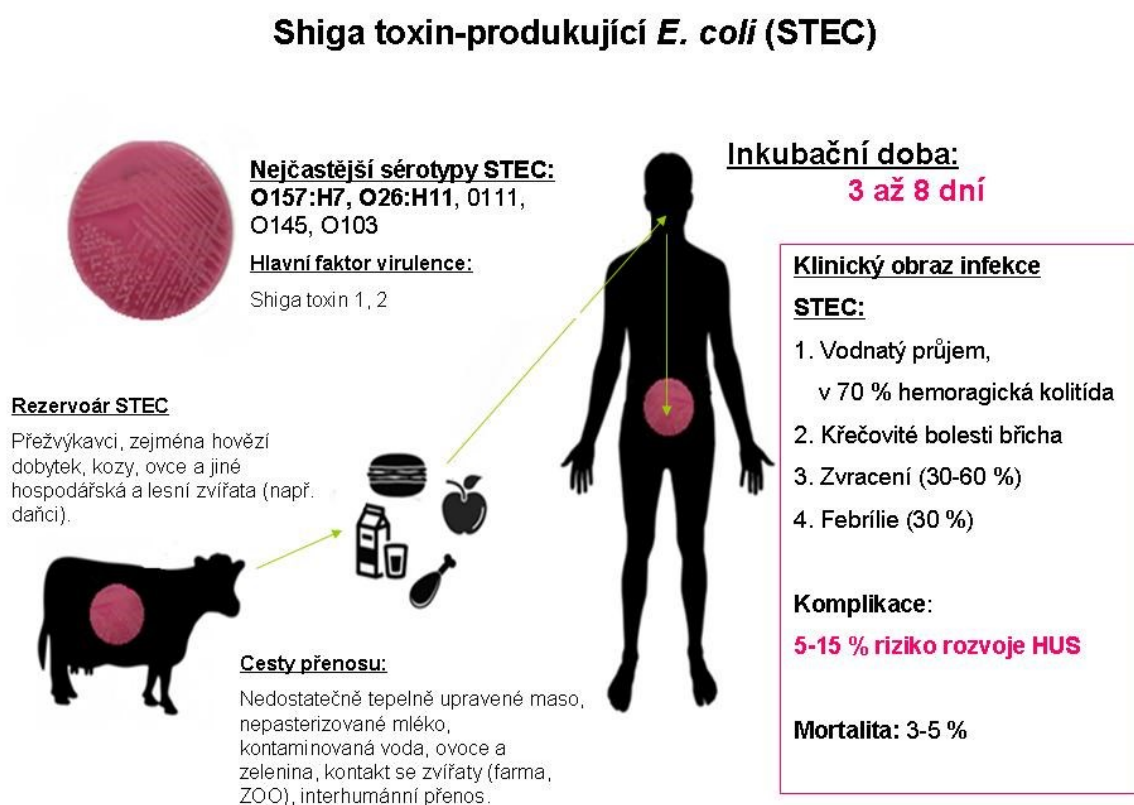
První menší epidemie onemocnění *E. coli* O157:H7 v České republice byla zaznamenána v České Lípě roce 1988 (5 dětí s HUS, věk 4–20 měsíců, 1 úmrtí) (Bielaszewska et al. 1989; Srámková et al. 1990). Další hromadný výskyt HUS byl evidován v létě 1995 v okresech Teplice a Ústí nad Labem (4 případy HUS u dětí ve věku od 10 měsíců do 3 let), kdy byla izolována STEC O157:H7 a jako vehikulum infekce se

prokázalo nepasterizované kozí mléko (Bielaszewska et al. 1996; Bielazewska et al. 1997).

Celkový výskyt HUS s laboratorně potvrzenou infekcí STEC se v České republice pohybuje od roku 2012 kolem 4–5 případů ročně, s maximem do 10. Na rozdíl od zahraniční literatury, kde je popisován výskyt krve ve stolici u 90 % pacientů s typickým HUS (Tarr et al. 2005), se krev ve stolici vyskytuje v České republice pouze u 60 % pacientů s HUS. U infekcí STEC bez progresu do HUS je procento krvavých průjmů v ČR nižší, kolem 40 % (Marejková et al. 2014).

2.2.1.4. Cesty přenosu infekce STEC

Nejdůležitějším rezervoárem STEC je zažívací trakt přežvýkavců, nejčastěji hovězí dobytek, ale i kozy, ovce, jeleni a jiná hospodářská a lesní zvířata (Karch et al. 2005; Pennington 2010), která jsou asymptomatická a vylučují bakterie stolicí (obrázek 3).



Obrázek 3 Charakteristika infekce STEC- etiologie, možnosti přenosu infekce a klinický obraz infekce u člověka (modifikováno podle <https://about-hus.com/>)

Tepelnou úpravou stravy (teplota > 70 °C) lze STEC eradikovat, proto k přenosu infekce může dojít zejména konzumací kontaminovaných a nedostatečně tepelně upravených živočišných produktů (hamburgery, nepasterizované mléko a mléčné výrobky). K nákaze může dále dojít požitím kontaminované vody, kontaminované syrové zeleniny a ovoce (hlávkový salát, špenát, výhonky pískavice, jahody, nepasterizovaný jablečný džus). Vzhledem k nízké infekční dávce je vzácně možný i fekálně-orální přenos z člověka na člověka (zejména v zařízeních s nízkými hygienickými standardy) a ze zvířete na člověka (nejčastěji návštěva farmy, ZOO).

Doba vylučování STEC u lidí se u nekomplikovaného onemocnění uvádí v průměru 13 dnů, u případů s HUS až 21 dnů (Pennington 2010). V ČR byla popsána doba nosičství až více než 20 dnů při nekomplikovaném průjemovém onemocnění vyvolaném STEC O157 a výskyt onemocnění je vyšší v teplých měsících s maximem od června do září (Marejková et al. 2013).

2.2.2. Patofyziologie STEC-HUS

Dosud nejsou plně objasněny příčiny rozdílného klinického průběhu daného onemocnění, zejména faktory vedoucí k rozvoji HUS jen u malého procenta pacientů infikovaných STEC.

Stx- produkující *E. coli* jsou vysoce infekční mikroorganismy, k nákaze je dostačující malá infekční dávka, a to jen 10 bakterií (Schmid-Hempel and Frank 2007). Cesta nákazy STEC je nejčastěji ingescí kontaminovaného jídla nebo vody. STEC jsou vysoce virulentní také díky tomu, že přežívají v kyselém prostředí žaludku (Richard and Foster 2003).

Po požití kontaminované potravy dochází ke kolonizaci střeva bakteriemi (ileum, kolon) prostřednictvím specializovaných fimbriálních a nefimbriálních adhezínů, např. intimin kodovaný *eae* genomem na ostrůvku patogenity tzv. Locus of enterocyte effacement (LEE). Kromě intiminu LEE kóduje další efektorové molekuly, a to type III secretion system (T3SS), který translokuje bakteriální efektorové proteiny (např. EspFu) dovnitř hostitelské buňky a translokační receptor Tir. LEE je tak odpovědný za tvorbu tzv. attaching and effacing lézí (A/E, přilnutí/smazání), dochází k akumulaci aktinu uvnitř buňky a adhezenci bakterií na enterocytech, poškození střevní sliznice a ztrátě mikrokloků

enterocytů s rozvojem průjmu až hemoragické kolitidy (edém, hyperémie a hemoragie, exsudace fibrinu, nekróza sliznice, tvorba pseudomembrán) (Frankel and Phillips 2008). Jakmile dojde k přilnutí bakterií na sliznici, STEC začnou produkovat Stx, který je hlavním faktorem virulence.

2.2.2.1. Stx jako hlavní faktor virulence STEC

Stx patří do rodiny proteinů inaktivujících ribosomy (ribosome-inactivating proteins, RIP). Je složený z enzymaticky aktivní podjednotky A o velikosti 32-kDa, která je zodpovědná za zastavení ribosomální aktivity a z 5 vazebných podjednotek B, každá 7,7-kDa, které se vážou na specifický receptor Gb3Cer (Rutjes et al. 2002). STEC je schopna produkovat dva hlavní typy Stx, a to Stx1 a Stx2 s různými subtypy (Stx1a, Stx1c, Stx1d, Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2e, Stx2f a Stx2g) (Melton-Celsa 2014; Scheutz et al. 2012).

V případě, že dojde ve střevě k dostatečnému uvolnění Stx, Stx se ze střeva vstřebává dosud neobjasněným mechanismem do krevní cirkulace, aktivuje endoteliální buňky a vede k aktivaci prozánětlivých a prokoagulačních signalizačních cest (Obrig 2012). Přenos Stx v krvi zajišťují mikrovezikuly a krevní buňky, které exprimují specifický Stx receptor na svém povrchu (Gb3)- erytrocyty, trombocyty a monocyty (Obrig 2012). Neutrofily neexprimují Gb3 receptor ale interagují s Stx přes Toll-like receptor 4 (TLR4) (Brigotti et al. 2011). Mikrovezikuly uvolňované Stx-napadenými krevními buňkami mohou pak přenášet Stx a mohou být internalizovány buňkami bez Gb3 receptoru (Villysson et al. 2017). Stx se následně váže svojí B-podjednotkou na specifické Gb3Cer receptory (globotriaosylceramidový receptor, CD77). Gb3Cer se nachází především v lipidové vrstvě endoteliálních buněk (nejvíce v ledvinách, střevě a CNS), tubulárních, mezangiálních buňkách a podocytech a zprostředkovává transmembránní signální dráhy (Obrig 2012). Rozmístění receptorů v organismu pak vysvětluje lokalizaci možných mikrovaskulárních lézí, vznik proteinurie, dehydratace a selhání ledvin následkem působení Stx (Rutjes et al. 2002).

Afinita vazby Stx2 je 10krát vyšší než vazba Stx1. Stx2 se váže a vyvazuje z receptoru pomaleji, a tím zůstává na povrchu buněk dostatečně dlouho na to, aby se internalizoval, což vysvětluje jeho 1000krát větší toxicitu než Stx1 na lidských endotelových buňkách in vitro. Stx2a je obecně virulentnější, vykazuje vyšší cytotoxicitu vůči endoteliím, a proto bývá významně častěji identifikován u STEC izolovaných od pacientů s HUS (Bielaszewska et al. 2013; Tarr et al. 2005; Scotland et al. 1987).

Již 30 minut po navázání toxinu na Gb3Cer receptor dochází k endocytóze Stx pomocí clarithrin-dependentního mechanismu a jeho přenosu k endoplazmatickému retikulu přes Golgiho aparát (Sandvig, K., Garred, O, van Deurs 1992). Zde je pomocí proteázy furinu štěpena A-podjednotka toxinu. Nově vzniklý 27-kDa A1 fragment je následně translokován do cytosolu, kde spouští zánik napadené buňky. rRNA-N-glykosidázově aktivní A1 fragment permanentně inaktivuje ribosomy odstraněním 28S adeninu podjednotky 60S ribosomální RNA, a tím inhibuje proteosyntézu a aktivuje ribosomální stresovou odpověď (Endo et al. 1988). Stx také přímo napadá jadernou DNA, aktivuje uvolnění kaspázy 3,6,8, a 9 a spouští apoptózu buňky. Kromě toho také dochází k aktivaci celé řady prozánětlivých a protrombotických faktorů (Obrig 2010).

Mezi další toxiny, které se spolupodílí na vzniku onemocnění a především na rozvoji HUS, patří EHEC hemolysin (EHEC-Hly), cytoletální distendující toxin (CdtV), cytotoxin subtiláza (SubAB) a Serine proteáza (EspP), která inaktivuje komplementovou kaskádu na úrovni C3 a C5, čímž umožňuje bakteriím přežít v hostitelském organizmu (Orth and Würzner 2010; Orth et al. 2010).

Na adherenci a kolonizaci střeva STEC se účastní i Stx tím, že zvyšuje expresi proteinu nucleolinu, na který se váže intimin bakterií (Robinson et al. 2006). Kromě Stx, může do cirkulace proniknout i lipopolysacharid (LSP) STEC, který se váže na destičky, způsobuje zvýšení exprese renálních Stx receptorů a spolupodílí se tím na patogenezi renálního poškození (Clayton et al. 2005).

2.2.2.2. Stx-indukovaná endoteliální dysfunkce

Primární patofyziologickou příčinou vzniku trombotické mikroangiopatie u STEC-HUS je glomerulární endoteliální poškození způsobené Stx. Ten indukuje hluboké poškození endoteliálních buněk a spouští kaskádu signálních drah vyústujících ve ztrátu endoteliálních non-adhezivních, anti-inflamatorních a tromborezistentních vlastností.

V patogenezi hrají významnou roli také monocyty a neutrofilové, které umocňují mikrovaskulární poškození v tkáních produkcí alfa-1-antitrypsin-komplexové elastázy.

Stx přes aktivaci transkripčního jaderného faktoru NF-kappaB zvyšuje adhezi leukocytů na endoteliální buňky, a to upregulací vasoaktivního peptidu endotelin-1 (ET-1), endotelovové adhezivní molekuly E- selektinu, intracelulární adhezivní molekuly 1 (ICAM-1) a vaskulární buněčné molekuly VCAM-1. Stx též přímo zvyšuje sekreci

chemokinů, které jsou zodpovědné za migraci a adhezi leukocytů k endoteliím (MCP-1, IL-8, fractalkine (FKN)) (Zoja et al. 2002). Leukocytóza na začátku onemocnění koreluje se závažností HUS a je negativním prognostickým faktorem (Oakes 2006).

Cévní poškození působené Stx spouští uvolnění trombinu a zvýšení koncentrace fibrinogenu. Zvyšuje se lokální koncentrace zánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6, IL-8), tumor nekrotizujícího faktoru (TNF-alfa), rovněž se zvyšuje uvolňování protrombotických faktorů, jako např. inhibitoru aktivátoru plazminogenu (PAI-1), trombomodulinu (TM) a jiných. TM následně zvyšuje expresi P-selektinu, který interaguje s Von Willebrandovým faktorem (VWF) a podporuje tvorbu trombů.

Stx též přímo působí na VWF a způsobuje jeho opožděné rozštěpení plasmatickou metaloproteázou ADAMTS13 na aktivovaných endoteliálních buňkách. Tím indukuje adhezi destiček na endoteliích. Blokáda adhezivních proteinů (např. P-selektin) snižuje tvorbu destičkových trombů na endoteliích (Lo et al. 2013; Noris and Remuzzi 2001).

Histopatologicky tvoří trombotickou mikroangiopatii zesílení kapilární stěny, otok, odloučení endotelií od bazální membrány a tromby uzavírající orgánové mikrovaskulární řečiště, zejména ledvin (Gasser et al. 1955; Noris and Remuzzi 2001).

2.2.2.3. Podocyty a Stx

Charakteristickým histopatologickým nálezem u pacientů s HUS jsou kromě trombotické mikroangiopatie, také léze s kolapsem a retrakcí glomerulů a otokem podocytů se zánikem pedicel (Koster et al. 1984). Podocyty, které jsou blízko endoteliálních buněk a tvoří s nimi glomerulární filtrační bariéru, jsou náchylné na cytotoxický efekt Stx. Po navázání se Stx na Gb3 receptor podocyty uvolňují cytokiny (IL-1 a TNF-alfa), které zvyšují expresi samotného Gb3 receptoru na cílových buňkách, a tím ovlivňují jejich senzitivitu k danému toxinu a apoptóze (Dettmar et al. 2014).

V glomerulu dochází během zánětlivé odpovědi také k excesivní aktivaci komplementu a depozici C3. Vzniká C3a, která se váže na C3a receptory, uvolňuje se TM a zvyšuje se exprese P-selektinu na endoteliálních buňkách, čímž se dále zvyšuje aktivace komplementu.

Průkaz přítomnosti mRNA dvou specifických proteinů pro podocyty, nefrinu a synaptopodinu v moči pacientů se STEC-HUS poukazuje na poškození podocytů u pacientů s HUS (De Petris et al. 2006).

2.2.2.4. Komplementová kaskáda a Stx

Komplementový systém představuje komplex asi 30 sérových a membránových proteinů, které spolu tvoří část nespecifické složky imunitního systému. Úlohou komplementu je eliminace patogenů a poškozených buněk. Aktivuje se třemi cestami, a to klasickou, alternativní a lektinovou (Walport 2001; Ricklin and Lambris 2007).

Alternativní cesta je neustále aktivní díky spontánní hydrolyze cirkulující molekuly C3, čímž dochází ke změně konformace molekuly C3 umožňující její interakci s faktorem D. Daná interakce vede k rozštěpení faktoru B (CFB) na Ba a Bb za vzniku C3 konvertázy (C3Bb), která se váže na povrch buněk a umožňuje vznik C3 amplifikační smyčky, kde C3 konvertáza je schopna štěpení C3 na C3a (anafylatoxin) a C3b. Depozita C3b následně určují, zda bude povrch buňky zničen, či nikoliv. Pokud iniciální depozita C3B nejsou ihned inaktivována, pokračuje komplementová kaskáda a C3b dále participuje na formaci C5 konvertázy a následné tvorbě MAC (membrane attack complex) (Noris et al. 2012). C3b se váže na C3 konvertázu za vzniku C5 konvertázy (C3BbC3b), která následně štěpí cirkulující C5 na C5a (anafylatoxin) a C5b. C5b váže C6, C7, C8 a C9 formující terminální produkt komplementové kaskády označovaný jako MAC. MAC vytváří póry na buněčných membránách vedoucích k lýze buňky z důvodu přesunu tekutin a elektrolytů do buňky (Walport 2001).

Aby nedocházelo k hyperaktivaci této cesty a byla tak zajištěna ochrana hostitelských buněk, existuje několik ochranných sérových a membránových regulačních proteinů. Fragment C3b je štěpen faktorem I (CFI) za pomoci membránového proteinu MCP (membrane cofactor protein, CD46), komplementového proteinu CD35 (CR1) a sérového faktoru H (CFH) na inaktivní iC3b. Polymerizaci C9 a vytvoření MAC blokuje protektin (CD59) a C3-konvertázu membránový protein DAF (decay-accelerating factor, CD55) (Kim and Song 2006).

Vrozená nebo získaná nekontrolovatelná aktivace alternativní cesty komplementu je hlavní etiologií atypického HUS (Fakhouri et al. 2017).

Známky aktivace komplementu jsou dokumentovány u STEC HUS již od 80. let 20. století, jako například snížení C3 složky a zvýšení komplementových degradačních produktů (C3b, C3c, C3d), a naopak zvýšení plasmatické koncentrace C3a vznikající štěpením C3 na C3b a sC5b-9 (Robson et al. 1992; Thurman et al. 2009; Monnens et al. 1980).

Zvýšení plasmatických koncentrací Bb faktoru a sC5b-9 poukazuje na aktivaci alternativní cesty během akutní fáze a koreluje s poškozením renálních funkcí pacientů s aktivním STEC-HUS (Ferraris et al. 2015; Morigi et al. 2011). Hypotéza, že alternativní cesta komplementu je klíčovým mediátorem mikrovaskulární trombózy a zhoršení renálních funkcí je založena na datech, která demonstrují protekci před trombocytopenií a dysfunkcí ledvin u myši s deficiencí faktoru B (Locateli et al. 2014, Orth et al. 2009).

Studie *in vitro* prokázaly, že Stx přímo ovlivňuje regulaci aktivity komplementového systému (Orth et al. 2009; Ehrlenbach et al. 2013; Arvidsson et al. 2015). Orth a kol. prokázali, že Stx2a se váže přímo na CFH, čímž dochází k redukci jeho kofaktorové aktivity na buněčném povrchu. To způsobuje zvýšenou aktivaci komplementu a akumulaci C3b (Orth et al. 2009). Jiné studie ukazují, že Stx2a je ligandem dvou proteinů patřících do rodiny faktoru H, a to FHR-1 a FHL-1, které mají podobnou sekvenci aminokyselin a regulační aktivitu jako faktor H (Poolpol et al. 2014). Navíc, Stx2 snižuje expresi inhibitoru komplementu CD59, regulátoru MAC, na povrchu endotelu glomerulů a tubulárních buněk. To má za následek dysregulaci a snažší aktivaci alternativní cesty komplementu (Ehrlenbach et al. 2013).

Působením Stx na endotel dochází *in vitro* ke zvýšené expresi P-selektinu, který váže a aktivuje C3, a tím vede ke zvýšené tvorbě trombů (Morigi 2011). Štěpená C3a redukuje expresi trombomodulinu a umožňuje vznik trombů. C3a a C5a indukují upregulaci adhezivních molekul a sekreci cytokinů. Tím zvyšují propustnost buněk a podporují adhezi leukocytů na endotelie (Monsinjon et al. 2003).

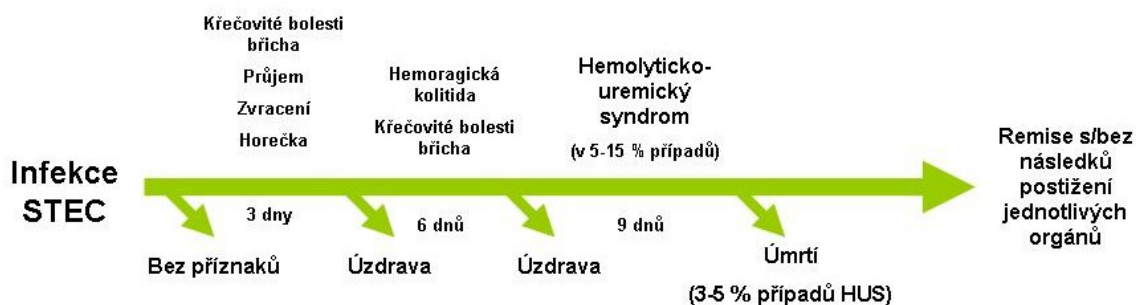
Další výsledky poukazující na vliv komplementu v patogenezi STEC-HUS vychází z pozorování depozit C3 a C9 na povrchu krevních mikropartikulí u pacientů se STEC-HUS. Neutrofilů, monocytů, erytrocytů a trombocytů po navázání s Stx tvoří mikrovezikuly, které na svém povrchu nesou C3 a C5b-9 produkty povrchu (Poolpol et al. 2014; Arvidsson et al. 2015). Depozita produktů aktivovaného komplementu na destičkách vedou k dalšímu uvolnění mikrovezikul a anafylatoxiny C3a, C5a a C5b-9 indukují hyperaktivaci destiček (Zoja et al. 2019), což se může spolupodílet na protrombotickém stavu během STEC-HUS (Hattori et al. 1989).

Důsledkem všech změn je vznik trombotické mikroangiopatie s endoteliální dysfunkcí a tvorbou fibrinových mikrotrombů. To vede k postižení jednotlivých orgánů a následně k rozvoji klinických projevů HUS.

2.2.3. Klinický obraz infekce STEC a STEC-HUS

Infekce bakteriemi STEC mohou vyvolat široké spektrum klinických příznaků: asymptomatické nosičství, nekomplikovaný vodnatý průjem, hemoragickou kolitidu až rozvoj HUS. Inkubační doba onemocnění je většinou 3–8 dnů (Tarr et al. 2005). Typickým projevem nákazy je křečovitá bolest břicha provázející vodnatý průjem, který v 70 % případů během 3 dnů přechází v hemoragickou kolitidu. Na rozdíl od průjmů vyvolaných jinými invazivními patogeny bývá ve stolici přítomna masivní příměs krve. Komplikací průjmu může být invaginace, prolaps rekta, paralytický ileus a v ojedinělých případech může dojít až k perforaci střeva. Zvracení je přítomné na začátku onemocnění pouze ve 30–60 % případů, průběh onemocnění bývá obvykle afebrilní (horečka bývá pouze u 30 % infikovaných). Většina nakažených se spontánně uzdraví do 10 dnů, avšak u části pacientů může infekce vést k rozvoji život ohrožujícího onemocnění. U sporadických případů se riziko rozvoje STEC-HUS pohybuje mezi 5–15 %, v průběhu některých epidemií však bylo popsáno riziko až 20 % a více (např. epidemie *E. coli* O104:H4 v Německu, 2011) (Tarr et al. 2005; Wong et al. 2012).

Klinické příznaky HUS se plně rozvinou během 5–10 dnů od začátku gastrointestinálních symptomů (viz obrázek 4).



Obrázek 4 Časový a klinický průběh infekce STEC a rozvoje STEC-HUS (modifikováno podle Tarr et al. 2005)

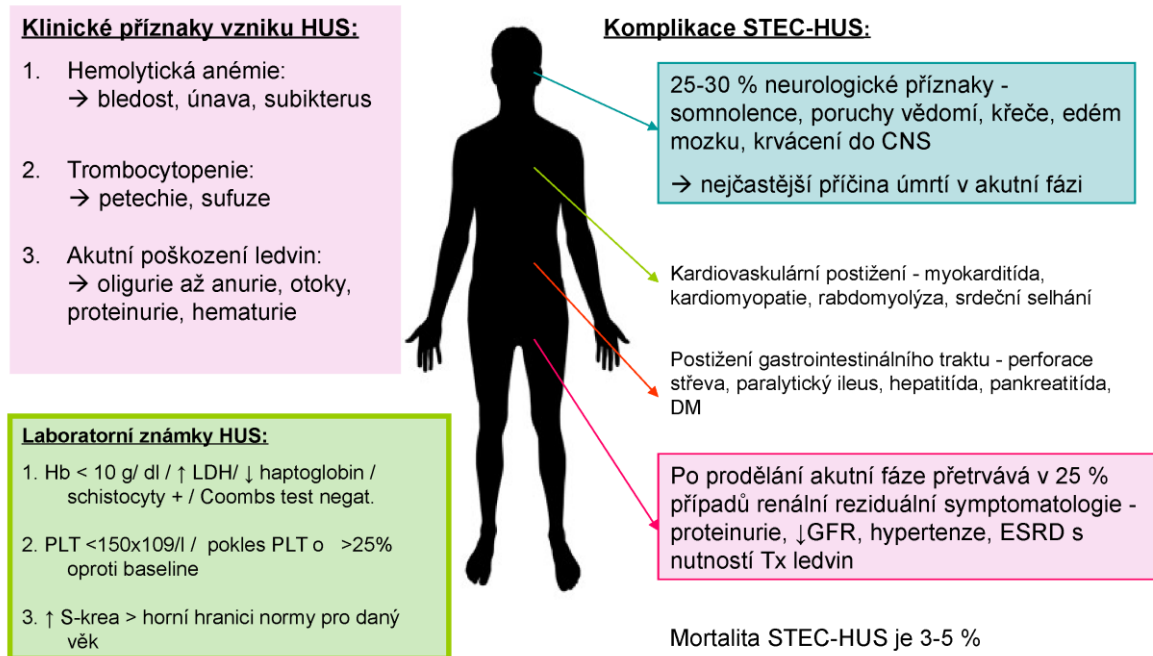
Jsou charakterizovány náhle vzniklou anémií s nápadnou bledostí, často dušností a únavou. Ve třetině případů je přítomen subikterus až ikterus. Příznaky plynoucí z trombocytopenie, jako krvácení do kůže ve formě petechií, sufuzí a zvýšená tvorba hematomů, jsou méně časté. Hlavními známkami poškození ledvin jsou i přes

dostatečnou rehydrataci při průjmovém onemocnění oligurie až anurie doprovázené otoky a hypertenzí (4.–10. den trvání průjmu, rozmezí 1–10 dnů).

Z laboratorních nálezů při rozvoji STEC-HUS stojí v popředí trombocytopenie (počet trombocytů $< 150 \times 10^9/l$, je možný pokles až ke $30 \times 10^9/l$ a méně), neimunní hemolytická mikroangiopatická anémie (Coombs test negativní, pokles hemoglobinu v rozmezí 50–100 g/l) se schistocyty a hyperazotémie (zvýšená koncentrace urey, kreatininu nad horní hranici normy pro daný věk). Důsledkem hemolýzy je zvýšená koncentrace laktátdehydrogenázy (LD), nekonjugovaná hyperbilirubinémie, nízký či nedetekovatelný haptoglobin, může být přítomna elektrolytová dysbalance (zejména hyponatrémie, hypo/hyperkalémie) i mírná elevace jaterních transamináz. V některých případech je známkou aktivace komplementu pokles koncentrací C3 a C4 složky, koagulační testy jsou obvykle normální (Tarr et al.2005).

Hlavní klinické a laboratorní známky STEC-HUS jsou shrnuty na obrázku 5.

Typický hemolyticko-uremický syndrom (STEC-HUS/ D+HUS)



Obrázek 5 Klinický obraz a laboratorní známky STEC-HUS

Mezi prokázané negativní prognostické faktory průběhu STEC-HUS patří délka anurie, délka dialyzační léčby, CNS symptomatologie, hypertenze, vyšší věk, atypické formy HUS. Mezi laboratorními negativními prognostickými faktory se dále uvádí leukocytóza, elevace LD, prolongovaná anémie a trombocytopenie (Belastracci et al. 2014; Oakes 2006).

Vzhledem k pokrokům v léčbě APL je mortalita onemocnění nízká a v akutní fázi onemocnění se pohybuje mezi 1–5 % (Tarr et al. 2005). Je způsobena obvykle závažnými neurologickými komplikacemi. I když u většiny pacientů dojde ke spontánní remisi onemocnění za 1–3 týdny, u minimálně 25 % dětí přetrvává po překonání akutní fáze různě závažná reziduální renální symptomatologie, která může vyústit i několik let po prodělaném onemocnění v terminální fázi chronického selhání ledvin s nutností dialýzy a následně transplantaci ledviny (Garg et al. 2003; Bláhová et al. 2002; Spinale et al. 2012).

Mezi nejčastější komplikace STEC-HUS patří postižení CNS, které je také nejčastější příčinou úmrtí v akutní fázi onemocnění. CNS symptomatologie může být různého stupně (letargie, iritabilita, agitace, křeče, edém mozku a kóma, hemiparéza, poruchy zraku, postižení hlavových nervů v důsledku krvácení do CNS- predilekčně oblast bazálních ganglií) a vyskytuje se u více než 25 % dětských pacientů (Siegler 1994; Oakes et al. 2008) a dokonce až u 50 % dospělých během německé epidemie O104 (Ullrich et al. 2013). Ke vzácným pozdním následkům se řadí diabetes mellitus, žlučové kameny, neurologické postižení (Garg et al. 2003).

2.2.4. Mikrobiologická diagnostika typického HUS

Úspěšná izolace a identifikace kmene STEC ve stolici pacienta s příznaky HUS hraje důležitou roli v rozlišení STEC-HUS od jiných atypických forem HUS, a tím umožní zvolení vhodného léčebného postupu, který se významně liší u různých forem daného onemocnění (např. symptomatická terapie u typického HUS, eculizumab a plazmaferéza u atypické formy). Také rychlá detekce STEC ve stolici pacienta a subtypizace *stx* genu je důležitá k určení rizika progresu průjmového onemocnění v HUS a celkově k predikci závažnosti průběhu STEC-HUS (Stx1a vs. Stx2a).

Při podezření na STEC infekci (hemoragická kolitída, vodnatý průjem s křečovými bolestmi břicha, často afebrilní průběh, příměs krve ve stolici do tří dnů od

nástupu příznaků u dětí do 5 let věku, kontakt se zvířetem - farma, ZOO, pití nepasterizovaného mléka, konzumace nedostatečně tepelně upraveného masa, neomyté zeleniny či ovoce především vlastní produkce) je vhodné co nejdříve zaslat výtěr z rekta na kultivaci. Jelikož většina mikrobiologických laboratoří kultivační nález *E. coli* ve stolici dále sérotypizuje (a tím v první fázi identifikuje potenciální STEC od jiných kmenů *E. coli*) pouze u pacientů mladších než 3 roky, je nutné na žadance zdůraznit, že u pacienta je podezření na infekci STEC.

Následně jsou kmeny suspektních STEC (nejčastěji *E. coli* séroskupin O157, O103, O111, O145, O26) zasílány k průkazu či ověření Stx do Národní referenční laboratoře (NRL) pro *E. coli* a shigely Státního zdravotního ústavu podle vyhlášky „O systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce“. Izoláty *E. coli* zmiňovaných séroskupin, u kterých nejsou Stx prokázány a pocházejí od pacientů s nekomplikovaným průjmem (tj. bez příměsí krve), se zpravidla označí jako enteropatogenní *E. coli* (EPEC). V případě izolace Stx-negativních kmenů výše uvedených séroskupin od pacientů s HUS nebo krvavým průjmem se s vysokou pravděpodobností jedná o STEC, které ztratily Stx-kodující geny během infekce nebo během kultivace *in vitro*.

V případě již rozvinutého HUS, je nutné analyzovat celý vzorek stolice (o velikosti 2–3 lískových oříšků, nikoliv rektální výtěr), jelikož množství bakterií od počátku onemocnění klesá a v době rozvoje HUS může kvantita patogenu ve stolici poklesnout natolik, že STEC již nemusí být běžně dostupnými metodami používanými v klinických mikrobiologických laboratořích detekovatelná. Daný vzorek je nutné odeslat do NRL pro shigely a *E. coli*, SZÚ, Praha, kde je analyzován použitím specifických a citlivých diagnostických metod. Tím se zvýší pravděpodobnost úspěšného nálezu STEC u pacienta s HUS, která se ve světové literatuře uvádí kolem 70 %.

K detekci kmenů ve vzorcích stolic se provádí pomnožení, imunomagnetická separace a kultivace na selektivních a diagnostických mediích umožňujících záchyt STEC. K detekci *stx* genů slouží PCR screening, k sérotypizaci jednotlivých kmenů je prováděn fenotypový průkaz O a H antigenu aglutinací s antiséry. Metodou PCR se provádí také genotypizace *stx* a dalších genů kódujících toxiny. Produkty PCR jsou následně detekovány elektroforézou a vizualizovány pod UV světlem. K určení biologické aktivity Stx slouží test cytotoxicity na buněčné kultuře Vero. Pulzní gelovou elektroforézou (PFGE) se prokazuje epidemiologická souvislost izolátů (přenos ze zvířete na člověka, rodinný výskyt). K určení příbuznosti, fylogenetické analýzy a typizaci kmenů se využívá metoda MLST (multilokusová sekvenční analýza), která funguje na

bázi sekvenování genových fragmentů sedmi housekeeping genů (*adk*, *arcA*, *fumC*, *icdA*, *mdh*, *mtlD*, *pgi*). Analyzuje sekvenční typy (ST), pro které jsou specifické kombinace alel provozních genů. Novým přístupem pro charakteristiku bakteriálních kmenů je celogenomové sekvenování (whole genome sequencing), pomocí kterého lze stanovit kompletní sekvenci genomové DNA bakterií, lze tak analyzovat i dosud neobjasněné geny rezistence a virulence.

2.2.5. Terapie STEC-HUS

2.2.5.1. Symptomatická terapie

Terapie STEC-HUS zůstává prozatím pouze symptomatická a zahrnuje zejména rehydratační terapii, parenterální nutrici a dialýzu (Tarr et al. 2005). Podle nejnovějších studií, právě časná rehydratace izotonickým roztokem již v době průjmu má pozitivní vliv na průběh onemocnění HUS a snižuje riziko oligoanurie a potřebu dialýzy (Ardissino et al. 2015; Hickey et al. 2011).

V první řadě je nutná úprava vodní a elektrolytové rovnováhy a korekce anémie (většinou až při poklesu hemoglobinu pod 60 g/l). Korekce trombocytopenie se doporučuje až při poklesu PLT pod $20 \times 10^9/l$. Jsou-li přítomny klinické projevy krvácení, hradí se trombocyty i při hodnotě nad $20 \times 10^9/l$ a v případě nutné chirurgické intervenci se musí substituovat už při hodnotách pod $50 \times 10^9/l$ (Karpman 2002). S volumovou terapií se pojí také antihypertenzní terapie podle běžných terapeutických schémat. Zahájení dialyzační léčby je nutné v 47-70 % případů, kritéria k zahájení dialyzační léčby odpovídají obecným požadavkům k zahájení náhradní funkce ledvin u akutního renálního selhání (anurie, hypervolémie, hyperkalémie, těžká acidóza a urémie) (Bitzan et al. 2010). Časné zahájení dialýzy však nemá prokazatelný benefit (Bitzan et al. 2010). Podle věku a průběhu onemocnění je následně zvolena forma dialýzy (peritoneální dialýza (PD), hemodialýza (HD), kontinuální očišťovací metoda (CVVHD)). Neméně důležité je zajištění dostatečného kalorického příjmu a terapie případných orgánových dysfunkcí (antiepileptická terapie, inotropika, inzulin, ventilační podpora, a jiné).

Kontroverzní je otázka podání antibiotické terapie ve stadiu gastroenteritidy, která se obecně nedoporučuje (děti léčené ATB vyvinuly HUS častěji než děti, u kterých ATB nebyla podána) (Wong et al. 2012) z důvodu uvolňování toxinu z bakterií v časně fázi

léčby ATB. Rovněž podání plazmy u pacientů s HUS nemá podle studií prokazatelný benefit (Dundas et al. 1999). Během epidemie O104 v Německu měli léčení plasmferézou měli horší symptomy onemocnění než ti, kteří byli léčení symptomaticky a při propuštění měli vyšší koncentraci kreatininu (Kielstein et al. 2012).

Specifická terapie formou monoklonálních protilátek proti Stx (Urtoxazumab) (Bitzan et al. 2009; Lopez et al. 2010) a syntetický analog Gb3 receptoru (SYNSORB-Pk) (Watanabe et al. 2004) mají doposud spíše význam pouze v experimentální medicíně, jelikož Stx se vyváže na dané receptory velmi rychle (během 30 minut), tedy v době, kdy pacient ještě nevykazuje známky HUS.

2.2.5.2. Eculizumab

Eculizumab je humanizovaná monoklonální protilátka IgG2/4 proti C5 složce komplementu, která má za cíl zastavit aktivaci alternativní cesty komplementu blokací konverze C5 na C5a a C5b (Rother et al. 2007). Neinterferuje však s aktivací C3, která může dále vést k buněčnému poškození cestou opsonizace a aktivací zánětlivých buněk.

Daný lék byl původně vyvinut v roce 2007 k terapii paroxysmální noční hemoglobinurie a od roku 2011 je schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) jako primární volba terapie u pacientů s atypickým HUS. Prozatím neexistují kontrolovaná data ohledně použití eculizumabu v léčbě STEC-HUS, ale vzhledem k tomu, že u STEC-HUS také dochází k aktivaci alternativní cesty komplementu (Thurman et al. 2009), je možné jeho „off-label“ podání u těžkých forem typického HUS, především u pacientů s CNS symptomatologií.

V roce 2011 autoři publikace v časopise *New England Journal of Medicine* poprvé popsali použití eculizumabu u tří dětí se STEC-HUS provázeného neurologickými komplikacemi a APL s nutností dialýzy (Lapeyraque et al. 2011). U všech tří pacientů došlo do 24 hodin po podání ke zlepšení neurologického stavu. Do pěti dnů od podání první dávky eculizumabu se normalizovaly i hodnoty hematologických parametrů. Na základě dané publikace byl během epidemie *E. coli* O104 v Německu podáván lék eculizumab u pacientů se závažným průběhem a neurologickými komplikacemi. U 193/491 (39 %) pacientů se zahájila léčba eculizumabem po neúspěšné terapii plasmferézou. Výsledky prezentované ve studii Kielstena a kol. nepodporují použití eculizumabu u dospělých s HUS, jelikož nebyl potvrzen benefit eculizumabu ve srovnání s podpůrnou terapií (Kielstein et al. 2012). U pacientů byl však eculizumab podán

s prodlením 11 dnů od začátku onemocnění, přičemž data dostupná pro pacienty s aHUS poukazují na asociaci lepší prognózy a časného podání eculizumabu u aHUS (Legendre et al. 2013). Paralelní studie, která analyzovala benefit eculizumabu u dětí 13/90 (14 %) během O104 epidemie, nebyla průkazná z důvodu malého počtu pacientů (Loos et al. 2012).

Existují však i studie a kazuistiky, které dokazují promptní zlepšení průběhu onemocnění po podání eculizumabu (Pape et al. 2015; Lapeyraque 2011). Gitiaux a kol. publikovali výsledky 7 dětí s neurologickými komplikacemi během STEC-HUS, u kterých do 6 měsíců po podání eculizumabu došlo ke zlepšení CNS nálezu na MRI (Gitiaux et al. 2013). Percheron et al. publikovali v roce 2017 multicentrickou retrospektivní studii zaměřenou na terapii eculizumabem u pacientů se závažným průběhem STEC-HUS (Percheron et al. 2017). Ve studii bylo zařazeno 33 pacientů z 15 klinik, indikací podání eculizumabu byly komplikace neurologické (n=20), kardiologické a neurologické (n=8), kardiologické (n=2) a GIT (n=3). U 19 pacientů s neurologickými komplikacemi došlo k úplné úpravě neurologického stavu. Podle daného výsledku lze usuzovat možnost pozitivního vlivu terapie eculizumabem na průběh onemocnění u pacientů s neurologickým postižením.

Účinnost terapie v dané indikaci je stále kontroverzní a zůstává předmětem diskuze, k dalšímu posouzení efektivity léčby jsou nutné randomizované studie srovnávající děti léčené včasným podáním eculizumabu a léčené standardní terapií. Přestože některé klinické analýzy však poukazují na zlepšení neurologických symptomů po včasném podání daného léku, další parametry (délka dialýzy a trvání trombocytopenie) signifikantní zlepšení nevykazují.

Riziko dané terapie spočívá ve zvýšené náchylnosti pacientů k bakteriálním infekcím (zejména meningokokové etiologie) z důvodu blokace terminální cesty komplementu. Z důvodu prevence tedy musí všichni pacienti léčení eculizumabem absolvovat vakcinaci proti meningokokové meningitidě. V případě podání terapie je nutné zajištění pacienta profylaktickou antibiotickou léčbou (nejčastěji penicilin) do doby očkování a ještě dalších 14 dní po skončení vakcinace.

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE A PRACOVNÍ HYPOTÉZY

3.1. Studie 1: Retrospektivní analýza průběhů STEC-HUS u dětských pacientů v České republice.

3.1.1. Cíle práce

1. Analýza klinického průběhu STEC-HUS u dětí
2. Epidemiologická analýza STEC-HUS a srovnání klinického průběhu onemocnění jedinců infikovaných různým sérotypem STEC

3.1.2. Pracovní hypotéza

Infekce kmenem STEC O26 je spojena s vyšší morbiditou a mortalitou onemocnění HUS.

3.2. Studie 2: Aktivace komplementu je asociována s těžším průběhem STEC-HUS

3.2.1. Hlavní cíl práce

1. Zhodnocení vztahu aktivace komplementu a závažnosti průběhu STEC-HUS

3.2.2 Pracovní hypotéza

Aktivace alternativní cesty komplementu u pacientů se STEC-HUS je spojena se závažnějším průběhem onemocnění.

3.3. Studie 3: Charakteristika dvou příbuzných kmenových linií *Enterohemoragické Escherichiae coli* O26 pomocí celogenomové sekvenace

3.3.1. Cíle práce

1. Analýza fylogenetických vztahů a klonální struktury STEC O26 izolovaných od pacientů v České republice pomocí WGS.
2. Identifikace laboratorně rychle diagnostikovatelných faktorů virulence predikujících kritický průběh infekce.

3.3.2. Pracovní hypotéza

Včasná identifikaci virulentnějšího kmene STEC O26 může predikovat závažnost průběhu onemocnění HUS.

4. METODIKA

4.1. Studie 1: Retrospektivní studie STEC-HUS u dětských pacientů v České republice

4.1.1. Pacienti a design studie

Provedli jsme retrospektivní studii dat získaných ze zdravotní dokumentace pacientů hospitalizovaných ve všech třech dětských dialyzačních centrech v České republice (Fakultní nemocnice Motol v Praze, Fakultní nemocnice Brno: Nemocnice Bohunice, Fakultní nemocnice Ostrava) v letech od 1999 až 2015.

Diagnóza STEC-HUS byla založena na přítomnosti průjmového onemocnění v předchorobí nebo kultivačního zachycení STEC ve stolici pacienta. Klinická kritéria pro HUS byla hemolytická anémie (hemoglobin ≤ 100 g/l elevace laktát dehydrogenázy, negativní Coombsův test, přítomnost schistocytů v krevním nátěru), trombocytopenie (počet destiček $\leq 150 \times 10^9$ /l) a akutního renální poškození. Akutní renální selhání bylo definováno jako pokles glomerulární filtrace podle kritérií P-RIFLE (Akcan-Arikan et al. 2007). Sesbíraná data obsahovala demografické údaje, klinické symptomy před přijetím k hospitalizaci (průjmové předchorobí, enteroragie, zvracení, horečka, oligoanurie), krevní tlak, laboratorní nálezy při příjmu – hemoglobin (Hb), počet trombocytů (PLT), laktát dehydrogenáza (LDH), kreatinin, urea, albumin, celková bílkovina (CB), aminotransferázy (AST, ALT), amyláza, C3 složka komplementu. Glomerulární filtrace (eGFR) byla vypočtena podle Schwartzovy formule (Schwartz et al. 2009). Hypertenze byla definována jako krevní tlak ≥ 95 . percentil pro daný věk, výšku a pohlaví (Flynn and Falkner 2017). Dále jsme u pacientů sledovali klinický průběh, potřebu a délku dialýzy, extrarenální symptomy a komplikace (neurologické, kardiální, plicní, gastrointestinální) během akutní fáze onemocnění.

Hlavní kritéria pro zahájení dialýzy byly anurie trvající déle než 24 hodin, symptomatická hypervolémie s edémem plic nebo edémem mozku, refrakterní elektrolytové změny ($K \geq 7$ mmol/l, $Na \geq 160$ mmol/l nebo pod 120 mmol/l) a urea ≥ 40 mmol/l.

Stolice pediatrických pacientů s HUS byly analyzovány v NRL pro *E. coli* a shigely ve Státním zdravotním ústavu v Praze. Detekce a izolace kmenů STEC byla provedena

pomocí kultivačních metod (zejména pomnožení na MacConkey agaru), sérotypizaci izolátů (sklíčková aglutinace s antiséry), biochemicky a kmeny byly testovány na přítomnost stx1a a stx2a genů pomocí PCR podle protokolů popsanych v předchozích publikacích (Marejková et al. 2013).

4.1.2. Statistická analýza

Statistická analýza dat byla provedena prostřednictvím statistického softwaru R (verze 3.1.1). P-hodnota $< 0,05$ byla považována za statisticky významnou. Základní metrické charakteristiky souboru byly charakterizovány mediánem a IQR (interquartile range) a byly analyzovány pomocí Mann-Whitney testu. K jejich porovnání byl použit Welchův t-test.

4.2. Studie 2: Aktivace komplementu je asociována s těžším průběhem STEC-HUS

4.2.1. Pacienti a sběr dat

Ve studii byla použita klinická, mikrobiologická a epidemiologická data pacientů ze studie 1: Retrospektivní studie typického HUS (STEC-HUS) u dětských pacientů v České republice. Z dané kohorty pacientů jsme se dále soustředili na pacienty, u kterých byly stanoveny koncentrace složky C3, jakožto markeru aktivace komplementu.

4.2.2. Statistická analýza dat

Základní statistické metody, které byly použity jsou popsány ve studii 1. P hodnoty byly následně adjustovány použitím Bonferroni korekcí pro mnohonásobné porovnání. Kategorické veličiny byly porovnané použitím likelihood ratio testu k posouzení poměru šancí (odds ratio) s 95 % konfidenčním intervalem. Asociace mezi hodnotou C3 a biochemickými parametry a délkou trvání dialýzy byly testovány použitím lineárního regresního modelu. Generalizovaný regresní model byl použit ke zhodnocení asociace binominálních proměnných.

Křivku ROC (Receiver operator curve) jsme použili k nalezení nejlepší cut-off hodnoty pro C3 koncentraci u pacientů s HUS, kteří potřebovali dialýzu.

Statistická analýza dat byla provedena prostřednictvím statistického softwaru R (verze 3.1.1). Proměnné s hodnotou $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné a byly použity k multivariační analýze.

4.3. Studie 3: Charakteristika dvou příbuzných kmenových linií enterohemoragické *Escherichiae coli* O26 pomocí celogenomové sekvenace

4.3.1. Metody a soubor bakteriálních kmenů

STEC vyvolávající onemocnění u lidí se též označují jako enterohemoragické *E. coli* (EHEC) na základě jejího prvního záchytu u pacientů s hemoragickou kolitidou, a dané označení bývá používáno zejména v mikrobiologických studiích. Proto i my v této studii budeme používat označení EHEC. Cílem naší studie bylo analyzovat fylogenetické vztahy a klonální strukturu EHEC O26 izolovaných od pacientů v České republice pomocí celogenomového sekvenování (WGS) se zaměřením na ST29 kmeny. Pro globální srovnání jsme genomové sekvence českých O26 izolátů porovnali s izoláty O26 z dalších evropských zemí a s genomy *E. coli* O26 přítomnými v GenBanku.

4.3.1.1. Databázové mínování

Nejdříve jsme získali genomové sekvence *E. coli* z databáze GenBank. Extrahovali jsme pak jen genomy podobné kmenu *E. coli* St.Olav179, který je součástí "Late nEC". Kmeny se symetrickou identitou pod 92 % byly odstraněny, jelikož typicky reprezentovaly jiný sérotyp než O26. Byly odstraněny non-O26 sérotypy, a celkově jsme podrobili genomovému srovnání 127 kmenů.

4.3.1.2. Celogenomové sekvenování

Hlavní metodou našeho projektu bylo celogenomové sekvenování (WGS) kmenů O26 formou shotgun sequencing použitím Illumina sekvenátoru v spolupráci s laboratoří v Institute of Hygiene at the University Hospital in Münster (Doc. MUDr. Martina Bielaszewska, CSc., Univ. Prof. dr.med. Alexander Mellman, Ph.D.).

Celkově bylo izolováno 16 kmenů EHEC O26:H11/H- od pacientů z České republiky v letech 2006 až 2016. 10 kmenů pocházelo od pacientů s HUS, 4 kmeny od pacientů s krvavým průjmem a 2 kmeny od jedinců s nekrvavým průjmem.

Další nEC kmeny EHEC O26:H11/H- izolované v Německu (n=11), Itálii (n=3) a Rakousku (n=2) byly izolovány od pacientů s HUS (n=10) anebo nekrvavým průjmem (n=6).

České a německé kmeny byly získány původně z laboratoří autorů, italské a rakouské izoláty byly nezištně poskytnuté Stephanem Morrabitem (European Union Reference laboratory for *E. coli*, Instituto superior Di Sanita, Rome, Italy) a Dorotheaou Orth- Holler (Division of Hygiene and Medical Microbiology, Innsbruck Medical university, Austria). WGS byla standardně provedena podle pokynů výrobce (Mellmann et al. 2016). Po inokulaci jednotlivých kolonií do výživného bujonu (Heipha, Eppelheim, Německo) a inkubaci přes noc (37°C), byla extrahována genomická DNA pomocí MagAttract HMW DNA kit (Qiagen, Hilden, Germany) s přidáním lyozymů (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) podle výrobních instrukcí. Následně byla připravena sekvenační knihovna z genomické DNA použitím Nextera kitů na přípravu vzorků (Illumina, Inc, San Diego, Ca, USA) pro 150-bp nebo 250-bp paired-end sekvenčních cyklů na MiSeq přístroji (Illumina) v souladu s pokyny výrobce. Draft genomy námi osekvenovaných kmenů jsme anotovali použitím NCBI prokaryotické genomové anotační pipeline a jsou dostupné v GenBanku pod přístupovým číslem.

4.3.1.3. Bioinformatická analýza

Následně ve spolupráci s RNDr. Jaroslavem Nunvářem, Ph.D. z Ústavu mikrobiologie 2.LF a FNM byla provedena analýza získaných dat pomocí programu Geneious. Genomy byly porovnány s referenčním genomem EHEC O26 a O157, a zároveň byly srovnány jednotlivé kmeny mezi sebou.

4.3.1.4. Fylogenetická rekonstrukce

Analýza evoluční historie *E. coli* O26 byla provedena pomocí na SNP založené genomové analýze na webové stránce CSIPhylogeny v1.4. Na vytvoření fylogenetického stromu jsme využili program FastTree a MEGA7. Jako referenční genomy pro

fylogenomovou analýzu byly použity sekvence genomů *E. coli* O111:H- kmene 11128 a *E. coli* O26:H11 kmene 11368.

4.3.1.5. In silico analýza molekulárních markerů

Přítomnost genů spojených s patogenicitou (plasmidové geny EHEC-*HlyA*, *KatP*, *espP* a *etpD*, *stx1a* a *stx2a*) byly hodnoceny použitím TBLASTN integrovaným v Geneious R9.1. (Kearse et al. 2012).

4.3.1.6. Synapomorfní SNP

Genomové sekvence několika kmenů reprezentujících genomovou diverzitu *E. coli* O26 byly seřazeny v programu Progressive Mauve. SNP byla považována za synapomorfní v případě, že byla přítomna u všech členů dané linie a chyběla u zbylých kmenů O26.

4.3.1.7. Stx-konvertující profág

Jako reference jsme si zvolili sekvenci *stx2a*- konvertujícího profága *E. coli* O104:H4 kmene C227-11 a *E. coli* O157:H7 Sakai. K analýze jsme použili platformu program Geneious R9.

4.3.1.8. PCR k odhalení Late nEC

Další testování EHEC O26 probíhalo ve spolupráci s Ing. Monikou Marejkovou, Ph.D. ze Státního zdravotního ústavu v Praze.

PCR založena na SNP byla použita na rychlý screening k detekci missence mutací v *sen/ent* genu (kóduje enterotoxin 2 *Shigella flexneri*) specifický pro Late nEC. Program Primer/BLAST jsme použili k navržení primerů. Všechny kmeny nEC byly následně testovány na daný SNP a byla dosažena 100 % korelace mezi přítomností specifické *sen/ent* PCR s výsledky z WGS.

4.3.1.9. Detekce produkce Stx a cytotoxicita

Cytotoxicita EHEC O26 byla zkoumána ve spolupráci s doc. MUDr. Martinou Bielaszewskou, CSc. ze Státního zdravotního ústavu v Praze.

VTEC RPLA

VTEC RPLA (Verotoxin-producing *E. coli* reverse passive latex agglutination) assay byla provedena podle pokynů výrobce. Připravili jsme sériově zředěný supernatant, který byl připraven centrifugací bujony s bakteriálními kulturami a následně profiltrován přes 0,22 µm jehlový filtr. Stx1a a Stx2a titry byly aglutinovány latexovými částicemi senzibilizovanými anti-Stx1a a anti-Stx2a protilátkami. Stx1a a Stx2a v supernatantech byly následně kvantifikovány a porovnány se standardními supernatanty se známými titry koncentrací Stx1a (VT1) a Stx2a (VT2).

Vero cell assay

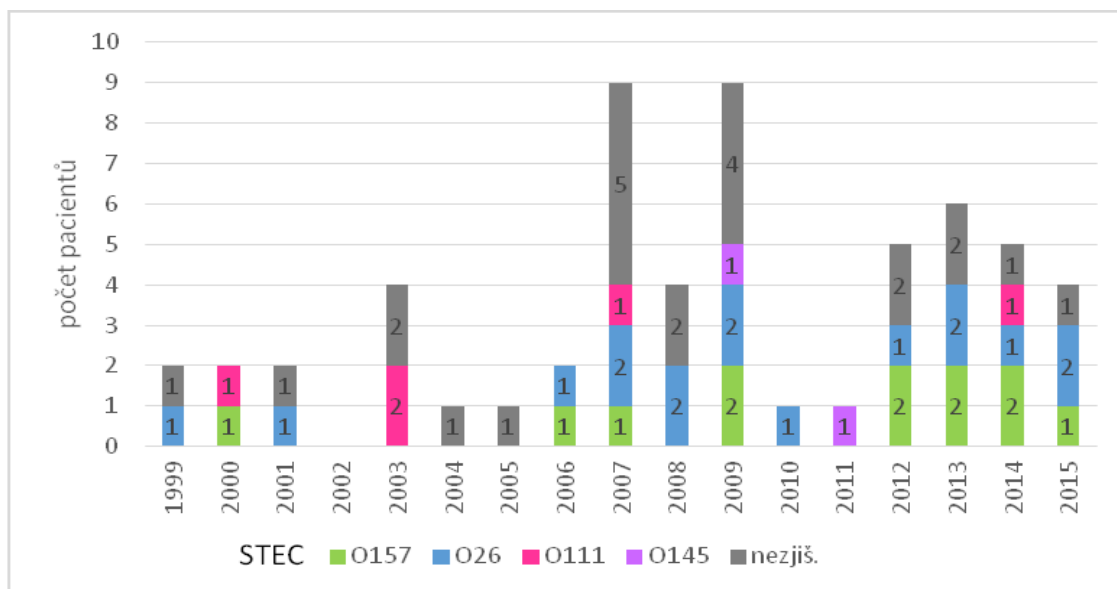
Vero-B4 buňky (ACC-33, German collection of microorganisms and cell cultures, Germany) byly udržovány v Dulbeccově modifikovaném médiu (DMEM) s glutaminem a fetálním bovinním sérem. Použili jsme cytotoxickou assay, kde jednovrstvé Vero buňky rostou na 96jamkových destičkách a jsou inkubovány se dříve zmíněným supernatantem 72 hodin. Po odstranění supernatantu zbylé adherující Vero buňky byly fixovány formalinem a po omytí byly dále vylouhované s krystalovou violetí. Absorbance byla následně měřena přístrojem FLUOstar Omega. Cytotoxické titry byly následně znázorněny jako reciproční hodnoty zředěného vzorku, který usmrtil 50 % buněk (CD₅₀).

5. VÝSLEDKY

5.1. Studie 1: Retrospektivní studie STEC-HUS u dětských pacientů v České republice

5.1.1. Klinická a biochemická charakteristika kohorty pacientů

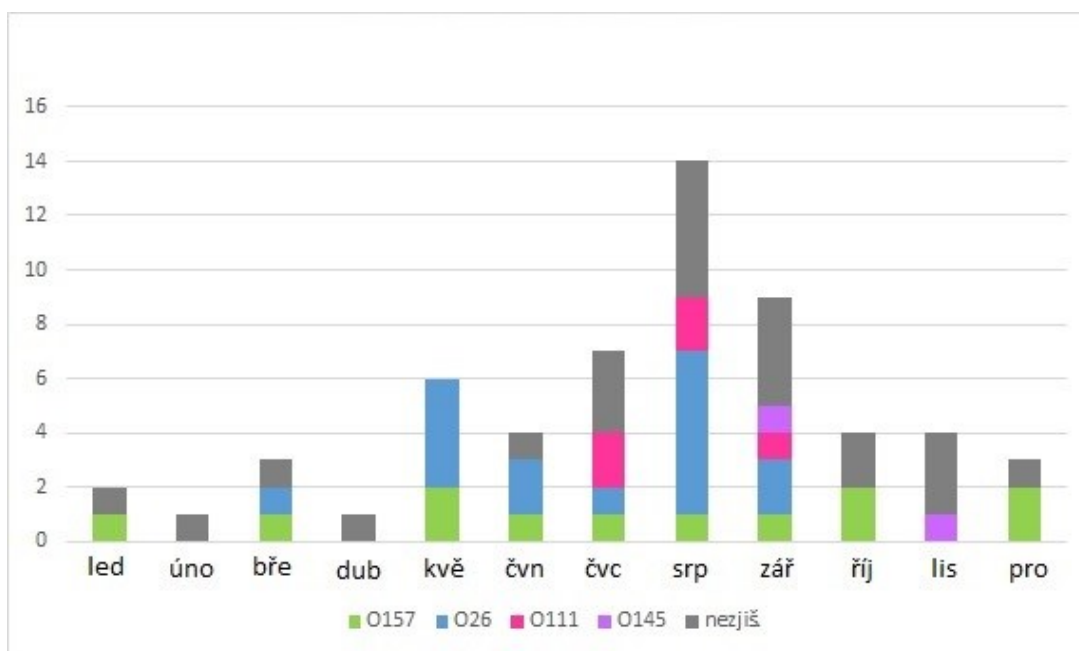
Během 17letého období (srpen 1999 - září 2015) bylo identifikováno 58 pacientů s diagnózou STEC-HUS. Klinická a biochemická charakteristika pacientů je uvedena v tabulce 3. Medián věku pacientů v době hospitalizace byl 27,5 měsíců (v rozmezí 7-129 měsíců), v souboru bylo 30 chlapců a 28 dívek. 86,2 % (50/58) dětí bylo ve věku do 5 let.



Obrázek 6 Incidence STEC-HUS v ČR a přehled etiologie v období 1999-2015. Graf také zobrazuje počty případů pacientů s jednotlivými sérotypy STEC zachycenými v průběhu onemocnění.

Průměrná roční incidence STEC-HUS za posledních 10 let byla odhadnuta na 0,28 případů/100000 dětí do 15 let (nejvyšší incidence byla 0,56 případů/100000 dětí do 15 let v roce 2007 a 2009) (obrázek 6).

Výskyt onemocnění byl vyšší v teplých měsících s maximem od července do září (viz. obrázek 7). Jako potenciální cesty infekce byly zvažovány např. kontakt dítěte s koněm na farmě, pití nepasterizovaného mléka, konzumace kabanosu, nebo pobyt v cizině (návrat z Egypta a z Tunisu).



Obrázek 7 Sezónní výskyt STEC-HUS v ČR včetně etiologie v období 1999-2015

Pacienti byli hospitalizováni 2 až 14 dní (medián 6 dní) po objevení se gastrointestinálních symptomů a medián trvání hospitalizace byl 20 dní (IQR 3-72 dní).

Rozvoji HUS nejčastěji předcházela průjem, a to u 57 pacientů. Enteroragie byla přítomná u 34/58 pacientů (58,6 %). U 1 pacienta bez průjmového předchobí se HUS manifestoval hematurií a až následně byl ve stolici izolován kmen STEC O26.

Zvracení bylo v předchobí u 45/58 (77,6 %) pacientů, febrilie u 24/58 (41,4 %), oligo/ anurie byla u 42/58 (72,4 %) případů. Otoky byly pozorovány u 53,4 % dětí (31/58). Méně častým příznakem byly petechie u 19 % (11/58) a subikterus u 15,5 % (9/58) hospitalizovaných. Neurologická symptomatologie byla přítomná při přijetí k hospitalizaci u 17 pacientů (29,3 %), a to křeče u 3 a porucha vědomí/ apatie u 14 dětí.

Ultrazvukové vyšetření ledvin prokázalo u 50/58 (86,2 %) dětí zvětšené hyperechogenní ledviny s difuzní lézí parenchymu.

Náhrada funkce ledvin byla zahájena u 37 (63,8 %) pacientů: peritoneální dialýza u 12, hemodialýza u 21 dětí a ve 4 případech byla PD změněna na HD. Medián trvání dialýzy byl 10 dnů (rozmezí 1-37 dnů). U 13/58 (22,4 %) byla nutná hospitalizace na jednotce intenzivní péče s umělou plicní ventilací. Transfúze byla podána u 45 pacientů

(77,6 %). Klinické příznaky, laboratorní výsledky a terapie pacientů jsou shrnuty v tabulce 3.

Tabulka 3 Klinické a laboratorní data dětských pacientů během akutní fáze typického HUS v České republice (1999-2015)

		N	Medián	IQR
	Počet	58		
	M: F	30:28		
	Věk (měsíc)		27,5	7-129
	Doba od začátku prodromů k hospitalizaci (den)		6	2-14
	Doba hospitalizace (den)		20	3-72
Vstupní laboratorní hodnoty	Hemoglobin (g/l)		85	54-122
	Trombocyty ($\times 10^9/l$)		53	11-229
	Leukocyty ($10^9/l$)		15,9	5-59,1
	LDH (ukat/l)		42	4,8-112
	Schistocyty (promile)		19	3-181
	Celkový bilirubin (umol/l)		16,8	2,8-102
	ALT (ukat/l)		1,1	0,2-6,5
	AST(ukat/l)		1,9	0,3-5,9
	Urea (mmol/l)		21,5	8,1-67,7
	S- kreatinin (umol/l)		258	50-770
		N	%	
Předchorobí	Průjem	57	98,2	
	Enteroragie	34	58,6	
	Zvracení	45	77,6	
	Horečka	24	41,4	
	apatie/porucha vědomí	14	24,1	
	Křeče	3	5,2	
	Petechie	11	19	
	Subikterus	9	15,5	
	Otoky	31	53,4	
	Oligoanurie	42	72,4	
	Hematurie	12	20,7	
Terapie	Dialýza	37	63,8	Medián 10 dnů (rozmezí 1-37 dní)
	TRF	45	77,6	
	UPV	15	25,8	
Komplikace	Neurologické komplikace	14	25,5	Edém mozku, křeče, obrna n. abducens, intrakraniální krvácení
	Úmrtí	5	8,6	5-11 dní po začátku onemocnění

Hodnoty jsou uvedeny jako median a IQR. Kategorické proměnné jsou popsány jako absolutné frekvence.; LDH, laktát dehydrogenáza; ALT, alaninaminotrasferáza, AST, aspartátaminotrasferáza, TRF, transfuze; UPV, umělá plicní ventilace

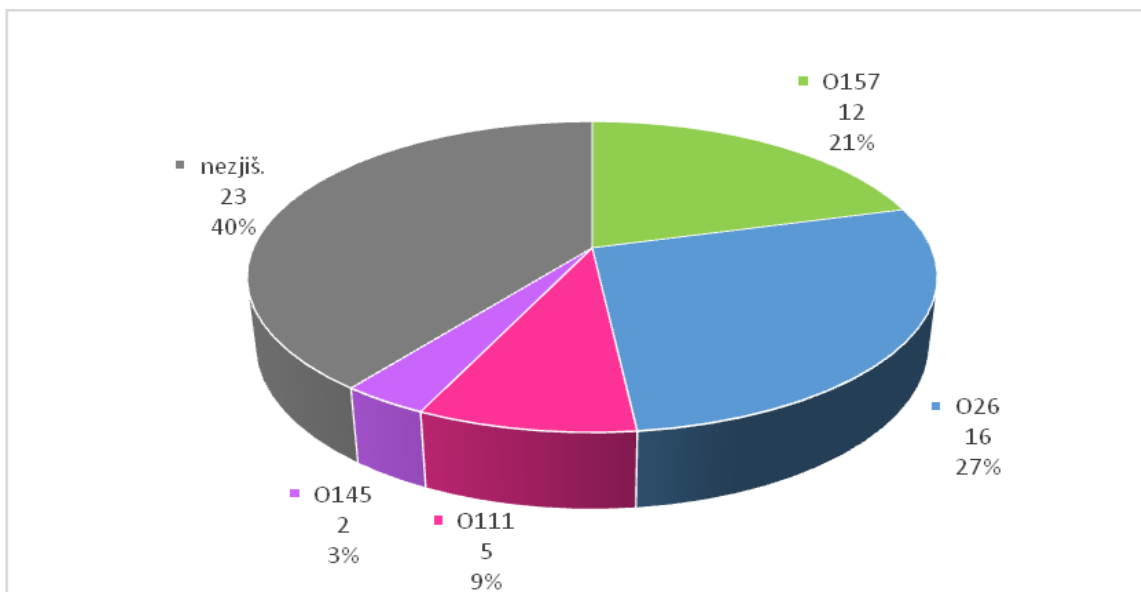
Extrarenální manifestace HUS se v naší kohortě projevila u 31 (53,4 %) dětí. Z respiračních komplikací byl nejčastější fluidotorax (n=6) a edém plic (n=4). Postižení oběhového systému se projevilo jako myokarditida (n=1), kardiomegalie (n=2), trombóza horní duté žíly (n=1) a oběhové selhání (n=4). Seps se rozvinula u 5 dětí.

Gastrointestinální komplikace byly pankreatitida (n=3), hepatomegalie (n=3), paralytický ileus (n=2) a pericholecystitida (n=1). Ze závažných neurologických komplikací byly pozorovány tonicko-klonické křeče (n=3), spastická kvadruparéza (n=2), obrna lícního nervu (n=2), paleocerebelární syndrom (n=2), paréza n. abducens (n=1), halucinace (n=1) a edém mozku (n=5). Zobrazovacími metodami (MRI n=5, CT n=6) byly u pacientů s neurologickými komplikacemi zjištěny kromě edému CNS také krvácení (n=1) a ischemické změny (n=1) v bazálních gangliích, pontinní myelinolýza (n=1). Nejčastějším nálezem na EEG u pacientů s HUS byla oploštěná a zpomalená aktivita (n=6). Intraretinální hemoragie byly popsány u 3 pacientů.

Během akutní ataky podleho komplikacím HUS 5 dětí. Maligní edém mozku byl příčinou úmrtí u 4 pacientů a oběhové selhání s asystolií u 1 pacienta. U 14/53 (26,4 %) pacientů byla v době dimise potřebná antihypertenzní terapie, u 6/53 (11,3 %) medikace pro proteinurii. U 4/53 (7,5 %) pacientů přetrvávaly známky CKD při propuštění do domácí péče.

5.1.2. Etiologie STEC-HUS

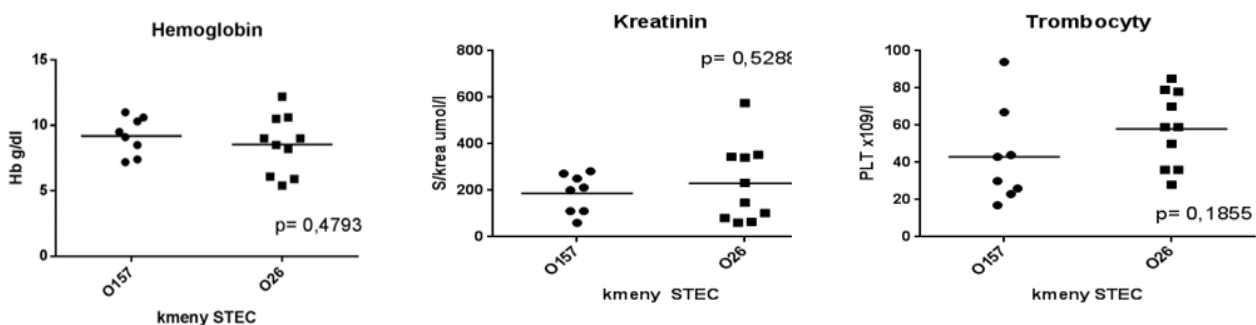
Jako etiologické agens byl 60,3 % (35/58) případů izolován kmen STEC ze stolice pacientů. Nejčastější sérotyp STEC byl O26:H11 (48,5 % všech STEC, n=16), dále se podílely séroskupiny O157:H7 (n=12), O111 (n=5) a O145 (n=2). Podíly séroskupin v jednotlivých letech jsou zobrazeny na obrázku 6, 7, 8. Produkce Stx2 byla zachycena u všech kmenů O26, 8 kmenů O157 a 2 kmenů O145. 4 kmeny O157 a 3 kmeny O111 produkovaly oba Stx, a to Stx1 a Stx2. Ve 2 případech byly identifikovány kmeny *E. coli* séroskupiny O111, kde lze předpokládat ztrátu genů pro Shiga toxiny. Kromě STEC byly jako infekční agens vykultivované např. Enteropatogenní *E.coli* (sérotypy O1, O78, O06), *Salmonella* (n=3) a *Citrobacter* (n=2).



Obrázek 8 Etiologie STEC-HUS v ČR (podle sérotypů STEC)

5.1.3. Porovnání klinického průběhu HUS u pacientů s infekcí O26 a O157

Porovnání průběhů HUS u pacientů s infekcí STEC O26 a O157 neprokázalo žádný signifikantní rozdíl v klinice a laboratorních hodnotách (obrázek 9, tabulka 4).



Obrázek 9 Porovnání vstupních laboratorních hodnot u infekcí STEC O26 a O157

Tabulka 4 Porovnání průběhů HUS u pacientů s infekcí STEC O26 a O157

		O157	O26	p
N		12	16	
Stx2a (n)		4	16	
Stx1a+Stx2a (n)		8	0	
věk (měsíce)		30,5	26,5	0,68
prodromy (n)	Enteroragie	8	7	0,06
	Hematurie	0	4	
	Febrilie	6	7	
délka hospitalizace (medián, den)		17	16,5	0,86
dialýza (n)		8	7	
délka dialýzy (medián, den)		5	12,5	0,67
TRF (n)		10	13	
UPV (n)		2	3	
komplikace (n)	neurologické	3	3	
	kardiovaskulární	2	1	
	plicní	4	4	
	GIT	0	2	
úmrtí (n)		2	2	

Hodnoty jsou popsány jako absolutní proměnné a jako medián. TRF, transfuze; UPV, umělá plicní ventilace

U 8 pacientů s prokázanou infekcí O26 bylo nutné zahájení dialýzy (8/16), u 13 byla podána transfuze, UPV byla nutná u 3 pacientů. 2 pacientky (věk 19 a 25 měsíců) zemřely 3, resp. 8 dní od přijetí do nemocnice na následky maligného edému CNS. Hospitalizaci v obou případech předcházel průjem s následným rozvojem enteroragie a oligurie, pacientky byly afebrilní. Děti byly hospitalizované 3, resp. 2 dny od začátku příznaků.

7/12 případů infekce O157:H7 vyžadovalo zahájení eliminační metody, 10 pacientů transfuzi, 2 UPV. Daný kmen byl identifikován u 2 pacientů (věk 8 a 11 měsíců), kteří zemřeli během akutní ataky HUS. U prvního pacienta se rozvinulo oběhové selhání, edém mozku a následně smrt mozku 10 dnů od začátku rozvoje průjmu. Druhý pacient zemřel 12 dní po prvním průjmu na následky oběhového selhání s asystolií a nutností KPR.

U pátého pacienta, který podlehl na neurologické komplikace HUS sedmý den od prvních známek gastrointestinální infekce, se infekční agens neprokázalo. Přijetí k hospitalizaci předcházely 3 dny trvající průjem, bolesti břicha a zvracení s rozvojem anurie a generalizovanými křečemi při metabolické acidóze a hyponatrémii.

5.2. Studie 2: Aktivace komplementu je asociována s těžším průběhem STEC-HUS

5.2.1. Klinická charakteristika souboru pacientů

Provedli jsme retrospektivní analýzu klinických a laboratorních dat 33 pacientů se STEC-HUS (18 chlapců, 15 dívek) ve věku 7 měsíců až 10 let v letech 1999 až 2015. Koncentrace C3 složky komplementu byla stanovena v iniciační fázi onemocnění dětí.

Pacienti byli hospitalizováni 3 až 10 dní (medián 5 dní) po objevení se gastrointestinálních symptomů a medián trvání hospitalizace byl 22 dní (IQR 3-55 dní). Stx-produkující *E. coli* byly izolovány u 23/33 (69,7 %) případů a nejčastějším sérotypem byla STEC O26:H11 (11/23, 47,8 %).

Medián trvání oligoanurie před zahájením dialýzy byl 3 dny (rozmezí 1-6 dní). Hypertenze byla zaznamenána u 15/24 (62,5 %) pacientů, v 9 případech jsme záznam o tlaku při příjmu nenalezli. Stav 24/33 (72,7 %) pacientů vyžadoval zahájení náhrady funkce ledvin: peritoneální dialýza u 9, hemodialýza u 12 dětí a ve třech případech byla PD změněna na HD (tabulka 5).

Extrarenální manifestace HUS se v naší kohortě projevila u 14 dětí. U 7 pacientů byly pozorovány závažné neurologické komplikace, a to porucha vědomí (n=4), křeče (n=1), spastická kvadruparéza jako následek krvácení do bazálních ganglií (n=1), obrnlícního nervu a paleocerebelární syndrom (n=2) a halucinace (n=1). Dva pacienti ve věku 0,9 a 1,6 roku zemřeli následkem edému mozku a krvácení do CNS, a to 6 a 12 dní po objevení se prvních příznaků onemocnění.

Tabulka 5 Demografická, klinická a laboratorní data pacientů se STEC-HUS

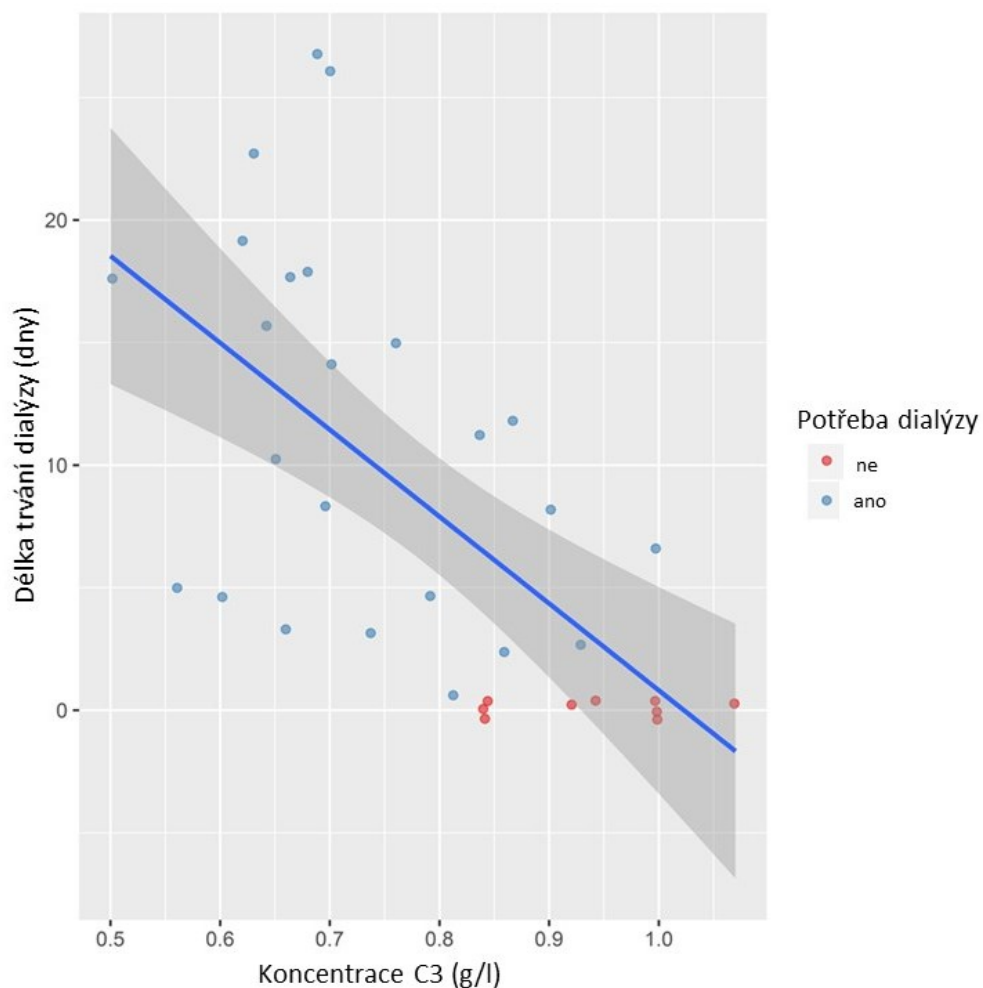
	Proměnné	
Charakteristika kohorty pacientů	Počet pacientů (chlapci:dívky)	33 (18:15)
	Věk (měsíce)	29 (7-121)
Laboratorní nálezy	Hb vstupně (g/l)	85 (54-122)
	Hb nejnižší (g/l)	61 (47-95)
	Hct vstupně	0,24 (0,16-0,34)
	Hct nejnižší	0,19 (0,14-0,3)
	Schistocyty vstupně (prom.)	19 (3-181)
	Schistocyty max. (prom.)	47 (6-470)
	PLT vstupně (10 ⁹ /l)	59 (12-186)
	PLT min. (10 ⁹ /l)	39 (11-186)
	WBC vstupně (10 ⁹ /l)	15,8 (6,3-59,1)
	WBC max. (10 ⁹ /l)	21,7 (7,1-61)
	CRP (mg/l)	23,15 (0,5-190)
	LDH (ukat/l)	43 (4,8- 112)
	urea vstupně (mmol/l)	21 (8,1-65,9)
	urea max. (mmol/l)	29,2 (8,6-65,9)
	eGFR vstupně (ml/min/1.73m ²)	14,82 (10,36-20,89)
	eGFR min. (ml/min/1.73m ²)	10,6 (8,96-17,43)
	eGFR výstupně (ml/min/1.73m ²)	69,41 (46,6-96)
C3 (g/l)	0,79 (0,5-1,07)	
Terapie	TRF (n)	26 (78,8)
	Potřeba dialýzy (n)	24 (72,7)
	Trvání dialýzy (dny)	10,5 (1-27)

Hodnoty jsou uvedeny jako median a IQR. Kategorické proměnné jsou popsány jako absolutné frekvence. Hb, hemoglobin; Hct, hematokrit; PLT, trombocyty; WBC, leukocyty; CRP, C-reaktivní protein; LDH, laktát dehydrogenáza; TRF, transfuze; eGFR, odhadovaná glomerulární filtrace

5.2.2. Laboratorní nálezy a koncentrace C3 složky komplementu

Koncentrace C3 užívaná jako marker aktivace komplementu byla v době přijetí k hospitalizaci v rozmezí 0,5 až 1,07 g/l (medián 0,79, IQR 0,66- 0,9).

Nalezli jsme silnou korelaci mezi koncentrací C3 a délkou trvání dialýzy ($r = -0,62$, $p = 0,0001$) (obrázek 10).



Obrázek 10 Korelace mezi koncentrací C3 a délkou trvání dialyzační terapie (RRT) u pacientu se STEC-HUS ($r=-0,62$, $p=0,0001$)

Mnohonásobný lineární regresní model neprokázal závislost této asociace na počtu leukocytů, hematokritu, iniciální eGFR a celkové bílkovině a dané výsledky jsou zobrazeny v tabulce 6. Slabší, ale statisticky signifikantní, byla také korelace mezi koncentrací C3 a iniciální eGFR ($r=0,36$, $p=0,026$).

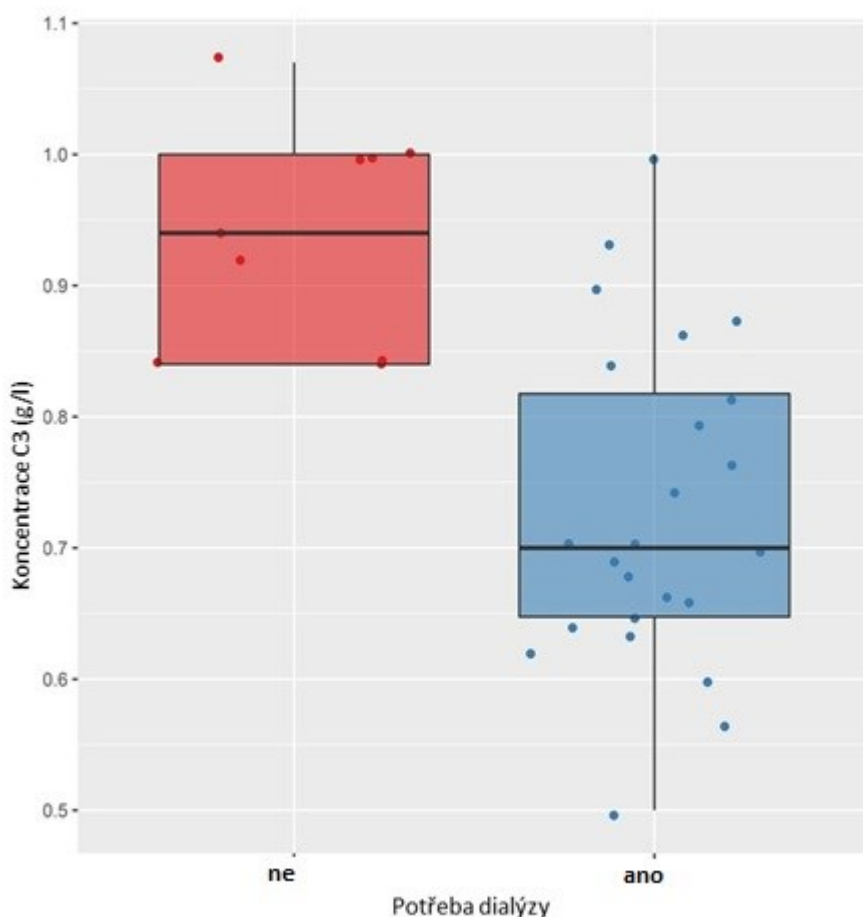
Tabulka 6 Lineární regresní model ukazující nezávislost asociace mezi délkou trvání dialýzy a koncentrací C3

	Odhadovaná		
	hodnota	95 CI	p hodnoty
C3 (g/l)	-29,8225	(-56,4183–3,2268)	0,0308*
Sérová celková bílkovina	-0,5453	(-1,0983-0,0077)	0,0528
WBC vstupně (10 ⁹ /l)	-0,0355	(-0,3082-0,2372)	0,7829
eGFR vstupně (ml/min/1.73m ²)	0,1229	(-0,1071-0,3529)	0,2692
Hct vstupně	20,2217	(-43,1449-83,5884)	0,5027

CI, konfidenční interval

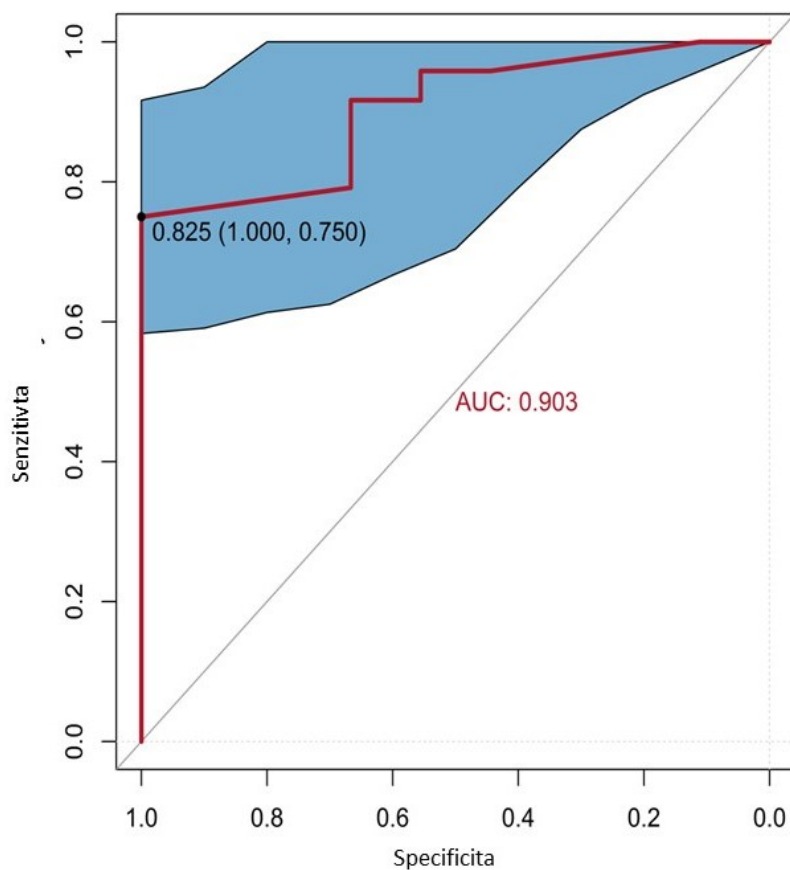
*Signifikantní $p < 0,05$

Vstupní koncentraci C3 u pacientů při přijetí k hospitalizaci zobrazuje obrázek 11. Koncentrace C3 se výrazně lišila mezi dialyzovanými pacienty (medián = 0,7 g/l, IQR 0,5-1) a nedialyzovanými pacienty (medián = 0,94 g/L, IQR 0,84-1,07), $p=0,001$.



Obrázek 11 Krabicový grafk porovnání C3 koncentrací u pacientů s a bez dialýzy během akutní fáze STEC-HUS. Skupina s dialýzou je vyznačena modře (medián = 0,7 g/l, IQR 0,5-1), skupina bez dialýzy je označena červenou barvou (medián= 0,94 g/L, IQR 0,84-1,07), $p=0,001$

Analýza pomocí ROC křivky odhalila optimální cut-off hodnotu C3, a to 0,825 g/l (82,5 mg/ml) se 100 % specificitou a 75 % senzitivitou, plocha pod křivkou (Area Under Curve) AUC 0,903 (viz obrázek 12).



Obrázek 12 ROC křivka (Receiver operator curve) pro cut-off koncentraci C3 složky komplementu 0,825 g/l jako prediktor zahájení dialýzy (AUC 0,903)

Ostatní prediktory potřeby zahájení dialýzy byly hematokrit a iničiální eGFR (neadjustované analýzy). C3 byla jediným nezávislým prediktorem dialýzy ve všech adjustovaných modelech.

5.2.3. Porovnání pacientů s vyšší a nižší koncentrací C3

Podle cut off hodnoty koncentrace C3 0,825 g/l získané ROC křivkou jsme rozdělili pacienty na 2 skupiny: C3 pod 0,825 g/l (Skupina 1) a $C3 \geq 0,825$ g/l (Skupina 2).

Univariatní analýza s Bonferroni korekcí odhalila signifikantní rozdíly v několika parametrech (CRP, ALT, AST, délka trvání dialýzy) mezi oběma skupinami (tabulka 7).

Tabulka 7 Univariátní analýza s Bonferroni korekcí laboratorních parametrů u pacientů s $C3 < 0.825$ g/L (Skupina 1) a $C3 \geq 0.825$ g/L (Skupina 2)

Proměnné	Skupina 1	Skupina 2	<i>p</i> hodnoty
Počet pacientů	18	15	
Věk (měsíce)	39,4±32,6	36,5±25,1	
Hb vstupní (g/l)	89±16	82,1±19	0,246
Hb nejnižší (g/l)	63 (53-82)	61 (47-95)	0,942
Hct vstupní	0,25±0,05	0,24±0,23	0,304
Hct nejnižší	0,18 (0,15-0,3)	0,19 (0,14-0,3)	0,765
Schistocyty vstupně (prom.)	19 (3-181)	19 (4-134)	0,891
Schistocyty max.(prom.)	48,5 (17-470)	43 (6-116)	0,681
PLT vstupně ($10^9/l$)	55,5 (12-140)	59 (17-186)	0,704
PLT nejnižší ($10^9/l$)	40 (11-94)	35 (13-186)	0,871
WBC vstupně ($10^9/l$)	19,4 (7-59,1)	13,7 (6,3-41,3)	0,031*
WBC max. ($10^9/l$)	26,4 (10,3-61)	16,5 (7,1-41,3)	0,007*
CRP (mg/l)	39,5 (4-190)	4,7 (0,5-69,3)	0,001*
LDH (ukat/l)	51,5 (5,9-112)	35 (4,8-78,8)	0,037*
ALT (ukat/l)	2,9 (0,42-6)	0,85 (0,26-3,9)	0,002*
AST (ukat/l)	3,3 (0,8-5,6)	1,29 (0,3-3,4)	0,001*
Amyláza (ukat/l)	2,3(0,42-6)	0,48 (0,41-0,9)	0,054
Celkový bilirubin (mmol/l)	14,4 (2,8-59,1)	14,5 (3,7-59,6)	0,648
Na vstupně (mmol/l)	130,7 (123-137)	135,3 (134-136)	0,206
K vstupně (mmol/l)	4,27±0,72	4,1±0,2	0,509
KM vstupně (mmol/l)	605 (381-1287)	505 (288-804)	0,027*
Urea vstupně (mmol/l)	25,9 (16,5-65,9)	20,7 (8,1-38,1)	0,212
Urea max (mmol/l)	33± 12,1	24,37±9,6	0,029*
eGFR vstupně (ml/min/1.73m ²)	10,14 (10,14-17,45)	16,13 (11,41-44,66)	0,043*
eGFR max. (ml/min/1.73m ²)	9,6 (8,78-12,28)	11,9 (9,35-34,4)	0,044*
eGFR výstupně (ml/min/1.73m ²)	53 (41,65-71,35)	77,34 (70,04-100,7)	0,079
Trvání dialýzy (dny)	14,5 (1-27)	0 (0-12)	<0,001*
Trvání hospitalizace (dny)	28,6±14,6	18±7	0,011*

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr± SD, medián a IQR. Kategorické proměnné jsou popsány jako absolutní frekvence a procenta. Hb, hemoglobin; Hct, hemotokrit; PLT, trombocyty; WBC, leukocyty; CRP, C-reactivní protein; LDH, laktát dehydrogenáza; TRF, transfuze; eGFR, odhadována glomerulární filtrace
*Signifikantní $p < 0,05$ v univariátní analýze.

Zvýrazněné hodnoty ukazují statisticky signifikantní rozdíl po Bonferroni korekci pro mnohonásobné testování.

Počáteční a vrcholová eGFR byly signifikantně nižší ve skupině 1 během akutní fáze onemocnění ($p=0,043$ a $p=0,44$) pomocí univariátní analýzy před korekcí pro multivariátní testování. Pomocí multivariátní analýzy byla signifikantně asociována s $C3$ koncentrací pouze délka trvání dialýzy.

V tabulce 8 jsou shrnuty renální a extrarenální komplikace během akutní ataky STEC-HUS. Pacienti s nízkou koncentrací C3 (Skupina 1) měli signifikantně více renálních symptomů ($p=0,015$).

Tabulka 8 Renální a extrarenální komplikace u pacientů s koncentrací C3 < 0,825 g/l (Skupina 1) a C3 \geq 0,825 g/l (Skupina 2)

	Skupina 1	Skupina 2
Počet pacientů	18	15
Počet pacientů s komplikacemi	12	4
Gastrointestinální	7	1
- ileus	2	1
- pankreatitída	3	0
- hepatomegalie	2	0
Plicní		
- edém	5	1
Kardiální		
- kardiomegalie	1	1
Centrální nervový systém		
- porucha vědomí	3	1
- křeče	0	1
- paleocerebellární syndrom	2	0
- kvadraparéza	1	0
- paréza hlavových nervů	2	0
- halucinace	0	1
Oční		
- retinální hemoragie	1	0
Umělá plicní ventilace	7	3
Úmrtí	2	0
Renální postižení při dimisi		
- proteinurie	10	4
- hematurie	3	3
- hypertenze s nutností medikace	8	3

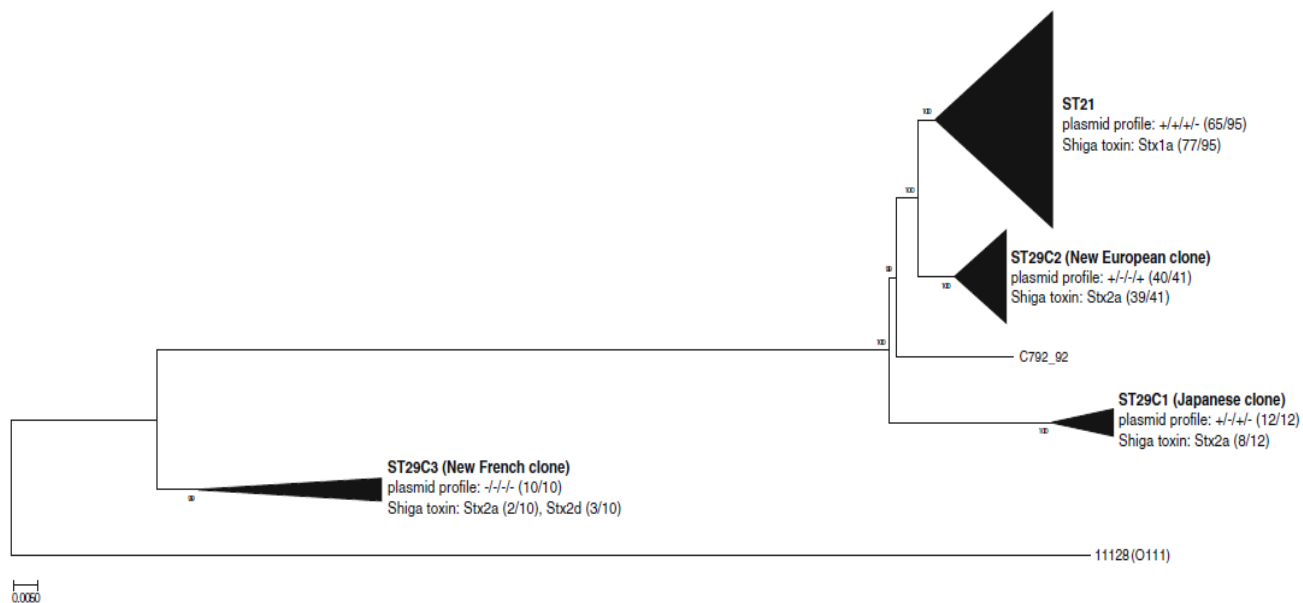
5.3. Studie 3: Charakteristika dvou příbuzných kmenových linií enterohemoragické *Escherichiae coli* O26 pomocí celogenomové sekvenace

5.3.1. Struktura populace EHEC O26 založená na WGS

Nejdříve jsme provedli celogenomové sekvenování 16 kmenů EHEC O26 (izolovaných od pacientů s HUS nebo od pacientů s průjmy) v České republice během období 2006-2016. STs a plasmidový profil byl získán *in silico* z hrubé genomové sekvenace kmenů. Kmeny O26 patřily do 2 hlavních fylogenetických linií, 6 izolátů patřilo k ST21 a 10 izolátů k ST29. Pět ze šesti ST21 kmenů neslo jen *stx2a* gen, zbylý jeden nesl jenom *stx1a* a všechny kmeny byly charakterizovány plasmidovým profilem (EHEC *-hlyA+*, *katP+*, *espP+*, *etpD+*). 9 kmenů z deseti českých sérovarů ST29 EHEC O26 patřilo do skupiny new European clone (nEC), který je definován přítomností *stx2a* a plasmidovým profilem EHEC- *hlyA+*, *katP-*, *espP-*, *etpD+*. Desátý kmen ST29 (15-496) nesl plasmidový profil typický pro nEC, ale v kombinaci s *stx1c* genem namísto *stx2b*. Daný záchyt *stx1C* genotypu byl poprvé popsán u kmenů nEC.

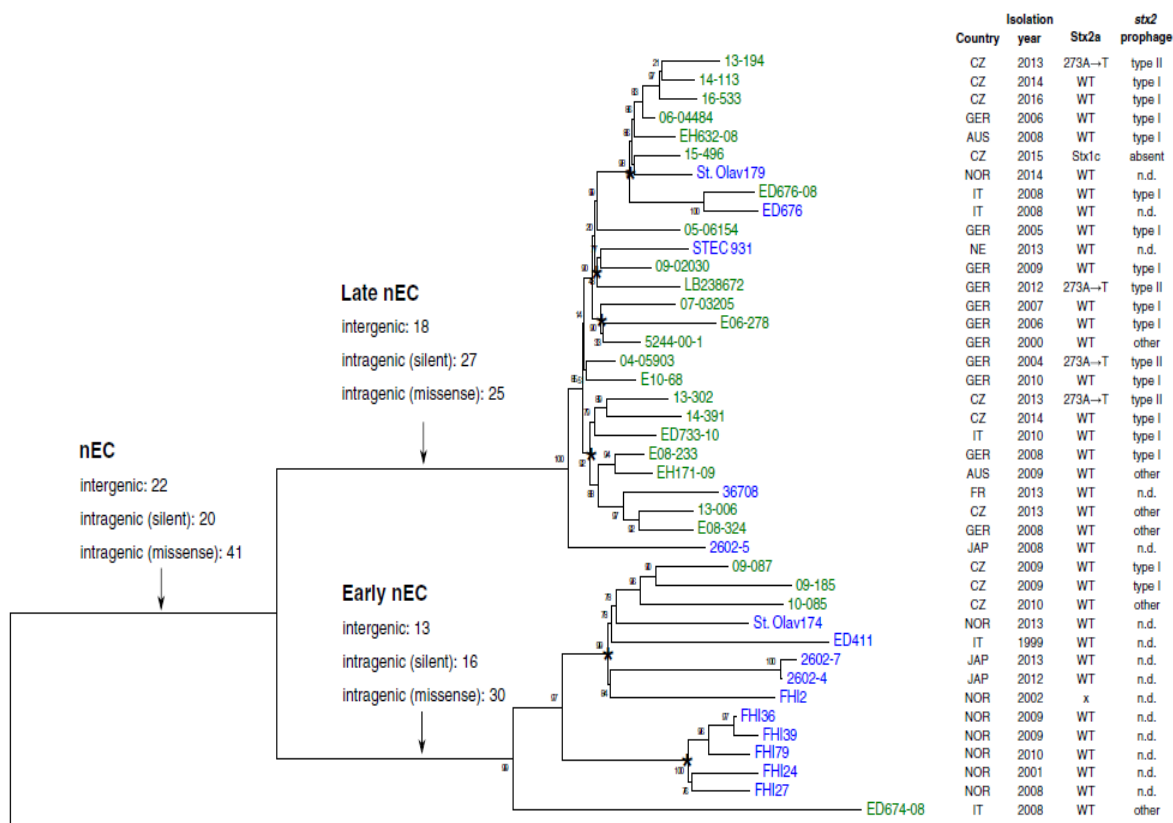
Abychom získali detailnější informaci o struktuře populace nEC, provedli jsme WGS kolekce kmenů nEC z Německa (n=11), Itálie (n=3), Rakouska (n=2). K námi osekvenované skupině kmenů nEC jsme následně přidali sekvenace EHEC O26 přístupné v GenBank databázi. Finální počet izolátů EHEC O26 k analýze byl 159.

Sestavením fylogramu založeném na single nucleotide polymorfizmu (SNP) s použitím modelu maximální podobnosti jsme identifikovali 4 hlavní linie EHEC O26 jejichž charakteristiky (ST, plasmidový genový profil, predominantní Stx typ) byly v souladu s předchozími studiemi (Ishijima et al. 2017, Bletz et al. 2013). Překvapivě, jsme danou fylogenetickou analýzou zjistili, že kmeny nEC (ST29C2) se rozdělily do dvou odlišných skupin- klastrů (viz obrázek 13).



Obrázek 13 Globální populace EHEC O26 založena na celogenomové fylogenezi. Hlavní linie jsou pojmenovány podle publikací (Ishijima et al. 2017, Ogura et al. 2017). Fylogenetický strom byl navržen pomocí FastTree s použitím Maximum likelihood phylogeny model (Price et al. 2010). Genom kmene 11128 *E. coli* O111:H- byl použit na znázornění jiného kmene než O26 (Ogura et al. 2009)

Výsledek byl v souladu s nálezem originální studie o nEC (Bielaszewska et al. 2013), kdy při analýze reprezentativní kolekce nEC pomocí pulsní gelové elektroforézy (PFGE) byly pozorovány dvě odlišné skupiny uvnitř nEC ST29 izolovaných mezi 1996 a 2012. Kmeny patřící do PFGE skupiny B byly prvně izolovány v roce 1996 a 53,6 % kmenů bylo izolováno do roku 2004. Zatímco kmeny PFGE skupiny C se začaly objevovat v Evropě až od roku 2004. Podle toho jsme následně pojmenovali naše WGS kmeny homologní k PFGE skupině B jako “časný” Early nEC a WGS skupinu homologní s PFGE skupinou C jako “pozdní” Late nEC (obrázek 14).



11368

Obrázek 14 Detailní celogenomová fylogeneze ST29C2 linií nEC EHEC O26. Kmeny sekvenované v této studii jsou označeny zeleně, kmeny, jejichž sekvence byly získané z jiných zdrojů, jsou označeny modře. Krajiny původů jednotlivých kmenů jsou označeny zkratkami: AUS, Rakousko; CZ, Česká republika; FR, Francie; GER, Německo, IT, Itálie, JAP, Japonsko; NE, Nizozemsko; NOR, Norsko. K jednotlivým kmenům je přiřazen typ *stx2a* konvertujícího profága (typ I, typ II, other- jiný typ, n.d.- typ nezjištěn) a je označena změna v aminokupině Stx2a (273A→T) typická pro profága typu II. Fylogenetický strom byl navržen pomocí FastTree s použitím Maximum likelihood phylogeny model (Price et al. 2010). Genom kmene 11128 *E. coli* O111:H- byl použit na znázornění jiného kmene než O26 (Ogura et al. 2009)

5.3.2. Evoluce, diverzifikace a rozšíření nEC

Abychom odvodili genetickou událost, která měla za následek evoluční vznik nEC a následně jeho rozdělení na Late a Early linii, hledali jsme mutace charakteristické pro obě linie, a také absenci SNP u fylogeneticky jiných *E. coli* O26 kmenů zahrnujících ST21 a ST29 non-nEC kmenů (tzv. synapomorfí mutace). Set synapomorfí mutací získaný touto analýzou poskytl jednoznačnou genetickou definici konkrétních nEC linií. Celkový počet synapomorfí mutací byl pro Early nEC 59, pro Late nEC 70 a pro nEC jako celek 83. Dané zjištění potvrzuje, že Early a Late nEC by měly být považovány za dvě fylogeneticky vzdálené jednotky.

Dále jsme se zaměřili na paralelní evoluci missense synapomorfních mutací (které ovlivňují funkci kódovaných proteinů) u nEC. U Late nEC jsme identifikovali celkem 25 missense mutací, z toho 3 byly mutace ve fimbriálních proteinech (ElfG, YqiG, a HtrE), které mohou mít vliv na persistenci Late nEC u savců, a tím pádem mohou mít možný vliv na patogenезi onemocnění u člověka. Další ze synapomorfních mutací pro Late nEC je taky mutace v *sen/ent* genu (daný gen kóduje Shigella flexneri enterotoxin 2). Abychom rychle rozlišili, zda se u pacienta jedná o infekci Late anebo Early nEC, navrhli jsme jednoduchou PCR pro Late nEC, která zachytí mutaci v *sen/ent* genu. Danou PCR jsme následně použili u všech nEC izolátů z České republiky (n=45) a Německa (n=15). Navzdory limitovanému počtu izolátů byl u obou zemí pozorován trend poklesu výskytu Early nEC s průvodním nárůstem proporce Late nEC. Daný trend je znázorněn na obrázku 15. To naznačuje, že obě linie mohou okupovat jedno a to samé místo a soutěžit o něj. Kmeny patřící do Late nEC byly také izolovány v dalších evropských zemích, jako jsou Rakousko (2008), Itálie (2008, 2010), Francie (2013), Nizozemsko (2013), Norsko (2014), ale i mimo Evropu - Japonsko (2008). To dokumentuje panevropskou a interkontinentální distribuci této linie.



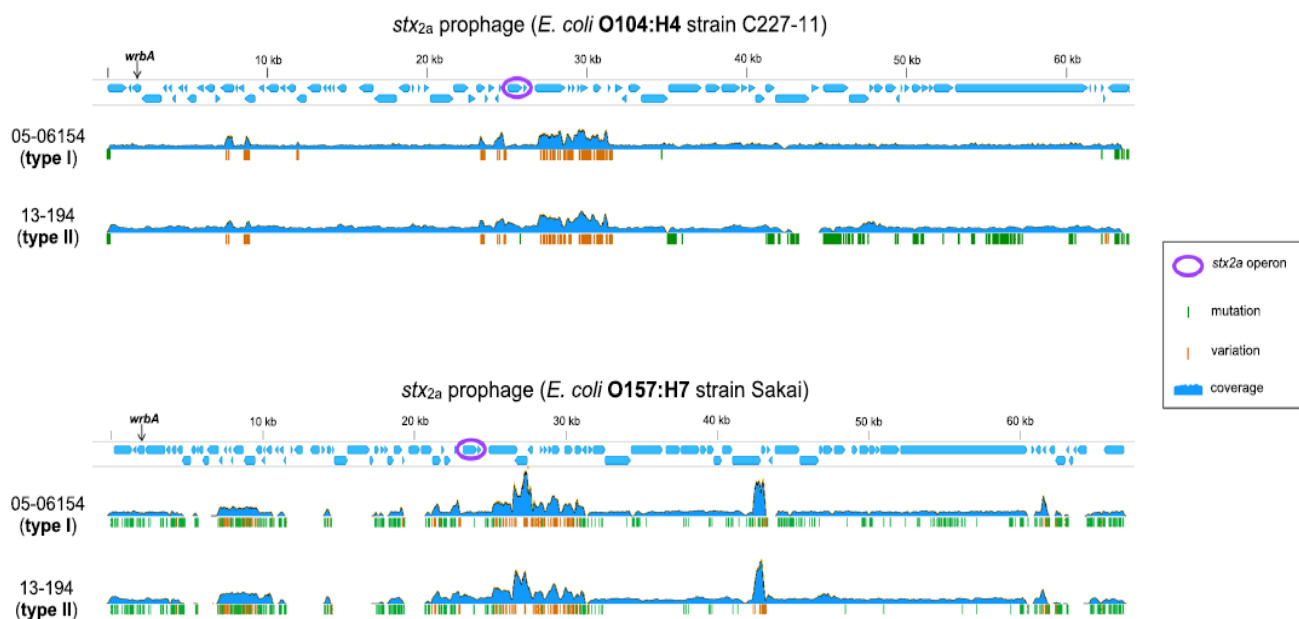
Obrázek 15 Roční incidence Early nEC a Late nEC v Německu a České republice. Graf znázorňuje proporce EnEC a LnEC v rámci nEC kmenů (*E. coli* O26, ST29, EHEC-*hly* A+, *katP*-, *espP*-, *etpD*+) izolovaných v daném období. EnEC a LnEC kmeny byly rozlišeny pomocí *sen/ent* SNP-specifickou PCR

5.3.3. nEC kmeny nesou odlišné *stx2a*-konvertující profágy

Shiga toxiny kódované *stx* geny jsou zodpovědné za systémovou komplikaci EHEC infekcí, jakou je HUS. *Stx* geny jsou lokalizovány v genomu lambdoidového profága (*stx*-konvertující fág), který je velmi heterogenní. Recentní studie ukazují, že *stx2a*-konvertující profág EHEC O26 nEC kmenů je virtuálně identický s *stx2a*-profágem přítomným u vysoce virulentní *E. coli* O104:H4, která způsobila epidemii v Německu. Jiné O26 linie nesou odlišné *stx*-konvertující profágy. Detailně jsme se zaměřili na profágy nEC a analyzovali jsme *stx*-konvertující profágy u Early a Late nEC.

Všechny *stx2a*-konvertující fágy byly integrovány ve *wrbA* genu, podobně jako byl integrovaný profág u O104:H4 a EHEC O157:H7 kmenu Sakai a EDL933. V souladu se studií Delannoy et al. (Delannoy et al. 2015), naše výsledky prokazují, že *stx2a*-konvertující profág, který je virtuálně identický s profágem *E. coli* O104:H4 (zde pojmenovaný jako typ I), je predominantně přítomen mezi nEC izoláty. Překvapivě byl u 4 Late nEC byl identifikován jiný vzdálený typ *stx2a*-konvertujícího profága (typ II). Ačkoliv levá polovina (5- konec) sekvence profága typu II je identická s O104:H4, pravá polovina (3- konec) byla signifikantně odlišná a nejvíce podobná sekvenci *stx2a*-konvertujícího profága EHEC O157:H7.

Pozoruhodné je to, že typ II nese jednu bodovou mutaci v levé polovině sekvence, která je identická a přítomná též u *stx*-konvertujícího fága typu I, typu II a O104:H4. Tato mutace, která má za následek záměnu alaninu (A) 273 za threonin (T) 273 v Stx2a A subjednotce, je nově zjištěná a není uvedena mezi již známými diverzity proteinu Stx2a (obrázek 16).

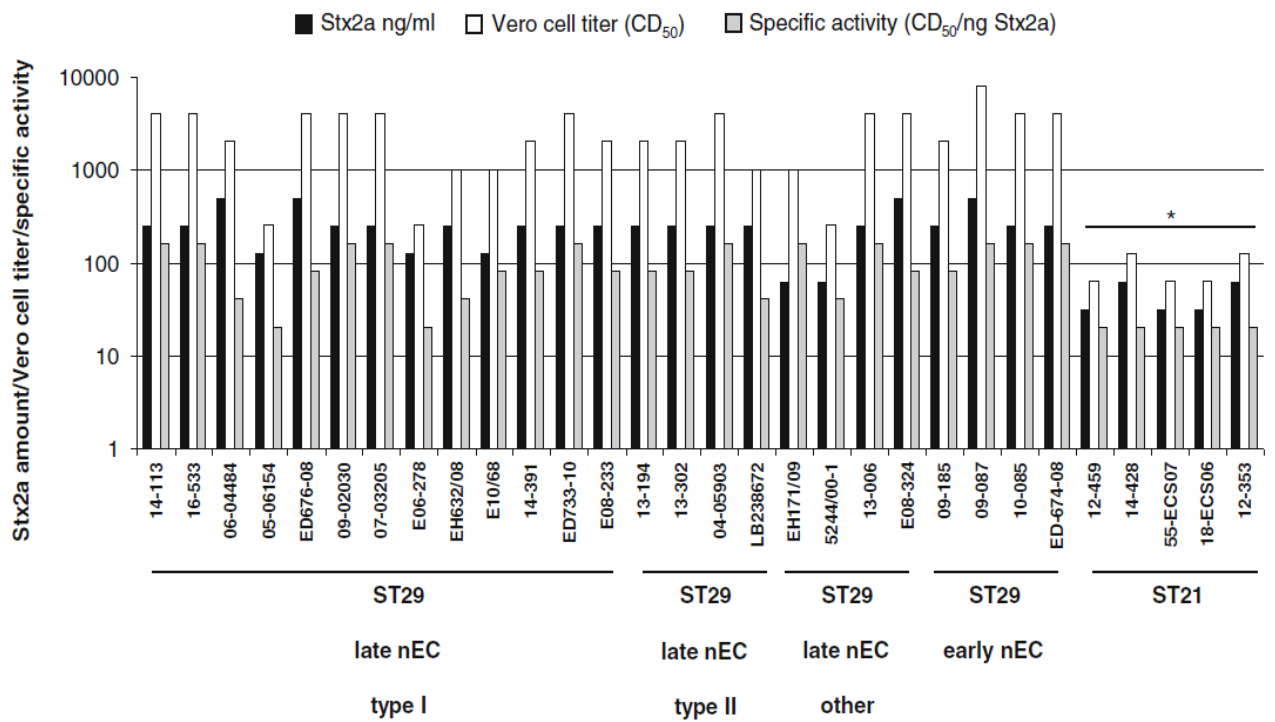


Obrázek 16 *stx2a*-konvertující fágy u kmenů EHEC O26 nEC. Vizualizace čtecích sekvenčních úseků, které jsou namapovány na profágy kmenů *E. coli* O104:H4 C227-11 (GenBank přístup: CP011331; nahore) a *E. coli* O157:H7 kmen Sakai (GenBank přístup: NC_002695; dolů). Kmen 05-06154 byl vybrán ze souboru nEC jako zástupce kmenů nesoucích typ I a kmen 13-194 jako zástupce kmenů nesoucích typ II *stx2a*-konvertujícího profága. Zelené vertikály znázorňují pravé mutace, oranžové vertikály reprezentují hybridní pozice variant bází, které se shodují s regiony s abnormálně vysokým sekvenčním krytím (pravděpodobně znázorňují oblasti čtecích úseků jiných lambdoidních profágů (Ogura et al. 2009))

5.3.4. Produkce Stx a cytotoxicita nEC

Abychom zjistili, zda daná A273 --> T273 mutace v A podjednotce Stx2a kódovaná *stx2a*-profágem typu II má vliv na toxicitu výsledného bílkovinného produktu Stx2a, porovnali jsme pomocí Vero buněčných cytotoxických titrů a specifické aktivity (CD50/ng toxin) *stx2a* produkovaných kmeny nEC s profágem typu II a kmeny nEC s dalšími typy profágů. Zjistili jsme, že daná mutace nemá efekt na biologickou aktivitu, jelikož jsme nezaznamenali žádný signifikantní rozdíl. Porovnání množství *stx2a*, cytotoxických titrů, a specifické aktivity Stx2a mezi kmeny Late a Early nEC neodhalilo rozdílnost mezi danými liniemi.

Nicméně platí, že jak cytotoxicita, tak i specifická aktivita byla vyšší u kmenů ST29 nEC, než u *stx2a* produkujících kmenů ST21 ($p < 0,01$) (obrázek 17).



Obrázek 17 Stx2a produkce u nEC kmenů. Tabulka znázorňuje množství Stx2a, cytotoxické titry a specifickou aktivitu Stx2a produkovanými EHEC O26 ST29 late nEC klony s různými stx2a-konvertujícími profágy, ST29 early nEC a ST21 Stx2a produkujícími kmeny. Data jsou průměrem čtyř měření. * $p < 0,01$ je pro porovnání mezi ST21 a ST29 kmeny.

6. DISKUSE

HUS představuje závažné onemocnění dětského věku. Od prvního popisu této choroby před bezmála 70 lety jsme díky porozumění patofyziologii a pokrokům v diagnostice schopni rozeznat podle etiologie řadu podtypů. Rozlišení jednotlivých forem je velmi důležité pro léčebný přístup k pacientovi (Loirat et al. 2016). Zatímco moderní terapie přispěla k významnému zlepšení prognózy dětí s atypickou formou HUS podáním blokátoru komplementu eculizumab, u dětí se STEC-HUS se lék kauzálně ovlivňující průběh onemocnění stále neobjevil. Recentní studie poukazují na roli alternativní cesty taky v patogenezi STEC-HUS (Noris et al. 2012; Conway 2015; Orth et al. ; Zoja et al. 2017). Intenzita aktivace komplementového systému tak může ovlivnit klinický průběh onemocnění.

Také porozumění rizikovým faktorům na straně STEC způsobující STEC-HUS, může napomoci identifikovat děti s rizikem komplikovaného průběhu choroby. STEC O26:H11/H- jsou nejčastějším sérotypem non-O157 STEC, který celosvětově způsobuje průjemové onemocnění a hemolyticko uremický syndrom (HUS). „Nový evropský klon“ (nEC) je vysoce virulentní ST29 klon O26, který nese jen *stx_{2a}* a rapidně se rozšířil do Evropy v devadesátých letech minulého století. Ačkoliv je EHEC O26 nejčastějším etiologickým agens u dětí s HUS v České republice, nebyla doposud provedena bližší analýza jeho klonální struktury.

Naše výsledky studie „**Retrospektivní studie STEC-HUS u dětských pacientů v České republice**“ potvrdily, že STEC sérotyp O26:H11 se významně uplatňuje jako původce typického HUS v České republice a je nejčastějším vyvolavatelem daného onemocnění. Na druhém místě byl celosvětově nejrozšířenější sérotyp O157:H7. Podobné výsledky byly popsány i jinde ve světě (Karch et al. 2005; Luna-Gierke et al. 2014; Bibbal et al. 2015), stejně jako sezonní výskyt HUS zejména v letních měsících (Bruyand et al. 2018). U všech kmenů O26:H11 byla prokázána produkce Stx₂, tedy toxinu, který je spojený s vyšší virulencí STEC a je prediktorem závažného průběhu onemocnění a progresu infekce v HUS (Bielaszewska et al. 2013). Proto jsme také předpokládali, že onemocnění kmenem O26 bude spojeno s vyšší morbiditou a mortalitou. Porovnání průběhů HUS způsobených různými sérotypy STEC však nepřineslo signifikantní rozdíly v laboratorních hodnotách, klinickém průběhu infekce a vyšším riziku úmrtí. Absence statisticky významného rozdílu může být dána malým

počtem pacientů, k průkazu rozdílné patogenicity různých kmenů STEC jsou potřebné další studie.

Námi získaná data v retrospektivní studii se velmi neliší od dat publikovaných v literatuře. HUS nejčastěji postihoval děti do 3 let věku, u téměř 2/3 případů nutná dialyzační léčba (n=37, 63,8 %). U 25,5 % pacientů se rozvinuly neurologické komplikace, které byly taky nejčastější příčinou úmrtí během akutní fáze HUS (4/5). Smrtnost však byla vyšší, než uvádí dostupné publikace, a to 8,62 % (5/58) místo 3-5 % (Gould et al. 2009; Tarr et al. 2005). Jako důvod se nabízí fakt, že kohortu pacientů naší studie tvořily děti s horším průběhem hospitalizované ve třech dětských dialyzačních centrech. Lehčí průběhy HUS mohly být hospitalizované na jiných dětských pracovištích, a tím pádem nebyly součástí souboru pacientů.

Naše studie má několik limitací. Kromě retrospektivního charakteru studie je to malá kohorta pacientů, která obsahuje data pacientů hospitalizovaných ve třech dětských dialyzačních centrech v České republice. Další limitací bylo zjištění, že u téměř 40 % vzorků stolic pacientů s HUS nebyl STEC kmen zachycen, což může být zavádějící při diagnostice STEC-HUS. Daný procentuální záchyt STEC však uvádějí i jiné recentní studie (Bruyand et al. 2018). Naše studie zachycuje 17leté období (od roku 1995), kdy v dané době ještě nebyla možná genetická analýza pro aHUS, proto testování na aHUS bylo provedeno jen u malé části pacientů. Důležité je však podotknout, že žádný pacient neměl v dalším sledování relaps HUS, a rovněž neměl pozitivní rodinnou anamnézu. Proto nepředpokládáme, že by se mohlo u daných téměř 40 % pacientů jednat o atypickou formu HUS. I přes dané limitace věříme, že naše studie navazuje na předešlé mikrobiologické studie *E. coli* publikované doc. Bielaszewskou a Ing. Marejkovou ze SZÚ, klinické studie doc. Bláhové a prof. Jandy, a přispěla tak k celkové charakteristice STEC-HUS u dětí v České republice.

Cílem naší studie „**Aktivace komplementu je asociována s těžším průběhem STEC-HUS**“ byla korelace koncentrace C3 složky komplementu jako markeru aktivace komplementu u pacientů se STEC-HUS s jeho klinickým průběhem onemocnění. Naše studie ukazuje, že pacienti se STEC-HUS s koncentrací C3 pod 0,825 g/l v době přijetí k hospitalizaci (a tudíž iniciální fázi onemocnění), mají signifikantně vyšší riziko potřeby zahájení dialýzy a též vyšší riziko rozvoje extrarenálních komplikací. Koncentrace C3 se ukázala jako nezávislý prediktor délky trvání dialýzy. Vzhledem k danému zjištění můžeme předpokládat, že aktivace komplementu může být asociována s těžším průběhem HUS u dětských pacientů.

Asociaci mezi hypokomplementémií a závažnějším průběhem HUS popsal Robson et al., který pozoroval u dětí s leukocytózou a nízkou koncentrací C3 delší dobu trvání hospitalizace (Robson et al. 1992). Thurman et al. ve své práci pozorovali aktivaci alternativní cesty komplementu u pacientů s typickým HUS. Zjistili, že markery aktivace komplementu, a to plazmatická koncentrace Bb a sérový MAC complex (SC5b-9), se zvyšují během akutní fáze a poté se navracejí k normálním koncentracím během měsíce od ukončení hospitalizace (Thurman et al. 2009). Narozdíl od naší studie, aktivace komplementu nekorelovala s výskytem extrarenálních komplikací ani s délkou dialýzy. Výsledkem studie Ferraris et al. bylo zjištění, že pacienti s typickým HUS měli vyšší koncentrace SC5b-9 a v porovnání s kontrolní kohortou byla u non-oligurických pacientů nalezena vyšší koncentrace C3 a C4 složky komplementu (Ferraris et al. 2015). Tyto výsledky jsou v souladu s naší studií, která předpokládá, že aktivace komplementu může zhoršit renální a extrarenální poškození u pacientů s typickým HUS.

Ačkoliv je mortalita u dětí se STEC-HUS nízká (pod 5 %), 50-60 % dětí vyžaduje zahájení dialýzy a 25 % pacientů má dlouhodobé následky v podobě renálního poškození po akutní epizodě HUS. Předchozí studie identifikovaly několik rizikových faktorů, které predikují potřebu zahájení dialýzy a horší průběh onemocnění u pacientů se STEC-HUS. Oaks a kol. prokázali to, že kombinace oligoanurie, dehydratace, leukocytózy nad $20 \times 10^9/l$ a hematokritu nad 23 % byla spojena se závažnějším průběhem onemocnění (Oakes 2006); Oakes et al. 2008). Jako další prediktor potřeby dialýzy u dětí s HUS se uvádí vyšší iniciační koncentrace kreatininu (Balestracci et al. 2018). Naše studie prokázala, že nízká koncentrace C3 při přijetí k hospitalizaci je asociována se závažnějším stupněm akutního poškození ledvin (hodnoceno podle iniciační a minimální eGFR) a s větší potřebou dialýzy. Dané zjištění je nové a doposud nebylo publikované v žádném literárním zdroji.

Nejčastější příčinou úmrtí u dětí se STEC-HUS je postižení centrálního nervového systému (Siegler 1994; Oakes et al. 2008). Příčinou může být metabolický rozvrat s následným edémem mozku (hyponatrémie, disekvilibrační syndrom), hypertenze, lokální mikroangiopatie, nebo lokální toxický efekt Stx. Také v naší studii byla neurologická komplikace nejčastější příčinou úmrtí během akutní fáze onemocnění a u obou případů byla koncentrace C3 při přijetí nižší než 0,825 g/l (0,6 a 0,66 g/l). Jelikož nízká koncentrace C3 složky komplementu byla v naší studii asociována s častějšími komplikacemi, předpokládáme, že tito pacienti budou vyžadovat pečlivější monitoraci neurologického stavu během akutní fáze onemocnění.

Během posledních let je diskutována terapeutická úloha eculizumabu, jakožto inhibitoru komplementu u závažných případů STEC-HUS. Na základě našich výsledků se domníváme, že časná blokáda komplementu může ovlivnit akutní fázi HUS. K potvrzení této hypotézy musíme vyčkat na výsledky randomizovaných kontrolovaných studií u dětí, které v současné době probíhají (Velká Británie, Francie).

Naše studie má několik limitací. Je limitována retrospektivními údaji a malou kohortou pacientů. Koncentrace C3 se však jeví jako silný prediktor i v takto malé skupině pacientů s málo běžným onemocněním.

Cílem naší poslední studie „**Charakteristika dvou příbuzných kmenových linií enterohemoragické *Escherichiae coli* O26 pomocí celogenomové sekvenace**“ bylo analyzovat fylogenetické vztahy a klonální strukturu EHEC O26 izolovaných od pacientů v České republice pomocí celogenomového sekvenování (WGS) se zaměřením na ST29 kmeny. Pro globální srovnání jsme genové sekvence českých O26 izolátů porovnali s izoláty O26 z dalších evropských zemí a s genomy *E. coli* O26 přítomnými v GenBanku.

Využitím celogenomové na SNP založené analýzy jsme dokázali, že nEC *E. coli* O26, který se poprvé objevil v Německu během devadesátých let (Bielaszewska et al. 2013) není homogenní, ale fylogeneticky se rozdělil na dvě odlišné linie. Tato skutečnost potvrzuje závěry předešlých studií, které tvrdí, že *E. coli* O26:H11 jsou z evolučního pohledu vysoce dynamickým klonem s potenciálem vzniku nových virulentnějších klonů (Ishijima et al. 2017; Bielaszewska et al. 2013; Delannoy et al. 2015). V současné době jsou obě linie nEC široce distribuované v Evropě a byly izolovány také v Japonsku (obrázek 14), což zdůrazňuje, že kmeny nEC jsou schopné rychlého šíření se mezi kontinenty. Vzhledem k četným genetickým odlišnostem EnEC a LnEC je pravděpodobné, že k jejich expanzi došlo nezávisle. Ačkoli nejčastější cesty šíření EHEC jsou hospodářskými zvířaty a/ nebo potravinami, *E. coli* O26 odpovídající nEC byly jen zřídka izolovány od skotu a jiných zvířat (Zweifel et al. 2013, Allerberger et al. 2003). Kvůli rostoucí frekvenci LnEC kmenů nEC v některých evropských zemích během posledních let jako příčiny lidských onemocnění (obrázek 15) je obzvláště důležité zjištění způsobů přenosu daného infekčního agens.

Naše analýza *stx2a*-konvertujících profágů u nEC klonů identifikovala převládající typ profága (obrázek 16) (označeného jako typ I), který obsahuje téměř kompletní sekvenci identickou s *stx2a*-konvertujícím profágem kmenu EHEC O104:H4 kmenu, který v roce 2011 způsobil epidemii HUS v Německu (Mellman et al. 2011). Na základě dostupných bibliografických údajů vznik EHEC O26 nEC v 90. letech

(Bielaszewska et al. 2013; Zhang et al. 2000) předchází izolaci EHEC O104: H4 produkujícího Stx2a, který byl poprvé izolován v roce 2001 (Mellman et al. 2008).

V naší studii jsme zjistili, že čtyři kmeny Late nEC nesly *stx2a*-konvertujícího fága, jehož sekvence je tvořena dvěma regiony, které jsou vysoce homologní s *stx2a*-fágy EHEC O104:H4 a EHEC O157:H7 (označen jako typ II). Přítomnost dvou vysoce homologních segmentů s profágy O104:H4 a O157:H7 předpokládá roli rekombinace v evoluci profága typu II a spíše horizontální než vertikální vzor převodu profágů typu II v populaci *E. coli* O26.

Dále jsme identifikovali novou a doposud nepopsanou mutaci Stx2a, který je kódovaný profágy typu II a obsahuje změnu aminokyselin (A273 → T273). Lokalizace mutace naznačuje možnou souvislost s vyzríváním Stx2a, protože se nachází v místě uvolnění Stx od Golgiho proteázy furin (Garred et al. 1995, Fagerquist et al. 2010). Tato mutace neovlivňuje účinnost toxinu, jak bylo prokázáno specifickou aktivitou na Vero buňky Vero. Toxicita Stx2a byla podobná jako u kmenů nesoucích profágy typu I (obrázek 17). Biologické účinky vyvolané touto mutací Stx2a je nutné ještě objasnit na větším počtu kmenů.

Analýzou paralelní evoluce missense synapomorfních mutací (které ovlivňují funkci kódovaných proteinů) byly u Late nEC identifikovány 3 mutace ve fimbriálních proteinech, které mohou mít vliv na perzistenci Late nEC u savců, a tím pádem mohou mít vliv na patogenezi onemocnění u člověka. Jako efektivní metoda k rozlišení etiologie EHEC O26 infekce u pacientů se jeví vyšetření PCR k průkazu *sen/ent*, kterou jsme navrhli v naší studii v kombinaci s plasmidovým profilováním kmenů k identifikaci Early a Late kmenů nEC. Dané metody mohou být užitečným a jednoduchým nástrojem pro identifikaci kmenů LnEC a EnEC a mohou sloužit ke kontrole šíření těchto patogenů u skotu a jiných zvířat.

I když kmeny STEC nepatří v České republice mezi nejčastější bakteriální vyvolavatele průjmového onemocnění, představují tyto infekce závažný zdravotnický problém a je potřeba jim věnovat zvýšenou pozornost v primární péči. Kromě toho, že jsou schopny vyvolat rozsáhlé epidemie, mohou být původci nejen průjmových onemocnění, ale i život ohrožujícího hemolyticko-uremického syndromu. Vzhledem k tomu, že se jedná o závažné a rychle se vyvíjející onemocnění, je nutná centralizace péče o pacienty se známkami TMA (hemolytická anémie, trombocytopenie, známky ischemického poškození orgánů) na specializovaných dětských pracovištích.

7. ZÁVĚR

HUS vyvolaný Shiga-toxin produkujícími *E. coli* je jednou z nejčastějších příčin akutního poškození ledvin v dětském věku. Nadále se ve své praxi bohužel setkáváme s fulminantními průběhy STEC-HUS s fatálními extrarenálními komplikacemi, které nejsme schopni léčebně ovlivnit. Hlavní patofyziologické faktory vedoucí k rozvoji těžkého průběhu STEC-HUS jsou stále neznámé a můžou být jak na straně hostitele, tak na straně STEC.

První studie navazuje na práce paní doc. Bláhové, doc. Bielaszevské a ing. Marejkové a doplňuje tak celkový přehled STEC-HUS u dětí v České republice. Naše výsledky ukázaly, že STEC sérotyp O26:H11 se významně uplatňuje jako původce STEC-HUS v České republice a je nejčastějším vyvolavatelem daného onemocnění. U všech kmenů O26:H11 byla prokázána produkce Stx2, tedy toxinu, který je spojený s vyšší virulencí STEC a je prediktorem závažného průběhu onemocnění a progresu infekce v HUS. Porovnání průběhů HUS způsobených různými sérotypy STEC však nepřineslo signifikantní rozdíly v laboratorních hodnotách, klinickém průběhu infekce a vyšším riziku úmrtí a k danému zhodnocení rozličné virulence STEC bude potřeba dalších studií.

Výsledky naší pilotní studie zabývající se alternativní cestou komplementu u STEC-HUS potvrdily asociaci koncentrace C3 složky komplementu jako markeru aktivace komplementu se závažností průběhu HUS. Ukazuje, že pacienti s koncentrací C3 pod 0,825 g/l v iniciační fázi onemocnění, mají signifikantně vyšší riziko potřeby zahájení dialýzy a rozvoje extrarenálních komplikací. Navíc se koncentrace C3 komplementu ukázala jako nezávislý prediktor délky trvání dialýzy. Vzhledem k danému zjištění lze předpokládat, že aktivace komplementu může být asociována s těžším průběhem HUS u dětských pacientů. Stanovení mezní hodnoty C3 je zásadní pro identifikaci dětí s rizikem těžšího průběhu nemoci. Na základě nejen našich výsledků lze předpokládat, že by terapeutické ovlivnění komplementu mohlo mít vliv na průběh onemocnění. Naše závěry jsou podkladem pro další studie zabývající se vztahem komplementu k patogenezi HUS.

Dalším cílem naší práce bylo porozumět vlastnostem jednotlivých STEC O26 klonů schopných vyvolat HUS. Genetická analýza nám umožnila sledovat evoluci i geografické šíření těchto klonů poukazuje na skutečnost, že nEC EHEC O26:H11/H-, který se objevil v Evropě od devadesátých let minulého století není homogenní, ale

rozdělil se na dva vzdálené klony, které jsme nazvali jako Early (EnEC) a Late new Clone (LnEC). Missence mutace A273 → T273 v Stx2a u 4 kmenů LnEC nesoucích profága typu II, kterou jsme našli je doposud nepopsanou mutací v katalytické podjednotce Stx2. Porovnání množství *stx2a*, cytotoxických titrů a specifické aktivity Stx2a pomocí Vero-assay mezi kmeny Late a Early nEC neodhalilo rozdílnost mezi danými liniemi a daná mutace nemá efekt na biologickou aktivitu Stx2. PCR metoda navržená v naší studii cílená na mutaci v *sen/ent* genu, který je charakteristický pro Late nEC, představuje rychlou a jednoduchou metodu k rozlišení Early a Late nEC v klinických mikrobiologických laboratořích.

Věříme, že naše výsledky přispěly k poznání patogeneze HUS, a že se jejich poselství uplatní v klinické péči o děti s tímto onemocněním.

8. SOUHRN

Hlavní faktory vedoucí k rozvoji těžkého průběhu STEC-HUS u dětí jsou stále neznámé. Mohou být jak na straně hostitele, tak na straně patogena.

V rámci této disertační práce jsem se zabývala faktory vedoucími k rozvoji těžkého průběhu onemocnění u dětských pacientů se STEC-HUS. Na straně hostitele jsme se zaměřili na aktivaci alternativní cesty komplementu, jelikož je v posledních letech u pacientů s typickým HUS diskutována účinnost léčby C5-monoklonální protilátkou eculizumab. Na straně patogena jsme se zaměřili na hledání nových faktorů virulence u *E. coli* O26:H11/H, která je nejčastější příčinou vzniku STEC-HUS v České republice.

Ve Studii 1: Retrospektivní analýza průběhů STEC-HUS u dětských pacientů v České republice, jsme zpracovali klinická, mikrobiologická a epidemiologická data pacientů se STEC-HUS hospitalizovaných na dětských odděleních v České republice v letech od 1999 až 2015. Námi získaná data v retrospektivní studii se nelišila od dat publikovaných v literatuře. HUS nejčastěji postihoval děti do 3 let věku, u téměř 2/3 případů s nutností dialýzy (n=37, 63,8 %). Smrtnost byla vyšší než uvádí dostupné publikace, a to 8,62 % (5/58) místo 3-5 %.

Nejčastějším původcem STEC-HUS byl STEC sérotyp O26:H11. U všech kmenů O26:H11 byla prokázána produkce Stx2, tedy toxinu, který je spojený s vyšší virulencí STEC, a který je prediktorem závažného průběhu onemocnění a progresu infekce v HUS. Porovnání průběhů HUS způsobených různými sérotypy STEC však nepřineslo signifikantní rozdíly v laboratorních hodnotách, klinickém průběhu infekce ani vyšším riziku úmrtí.

Ve studii 2: Aktivace komplementu je asociována s těžším průběhem STEC-HUS, jsme se zaměřili na možný vztah mezi aktivací alternativní cesty komplementu a závažností průběhu HUS.

Provedli jsme retrospektivní studii pacientů se STEC-HUS hospitalizovaných ve 3 dětských dialyzačních centrech (FN Motol, FN Brno, FN Ostrava) v letech 1999 až 2015. Během 17letého období jsme identifikovali 33 pacientů s typickým HUS, u kterých byla v době přijetí vyšetřena koncentrace C3 složky komplementu. Byla nalezena silná korelace mezi koncentrací C3 složky komplementu a délkou dialýzy (p= 0,005). Současně

jsme našli signifikantní rozdíl v koncentraci C3 mezi skupinami pacientů, u kterých bylo/nebylo nutné zahájení dialýzy ($p=0,001$). Stanovili jsme také mezní hodnotu cut-off pro C3 složku komplementu. Hodnoty C3 pod touto koncentrací nám predikují potřebu zahájení dialýzy se 100 % specificitou a 75 % senzitivitou (AUC 0,903). Pacienti se sníženou koncentrací C3 pod 0,825 g/l měli významně více extrarenálních komplikací ($p=0,02$), vyšší hladinu LDH ($p=0,04$) a doba hospitalizace byla významně delší ($p=0,015$). Nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl ve věku pacientů a laboratorních výsledcích (kreatinin, hemoglobin, trombocyty) mezi porovnávanými skupinami (C3 pod vs. nad 0,825 g/l).

Naše výsledky ukazují, že aktivace komplementu je spojena se závažnějším průběhem STEC-HUS a snížená koncentrace C3 složky pod 0,825 g/l byla spojena s nutností dialyzační léčby a vyšším výskytem extrarenálních komplikací. Aktivace komplementu by mohla být tudíž dalším prognostickým faktorem nepříznivého průběhu STEC-HUS.

Ve studii 3: Charakteristika dvou příbuzných kmenových linií Enterohemoragické *Escherichiae coli* O26 pomocí celogenomové sekvenace, jsme se zaměřili na detailní analýzu uchovaných kmenů EHEC O26 od pacientů s různým klinickým průběhem typického HUS z České republiky, Německa, Rakouska a Itálie.

Hlavní metodou bylo celogenomové sekvenování (WGS) 32 kmenů (16 kmenů z ČR a 16 z dalších evropských zemí) formou shotgun sequencing použitím Illumina sekvenátoru. Získaná data jsme následně porovnali a zanalyzovali s genomy dostupnými v GenBanku. Analýzu 159 kmenů STEC O26 jsme provedli softwarem Geneious: 95 kmenů patřilo do sérovaru ST21, 64 kmenů bylo sérovaru ST29. Z dané skupiny ST29, 41 kmenů *E. coli* patřilo do tzv. New European clone O26 (nEC), který popsala v roce 2013 Bielaszewska a spol., a pro které je typický určitý plazmidový profil, produkce Stx2 a byl asociován s vyšším výskytem HUS u infikovaných pacientů. NGS analýzou jsme zjistili, že nEC se fylogeneticky dělí na 2 skupiny, které jsme nazvali jako Early (EnEC) a Late New Clone (LnEC). Námi nově identifikovaný a dosud nepopsaný LnEC (27 kmenů) se liší od nEC 70 SNP, třemi missence mutacemi ve fimbriálních proteinech, mutací v genu *sen/ent* (daný gen kóduje *Shigella flexneri* enterotoxin 2), a u 4 kmenů také přítomností profága typu II. Daný klon produkuje pouze Stx2 a u 4 kmenů jsme našli doposud nepopsanou mutaci v katalytické podjednotce Stx2. Pomocí Vero-assay jsme

následně porovnali virulenci 33 kmenů nEC, daná mutace v Stx2 však nebyla více patogenní.

Studie 2 a 3 byly publikovány v časopisech s impact factorem.

SUMMARY

The main factors leading to the development of a severe course of typical HUS (D + HUS, STEC-HUS) in children are still unknown. They can be both on the host and on the pathogen side. In this dissertation I dealt with the factors leading to the development of severe disease in pediatric patients with typical HUS (STEC-HUS). On one hand, it was activation of the alternative complement pathway in patients with typical HUS and on the other hand we focused on finding new virulence factors in EHEC O26:H11/H, as the most common cause of typical HUS in Czech Republic and most isolates carry genes encoding Stx2, which is a predictor of a more severe course of infection and progression of HUS development.

In Study 1: Retrospective analysis of typical HUS in pediatric patient in the Czech republic, we processed clinical, microbiological and epidemiological data of patients with typical HUS hospitalized in pediatric departments in Czech republic in period between 1999 to 2015. The data obtained in our study were similar to data published in the literature. HUS occurred mostly in children under 3 years of age, almost 2/3 of cases required dialysis (n= 37, 63,8 %). Mortality was higher than reported in literature, at 8,62 % (5/58) instead of 3-5 %. The most common serotype isolated in HUS cases was STEC O26:H11. All O26:H11 strains produced Stx2, which is associated with higher virulence and is a predictor of severe disease and progression in HUS. However, comparison of HUS caused by different STEC serotypes did not reveal significant differences in laboratory values, clinical courses and higher risk of death.

In Study 2: Complement activation is associated with a more severe course of a typical form of HUS, we observed a clinical data (hematological, immunological and biochemical laboratory parameters) on the host side. We focused on the activation of the alternative complement pathway, if it is associated with a more severe course of disease.

Therefore we performed a retrospective study of patients with typical HUS admitted to 3 pediatric dialysis centres in Czech republic between 1999 and 2015 (Prague, Brno, Ostrava). During a 16-year period we identified 33 patients with typical HUS with tested C3 level at admission to hospital.

A strong correlation was found between the C3 level and the length of dialysis ($p=0,005$). At the same time, we found a significant difference in C3 level in patients with and without dialysis ($p=0,001$). With a cut-off of C3 0,825 g/l selected, values below this level predict the initiation of dialysis with 100 % specificity and 75 % sensitivity (AUC 0,903). Patients with reduced C3 levels below 0,825 g/l had significantly more extrarenal complications ($p=0,02$), higher LDH levels ($p=0,04$) and were hospitalized for a significantly longer period ($p=0,015$).

Thus our results show that complement activation is associated with a more severe course of typical HUS and a reduced level of C3 below 0,825 g/l was associated with the need for dialysis and a higher incidence of extrarenal complications. Therefore complement activation could be another negative prognostic factor for the adverse course of a typical HUS.

In Study 3: Characterisation of two related strain lines of Enterohemorrhagic E.coli O26 using whole genome sequencing, on the pathogen side, we focused on a detailed analysis of EHEC O26 strains from various clinical courses mainly in the Czech republic.

The main method was whole genome sequencing (WGS) of 32 strains (16 strains from CR and 16 from other European countries) by shotgun sequencing using the Illumina sequencer. The obtained data were then compared with genomes available in Genbank. In the end we analyzed 159 EHEC O26 with Geneious software: 95 strains belonged to ST21, 64 were ST29. 41 strains from ST29 serovar belonged to the group of New European clone EHECO26 (nEC), which was firstly reported in 2013 by Bielaszewska et al. and was characterized by a certain plasmid profile as well as Stx2 production and was associated with a higher incidence of HUS in infected patients. Our NGS analysis showed that NEC is phylogenetically divided into two groups, which we called Early (ENC) and Late new clone (LNC). The newly identified and yet not described LNC (27 strains) differs from ENC with 2 missense mutations in virulence factors for enterotoxin Sen/Ent and T3SS effector, as well as by the presence of profage. LNC produces only Stx2 and in four strains we find new mutation in the catalytic subunit of Stx2. Using Vero-assay we

compared the virulence of 33 EHEC strains, but the mutation in Stx2 was no more pathogenic.

9. SEZNAM LITERATURY

- 1) Akcan-Arikan A. et al., 2007. Modified RIFLE criteria in critically ill children with acute kidney injury. *Kidney International*; 71(10): 1028–1035.
- 2) Allerberger F. et al., 2003. Hemolytic-uremic syndrome associated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H infection and consumption of unpasteurized cow's milk. *Int J Infect Dis*; 7(1):42–5.
- 3) Ardissino G. et al., 2016. Early Volume Expansion and Outcomes of Hemolytic Uremic Syndrome. *Pediatrics*; 137(1): e20152153-.
- 4) Arvidsson I. et al., 2015. Shiga Toxin–Induced Complement-Mediated Hemolysis and Release of Complement-Coated Red Blood Cell–Derived Microvesicles in Hemolytic Uremic Syndrome. *The Journal of Immunology*; 194(5): 2309–2318.
- 5) Balestracci A. et al., 2014. Laboratory predictors of acute dialysis in hemolytic uremic syndrome. *Pediatrics International*; 56(2): 234–239.
- 6) Balestracci A. et al., 2017. Blood urea nitrogen to serum creatinine ratio as a prognostic factor in diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: a validation study. *European Journal of Pediatrics*; 177(1): 63–68.
- 7) Bell B. P. et al., 1994. A Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7—Associated Bloody Diarrhea and Hemolytic Uremic Syndrome From Hamburgers: The Washington Experience. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*; 272(17): 1349–1353.
- 8) Besser R. E., 1993. An Outbreak of Diarrhea and Hemolytic Uremic Syndrome From *Escherichia coli* O157:H7 in Fresh-Pressed Apple Cider. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*; 269(17): 2217–2220.
- 9) Bibbal D. et al., 2015. Prevalence of carriage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 among slaughtered adult cattle in France. *Appl Environ Microbiol*; 81(4):1397-405.
- 10) Bielaszewska M. et al., 2013. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H-: A New virulent clone emerges in Europe. *Clinical Infectious Diseases*; 56(10): 1373–1381.
- 11) Bielaszewska M. et al., 2011. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: A microbiological study. *The Lancet Infectious Diseases*; 11(9): 671–676.

- 12) Bielaszewska M., Janda J., 1989. Microbiological aspects of infection with verotoxin-producing E.coli strains in children with the hemolytic-uremic syndrome. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol*; 38(4): 237–244.16.
- 13) Bielaszewska M. et al., 1996. Verocytotoxin-producing Escherichia coli in children with hemolytic uremic syndrome in the Czech Republic. *Clin Nephrol*; 46(1):42-44.
- 14) Bielaszewska M. et al., 1997. Human Escherichia coli O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidemiol Infect*; 119 (3): 299–305.19.
- 15) Bitzan M. et al., 2009. Safety and pharmacokinetics of chimeric anti-shiga toxin 1 and anti-shiga toxin 2 monoclonal antibodies in healthy volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 53(7): 3081–3087.
- 16) Bitzan M. et al., 2010. Treatment of typical (enteropathic) hemolytic uremic syndrome. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*; 36(06): 594–610.
- 17) Bláhová K. et al., 2002. Long-term follow-up of Czech children with D+ hemolytic-uremic syndrome. *Pediatric Nephrology*; 17(6): 400–403.
- 18) Bletz S. et al., 2013. Evolution of Enterohemorrhagic Escherichia coli O26 based on single-nucleotide polymorphisms. *Genome Biology and Evolution*; 5 (10): 1807–1816.
- 19) Brigotti M. et al., 2011. Clinical Relevance of Shiga Toxin Concentrations in the Blood of Patients With Hemolytic Uremic Syndrome. *The pediatric Infectious Disease Journal*; 30(6): 486–490.
- 20) Bruyand M. et al., 2019. Réseau français hospitalier de surveillance du SHU pédiatrique. Paediatric haemolytic uraemic syndrome related to Shiga toxin-producing Escherichia coli, an overview of 10 years of surveillance in France, 2007 to 2016. *Euro Surveill.*;24(8):pii=1800068
- 21) Byrne L. et al., 2015. The epidemiology, microbiology and clinical impact of Shiga toxin-producing Escherichia coli in England, 2009-2012. *Epidemiology and Infection*; 143(16): 3475–3487.
- 22) Clayton F. et al., 2005. Lipopolysaccharide upregulates renal Shiga toxin receptors in a primate model of hemolytic uremic syndrome. *American Journal of Nephrology*; 25(6): 536–540.
- 23) Conway E.M., 2015. HUS and the case for complement. *Blood*;126(18):2085-90.
- 24) Delannoy S. et al., 2015. Characteristics of emerging human-pathogenic escherichia coli

- O26: H11 strains isolated in France between 2010 and 2013 and carrying the stx2d gene only. *Journal of Clinical Microbiology*; 53(2): 486–492.
- 25) Delannoy S. et al., 2015. Draft Genome Sequences of Human-Pathogenic Escherichia coli O26: H11 Strains Carrying the stx 2 Gene Only and Circulating in France. *Genome announcements*; 3(4): 3–4.
 - 26) Delannoy S. et al., 2017. The mobilome; A major contributor to Escherichia coli stx2-Positive O26: H11 strains intra-serotype diversity. *Frontiers in Microbiology*; 8: 1–17.
 - 27) Dettmar A. K. et al., 2014. Protection of human podocytes from shiga toxin 2-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and apoptosis by human serum amyloid P component. *Infection and Immunity*; 82(5): 1872–1879.
 - 28) Dundas S. et al., 1999. Effectiveness of therapeutic plasma exchange in the 1996 Lanarkshire Escherichia coli O157:H7 outbreak. *Lancet*; 354(9187): 1327–1330.
 - 29) Ehrlenbach S. et al., 2013. Shiga Toxin 2 Reduces Complement Inhibitor CD59 Expression on Human Renal Tubular Epithelial and Glomerular Endothelial Cells. *Infect Immun*; 81(8): 2678–2685.
 - 30) Elliott E. J., 2001. Nationwide study of haemolytic uraemic syndrome: Clinical, microbiological, and epidemiological features. *Archives of Disease in Childhood*; 85(2): 125–131.
 - 31) Endo Y. et al., 1988. Site of action of a Vero toxin (VT2) from Escherichia coli O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes: RNA N-glycosidase activity of the toxins. *European Journal of Biochemistry*; 171(1-2): 45–50.
 - 32) Fakhouri F. et al., 2017. Haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet*; 390(10095): 681–696.
 - 33) Fagerquist C. K., Sultan O., 2010. Top-down proteomic identification of furin-cleaved α -subunit of Shiga toxin 2 from Escherichia coli O157:H7 using MALDI-TOFTOF-MS/MS. *J Biomed Biotechnol*;2010:123460
 - 34) Ferraris J. R. et al., 2015. Activation of the alternative pathway of complement during the acute phase of typical haemolytic uraemic syndrome. *Clinical and Experimental Immunology*; 181(1): 118–125.
 - 35) Flynn J. T., Falkner B. E., 2017. New clinical practice guideline for the management of high blood pressure in children and adolescents. *Hypertension*; 70(4): 683–686.
 - 36) Frank C. et al., 2011. Epidemic Profile of Shiga-Toxin–Producing Escherichiae coli

- O104:H4 outbreak in Germany. *New England Journal of Medicine*; 365(19): 1771–1780.
- 37) Frankel G., Phillips A. D., 2008. Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: Getting off the pedestal. *Cellular Microbiology*; 10(3): 549–556.
 - 38) Garg A. X. et al., 2003. Long-term Renal Prognosis of. *Jama*; 290(10): 1360–1370.
 - 39) Garred O. et al., 1995. Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J Biol Chem*; 270(18):10817–21.
 - 40) Gasser C. et al., 1955. Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia [in German]. *Schweiz Med Wochenschr.*; 85(38-39):905-909.
 - 41) Gerber A. et al., 2002. Clinical course and the role of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: A prospective study. *J. Infect. Dis*; 186(4): 493–500.
 - 42) Gitiaux C. et al., 2013. Brain magnetic resonance imaging pattern and outcome in children with haemolytic-uraemic syndrome and neurological impairment treated with eculizumab. *Dev Med Child Neurol*; 55: 758–765.
 - 43) Gould L.H. et al., 2009. Hemolytic uremic syndrome and death in persons with *Escherichia coli* O157:H7 infection, foodborne diseases active surveillance network sites, 2000-2006. *Clin Infect Dis*; 49:1480-1485.
 - 44) Hattori R. et al., 1989. Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. *J Biol Chem*; 264(15):9053-9060.
 - 45) Hickey C. A. et al., 2011. Early volume expansion during diarrhea and relative nephroprotection during subsequent hemolytic uremic syndrome. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*; 165: 884–889.
 - 46) Ishijima N. et al., 2017. Identification of a new virulent clade in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H- Sequence Type 29. *Scientific Reports*; 7(1): 1–10.
 - 47) Johnson K. E. et al., 2006. The Emerging Clinical Importance of Non-0157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Clinical Infectious Disease*; 43(12): 1587–1595.
 - 48) Karch H. et al., 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *International Journal of Medical Microbiology.*; 295(6-7): 405–418.

- 49) Karmali M.A. et al., 1983. Sporadic Cases of Haemolytic-Uraemic Syndrome Associated With Faecal Cytotoxin and Cytotoxin-Producing Escherichia Coli in Stools. *The Lancet*; 321(8325): 619–620.
- 50) Karpman D., 2002. Haemolytic uraemic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Current Paediatrics*; 12(7): 569–574.
- 51) Kearse M. et al., 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*; 28(12): 1647–1649.
- 52) Kemper M. J., 2011. Outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by E. coli O104:H4 in Germany: A pediatric perspective. *Pediatric Nephrology*; 27(2):161-164.
- 53) Kielstein J. T. et al., 2012. Best supportive care and therapeutic plasma exchange with or without eculizumab in Shiga-toxin-producing E. coli O104:H4 induced haemolytic-uraemic syndrome: an analysis of the German STEC-HUS registry. *Nephrol Dial Transplant*; 27(10): 3807–3815.
- 54) Kim D.D., Song W.C., 2006. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol*;118(2-3): 127-136.
- 55) Koster F.T. et al., 1984. Renal histopathology in the hemolytic-uremic syndrome following shigellosis. *Clin Nephrol*;21(2):126-133.
- 56) Lapeyraque A. et al., 2011. Eculizumab in Severe Shiga-Toxin – Associated HUS. *The New England Journal of Medicine*; 364(26):2561–2563.
- 57) Legendre C. M. et al., 2013. Terminal complement inhibitor eculizumab in atypical hemolytic-uremic syndrome. *New England Journal of Medicine*; 368(23): 2169–2181.
- 58) Lo N. C. et al., 2013. Interaction of shiga toxin with the a-domains and multimers of von Willebrand Factor. *Journal of Biological Chemistry*; 288(46): 33118–33123.
- 59) Locatelli M. et al., 2014. Shiga Toxin Promotes Podocyte Injury in Experimental Hemolytic Uremic Syndrome via Activation of the Alternative Pathway of Complement. *Journal of the American Society of Nephrology*; 25(8): 1786–1798.
- 60) Loirat C. et al., 2015. An international consensus approach to the management of atypical hemolytic uremic syndrome in children. *Pediatric nephrology.*; 31(1): 15–39.
- 61) Loos S. et al., 2012. An outbreak of shiga toxin-producing escherichia coli O104:H4 hemolytic uremic syndrome in Germany: Presentation and short-term outcome in children.

Clinical Infectious Diseases; 55(6): 753–759.

- 62) López E. L. et al., 2010. Safety and pharmacokinetics of urtoxazumab, a humanized monoclonal antibody, against Shiga-like toxin 2 in healthy adults and in pediatric patients infected with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 54(1): 239–243.
- 63) Luna-Gierke R. E. et al., 2014. Outbreaks of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: USA. *Epidemiology and Infection*; 142(11): 2270–2280.
- 64) Mannucci P. M., Cugno M., 2015. The complex differential diagnosis between thrombotic thrombocytopenic purpura and the atypical hemolytic uremic syndrome: Laboratory weapons and their impact on treatment choice and monitoring. *Thrombosis Research*; 136(5): 851–854.
- 65) Marejková M. et al., 2013. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* as causes of Hemolytic Uremic Syndrome in the Czech Republic. *PLoS ONE*; 8 (9): e73927.
- 66) Marejková M., Petráš P., 2014. Enterohemoragické *Escherichia coli* jako původci průjmu v České republice, 1965–2013. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*; 63 (3): 173–183
- 67) Mele C. et al., 2014. Hemolytic uremic syndrome. *Seminars in Immunopathology*; 36(4):399-420.
- 68) Mellmann A. et al., 2008. Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*; 14(8): 1287–1290.
- 69) Mellmann A. et al., 2011. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One*;6(7):e22751.
- 70) Mellmann A. et al., 2016. Real-time genome sequencing of resistant bacteria provides precision infection control in an institutional setting. *Journal of Clinical Microbiology*; 54(12): 2874–2881.
- 71) Melton-Celsa A.R., 2014. Shiga Toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiol Spectr.*; 2(2).
- 72) Monnens L. et al., 1980. The complement system in hemolytic-uremic syndrome in childhood. *Clin Nephrol*;13(4):168-171.
- 73) Monsinjon T. et al., 2003. Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells. *The FASEB Journal*; 17(9):

1003–1014.

- 74) Morigi M. et al., 2011. Alternative Pathway Activation of Complement by Shiga Toxin Promotes Exuberant C3a Formation That Triggers Microvascular Thrombosis. *The Journal of Immunology*; 187(1): 172–180.
- 75) Morigi M. et al., 2001. Verotoxin-1-induced up-regulation of adhesive molecules renders microvascular endothelial cells thrombogenic at high shear stress. *Blood*; 98(6): 1828–1835.
- 76) Noris M. et al., 2012. STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation. *Nature Reviews Nephrology*; 8(11): 622–633.
- 77) Noris M. et al., 2001. Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Kidney int*; 60(3): 831–846.
- 78) O'Brien A. D. et al., 1982. Production of shigella dysenteriae type j-like cytotoxin by escherichia coli. *Journal of Infectious Diseases*; 146(6): 763–769.
- 79) Oakes R. S., 2006. Predictors of Fatality in Postdiarrheal Hemolytic Uremic Syndrome. *PEDIATRICS*; 117(5): 1656–1662.
- 80) Oakes R. S. et al., 2008. Duration of oliguria and anuria as predictors of chronic renal-related sequelae in post-diarrheal hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Nephrology*; 23(8): 1303–1308.
- 81) Obrig T. G., Karpman D., 2012. Shiga Toxin Pathogenesis: Kidney Complications and Renal Failure. *Curr Top Microbiol Immunol*; 357: 105–136.
- 82) Ogura Y. et al., 2017. Population structure of Escherichia coli O26:H11 with recent and repeated stx2 acquisition in multiple lineages. *Microb Genom*;3(11)
- 83) Ogura Y. et al., 2009. Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*;106(42):17939–44.
- 84) Orth D. et al., 2010. EspP, a serine protease of enterohemorrhagic Escherichia coli, impairs complement activation by cleaving complement factors C3/C3b and C5. *Infection and Immunity*; 78(10): 4294–4301.
- 85) Orth D. et al., 2009. Shiga Toxin Activates Complement and Binds Factor H : Evidence for an Active Role of Complement in Hemolytic Uremic Syndrome. *J Immunol*; 182(10):6394–6400.

- 86) Orth D., Würzner R., 2010. Complement in typical hemolytic uremic syndrome. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*; 36(06):620-624.
- 87) Pape L. et al., 2015. Eculizumab in Typical Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) With Neurological Involvement. *Medicine*; 94(24): e1000-.
- 88) Pennington H., 2010. Escherichia coli O157. *The Lancet*; 376(9750): 1428–1435.
- 89) De Petris L. et al., 2006. Urinary podocyte mRNA excretion in children with D+HUS: A potential marker of long-term outcome. *Renal Failure.*; 28(6): 475–482.
- 90) Picard C. et al., 2015. Pathophysiology and treatment of typical and atypical hemolytic uremic syndrome. *Pathologie Biologie*; 63(3):136-143.
- 91) Poolpol K. et al., 2014. Interaction of Shiga toxin 2 with complement regulators of the factor H protein family. *Molecular Immunology*; 58(1): 77–84. Price M. N. , Dehal P. S. , Arkin A. P.: FastTree 2--approximately maximumlikelihood trees for large alignments. *PLoS One*. 2010;5(3):e9490.
- 92) Richard H. T., Foster J.W., 2003. Acid resistance in Escherichia coli. *Advances in Applied Microbiology*; 52: 167–186.
- 93) Ricklin D., Lambris J.D., 2007. Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol*;25(11): 1265-1275.
- 94) Riley L.W., 1987. The epidemiologic, clinical, and microbiologic features of hemorrhagic colitis. *Annual rev of Microbiol*; 41:383-407.
- 95) Riley L.W. et al., 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype. *N Engl J Med*; 308:681–685.
- 96) Robson W. L. et al., 1992. Hypocomplementemia and leukocytosis in diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. *Nephron*; 62: 296–9.
- 97) Robinson C.M. et al., 2006. Shiga toxin of enterohemorrhagic Escherichia coli type O157:H7 promotes intestinal colonization. *Proc Natl Acad Sci USA* , 103:9667–9672.
- 98) Rother R. P. et al., 2007. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nature Biotechnology*; 25(11): 1256–1264.
- 99) Ruggenti P. et al., 2001. *Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura*. *Kidney International*; 60(3), 831–846.

- 100) Rutjes N. W. et al., 2002. Differential tissue targeting and pathogenesis of verotoxins 1 and 2 in the mouse animal model. *Kidney International*; 62(3): 832–845.
- 101) Sandvig K. et al., 1992. Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmatic reticulum. *Nature*; 359(6386):510–512.
- 102) Scheutz F. et al., 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*;50(9): 2951–2963.
- 103) Schmid-Hempel P., Frank S. A., 2007. Pathogenesis, virulence, and infective dose. *PLoS Pathogens*; 3(10): 1372–1373.
- 104) Schwartz G. J. et al., 2009. New Equations to Estimate GFR in Children with CKD. *J Am Soc Nephrol*; 20(3): 629–637.
- 105) Scotland S. M. et al., 1987. Properties of strains of Escherichia coli belonging to serogroup O 157 with special reference to production of Vero cytotoxins VT1 and VT2. *Epidemiology and Infection*; 99(3): 613–624.
- 106) Scully M., Goodship T., 2014. How I treat thrombotic thrombocytopenic purpura and atypical haemolytic uraemic syndrome. *British Journal of Haematology*; 164(6): 759–766.
- 107) Siegler R. L., 1994. Spectrum of extrarenal involvement in postdiarrheal hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr*; 125(4): 511–518.
- 108) Spinale J. M. et al., 2012. Long-term outcomes of Shiga toxin hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*; 28(11):2097-2105.
- 109) Srámková L. et al., 1990. Vero cytotoxin-producing strains of Escherichia coli in children with haemolytic uraemic syndrome and diarrhoea in Czechoslovakia. *Infection*; 18 (4):204–209.
- 110) Tarr P. I. et al., 2005. Shiga-toxin-producing Escherichia coli and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* ; 365(9464): 1073–1086.
- 111) Thurman J. M. et al., 2009. Alternative pathway of complement in children with diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*; 4(12): 1920–1924.
- 112) Tozzi A. E. et al., 2003. Shiga toxin-producing Escherichia coli infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000. *Emerging Infectious Diseases*; 9(1):106–108.

- 113) Ullrich S. et al., 2013. Symptoms and Clinical Course of EHEC O104 Infection in Hospitalized Patients: A Prospective Single Center Study. *PLoS ONE* ; 8(2):e55278-.
- 114) Villysson A. et al., 2017. Microvesicle involvement in Shiga toxin-associated infection. *Toxins*; 9(11):376-.
- 115) Walport M. J., 2001. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*;344(14):1058-1066.
- 116) Walport M. J., 2001. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med*;344(15):1140-1144.
- 117) Watanabe M. et al., 2004. Oral Therapeutic Agents with Highly Clustered Globotriose for Treatment of Shiga Toxigenic Escherichia coli Infections. *Journal of Infectious Diseases*; 189(3):360–368.
- 118) Wong C. S. et al., 2012. Risk factors for the hemolytic uremic syndrome in children infected with escherichia coli O157:H7: A multivariable analysis. *Clinical Infectious Diseases*; 55(1):33-41.
- 119) Wurzner R. et al., 2014. Treatment of enterohemorrhagic Escherichia coli-induced hemolytic uremic syndrome (eHUS). *Semin Thromb Hemost*; 40(04):508–516.
- 120) Zimmerhackl L. et al., 2010. Enterohemorrhagic Escherichia coli O26:H11-associated hemolytic uremic syndrome: Bacteriology and clinical presentation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*; 36(06):586–593.
- 121) Zhang W.L. et al., 2000. Molecular characteristics and epidemiological significance of Shiga toxinproducing Escherichia coli O26 strains. *J Clin Microbiol*;38(6):2134–40.
- 122) Zoja C. et al., 2002. Shiga toxin-2 triggers endothelial leukocyte adhesion and transmigration via NF-KB dependent up-regulation of IL-8 and MCP-1. *Kidney International.*; 62(3):846–856.
- 123) Zoja C. et al., 2019. Shiga toxin triggers endothelial and podocyte injury: the role of complement activation. *Pediatric Nephrology*; 34: 379–388.
- 124) Zweifel C. et al., 2013. Detection of the emerging Shiga toxin producing Escherichia coli O26:H11/H- sequence type 29 (ST29) clone in human patients and healthy cattle in Switzerland. *Appl Environ Microbiol.*;79(17):5411–3.

10. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

10.1. Původní vědecké práce *in extenso*, které jsou podkladem disertace

a) s impakt faktorem

Karnisova L, Marejkova M, Hrbackova H, Mellmann A, Karch H, Fruth A, Drevinek P, Blahova K, Bielaszewska M, Nunvar J. Attack of the clones: whole genome-based characterization of two closely related enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 epidemic lineages. *BMC Genomics*. 2018 Aug 31;19(1):647. doi: 10.1186/s12864-018-5045-7. PMID: 30170539; PMCID: PMC6119250.

IF 3,73

Karnisova L, Hradsky O, Blahova K, Fencel F, Dolezel Z, Zaoral T, Zieg J. Complement activation is associated with more severe course of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome, a preliminary study. *Eur J Pediatr*. 2018 Dec;177(12):1837-1844. doi: 10.1007/s00431-018-3255-2. Epub 2018 Sep 24. PMID: 30251107.

IF 2,3

b) bez impakt faktoru

Karnišová, L.; Fencel, F.; Marejková M.; Malina M.; Zieg J.; Bláhová, K. (2016). Infekce způsobené Shiga toxin-produkujícími *Escherichia coli* u dětí. *Československá pediatrie*. 71 (2) , s. 98-103. ISSN 0069-2328.

10.2. Stat' ve sborníku/ knize se vztahem k tématu práce

Karnišová L.; Marejková M.; Bláhová K. Typický hemolyticko-uremický syndrom v České republice

Edit.: J. Lebl; T. Doušová; L. Karnišová; R. Kotalová; K. Koubský; T. Seeman; K. Vondrák. *Orgánové transplantace u dětí: motolské pediatrické semináře 1*, s. 51- 62, Praha Galén 2018. ISBN: 978-80-7492-356-2.

Karnišová, L.; Marejková, Monika; Bláhová, K. Klinické, mikrobiologické a epidemiologické aspekty typického HUS v České republice. In: *VI. kongres klinické mikrobiologie, infekčních nemocí a epidemiologie KMINE 2017 - kniha abstraktů: 25.-27.10.2017*, Praha. Praha: Společnost pro epidemiologii a mikrobiologii ČLS JEP, 2017. , s. 17. ISBN 978-80-906662-5-2.