

**UNIVERZITA KARLOVA**

**2. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



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

**Lucia Karnišová**

Praha, 2021

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Fyziologie a patofyziologie člověka na Pediatrické klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole

Školitel: doc. MUDr. Květa Bláhová, CSc.  
Pediatrická klinika 2.LF UK a FN Motol

Konzultant: doc. Filip Fencel, Ph.D.,  
Pediatrická klinika 2.LF UK a FN Motol

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady Fyziologie a patofyziologie člověka dne ..... v .....  
od .....hod.

Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu:  
prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc.  
Fyziologický ústav 1. LF UK, Albertov 5, 128 00 Praha 2

Děkan fakulty: prof. MUDr. Vladimír Komárek, CSc.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAUK č. 194215, téma: Molekulární a epidemiologické faktory vzniku těžkých forem D+HUS

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 (tel. 224 435 836).

## OBSAH

<b>1. ABSTRAKT</b> .....	<b>4</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>3. ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>4. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE A PRACOVNÍ HYPOTÉZY</b> .....	<b>8</b>
<b>5. METODIKA</b> .....	<b>9</b>
5.1. Studie 1: Retrospektivní analýza průběhů STEC-HUS u dětských pacientů v České republice .....	9
5.1.1. <i>Pacienti a design studie</i> .....	9
5.1.2. <i>Statistická analýza dat</i> .....	9
5.2. Studie 2: Aktivace komplementu je asociována s těžším průběhem STEC-HUS .....	9
5.2.1. <i>Pacienti a sběr dat</i> .....	9
5.2.2. <i>Statistická analýza dat</i> .....	9
5.3. Studie 3: Charakteristika dvou příbuzných kmenových linií Enterohemoragické <i>Escherichiae coli</i> O26 pomocí WGS .....	10
5.3.1. <i>Metody a bakteriální kmeny</i> .....	10
<b>6. VÝSLEDKY</b> .....	<b>12</b>
6.1. Studie 1: Retrospektivní analýza průběhů STEC-HUS u dětských pacientů v České republice.....	12
6.2. Studie 2: Aktivace komplementu je asociována s těžším průběhem STEC-HUS.....	15
6.3. Studie 3: Charakteristika dvou příbuzných kmenových linií Enterohemoragické <i>Escherichiae coli</i> O26 pomocí WGS.....	17
<b>7. DISKUSE</b> .....	<b>22</b>
<b>8. ZÁVĚR</b> .....	<b>25</b>
<b>9. SEZNAM LITERATURY</b> .....	<b>27</b>
<b>10. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA</b> .....	<b>29</b>

## 1. 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 nejvíc 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

## 2. 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*

### 3. 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 předchorobím (Tarr et al. 2005).

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 trombu a k aktivaci komplementu (Noris et al. 2012).

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, Gerber et al. 2002, Garg et al. 2003, Bláhová et al. 2002, Spinale et al. 2012).

Terapie STEC-HUS zůstává prozatím pouze symptomatická a zahrnuje zejména rehydratační terapii, parenterální nutrici a dialýzu (Tarr et al. 2005, Bitzan et al. 2010). Recentní studie poukazují na roli alternativní cesty komplementu v patogenezi STEC-HUS (Noris et al. 2012; Conway 2015; Orth et al. 2009; Zoja et al. 2017). Vzhledem k tomu, že u STEC-HUS dochází k aktivaci komplementu (Thurman et al. 2009, Pape et al. 2015), je možné „off-label“ podání eculizumabu, monoklonální protilátky proti C5 složce komplementu, u těžkých forem, především u pacientů s CNS symptomatologií. Účinnost terapie je v dané indikaci stále předmětem diskuze.

I přes rozsáhlé epidemiologické studie, pokroky v diagnostice či léčbě, 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.

Ve druhé části jsem se zabývala aktivací alternativní cesty komplementu, jakožto faktoru na straně hostitele vedoucího k rozvoji těžkého průběhu onemocnění u dětských pacientů se STEC-HUS.

Ve třetí části jsme se na straně patogena zaměřili na hledání nových faktorů virulence u *E. coli* O26:H11/H, která je nejčastějším sérotypem non-O157 STEC, který celosvětově způsobuje průjmové onemocnění a hemolyticko uremický syndrom (HUS). “Nový evropský klon” (nEC) je vysoce virulentní ST29 klon O26, který nese jen *stx<sub>2a</sub>* a rapidně se rozšířil do Evropy v devadesátých letech minulého století. Ačkoliv je STEC O26 nejčastějším etiologickým agens u dětí s HUS v České republice (Marejková et al. 2013), nebyla doposud provedena bližší analýza jeho klonální struktury. 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.

## **4. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE A PRACOVNÍ HYPOTÉZY**

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

#### **4.1.1. 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

#### **4.1.2. Pracovní hypotéza**

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

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

#### **4.2.1. Hlavní cíl práce**

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

#### **4.2.2 Pracovní hypotéza**

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

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

#### **4.3.1. 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.

#### **4.3.2. Pracovní hypotéza**

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



## 5. METODIKA

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

#### 5.1.1. 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  $\leq 100$  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. Dále jsme u pacientů sledovali klinický průběh, potřebu a délku dialýzy, extrarenální symptomy a komplikace (neurologické, kardiální, plicní, gastrointestinální) během akutní fáze onemocnění.

Detekce a izolace kmenů STEC byla provedena v NRL pro *E. coli* a shigely ve Státním zdravotním ústavu v Praze.

#### 5.1.2. Statistická analýza dat

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.

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

#### 5.2.1. 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

republiky. Z dané kohorty pacientů jsme se dále soustředili na pacienty, u kterých byly stanoveny koncentrace složky C3, jakožto markeru aktivace komplementu.

### **5.2.2. 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. Asociace mezi hodnotou C3 a biochemickými parametry a délkou trvání dialýzy byly testovány použitím lineárního regresního modelu. Křivku ROC (Receiver operator curve) jsme použili k nalezení nejlepší cut-off hodnoty pro C3 koncentraci u pacientů s HUS, kteří potřebovali dialýzu.

## **5.3. Studie 3: Charakteristika dvou příbuzných kmenových linií Enterohemoragické *Escherichiae coli* O26 pomocí WGS**

### **5.3.1. Metody a soubor bakteriálních kmenů**

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.) podle výrobních instrukcí. Od pacientů z České republiky v letech 2006 až 2016 bylo izolováno 16 kmenů EHEC O26:H11/H-. 10 kmenů pocházelo od pacientů s HUS, 4 kmeny od pacientů s krvavým průjmem a 2 kmeny od jedinců s nekrvavým průjmem. 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 sekvence EHEC O26 přístupné v GenBank databázi. Finální počet izolátů EHEC O26 k analýze byl 159.

Následně ve spolupráci s RNDr. Jaroslavem Nunvářem, Ph.D. z Ústavu mikrobiologie 2.LF a FNM byla provedena analýza získaných dat pomocí programu Geneious R9.1. Genomy byly porovnány s referenčním genomem EHEC O26 a O157, a zároveň byly srovnány jednotlivé kmeny mezi sebou. Přítomnost genů spojených s patogenicitou (plasmidové geny EHEC-*HlyA*, *KatP*, *espP* a *etpD*, *stx1a* a *stx2a*) byly hodnoceny použitím TBLASTN (Kearse et al. 2012). Z dalších metod byly využity: analýza evoluční historie *E. coli* O26 pomocí na SNP založené genomové analýze (web CSIPhylogeny v1.4.), vytvoření fylogenetického stromu (program FastTree a MEGA7),

analýza synapomorfních SNP reprezentujících genomovou diverzitu *E. coli* O26 (program Progressive Mauve), analýza *stx2a*- konvertujícího profága *E. coli* (Geneious R9).

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

Cytotoxicita EHEC O26 byla zkoumána ve spolupráci s doc. MUDr. Martinou Bielaszewskou, CSc. ze Státního zdravotního ústavu v Praze. VTEC RPLA (Verotoxin-producing *E. coli* reverse passive latex agglutination) assay byla provedena podle pokynů výrobce. Stx1a a Stx2a v supernatantech byly následně kvantifikovány a porovnány se standardními supernatanty se známými titry koncentrací Stx1a (VT1) a Stx2a (VT2). Použili jsme cytotoxickou Vero cell assay. Cytotoxické titry byly následně znázorněny jako reciproční hodnoty zředěného vzorku, který usmrtil 50 % buněk (CD<sub>50</sub>).

## 6. VÝSLEDKY

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

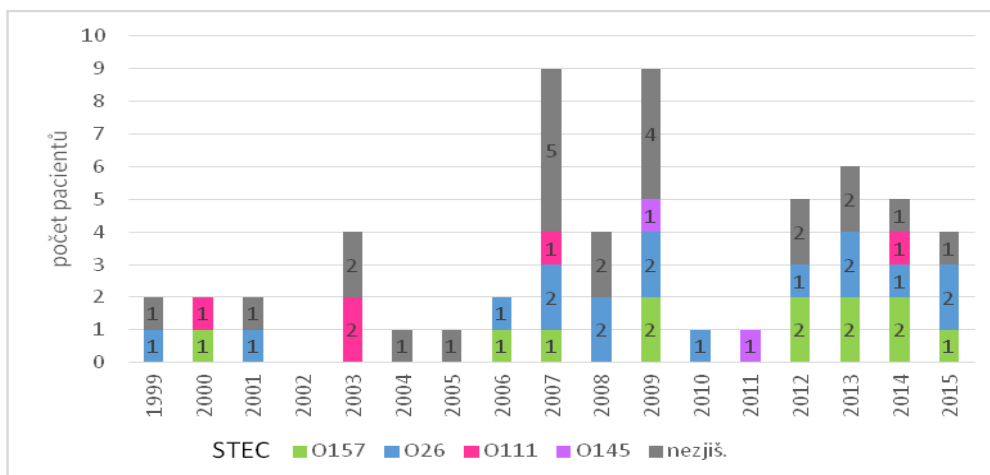
Během 17letého období (srpen 1999 - září 2015) bylo identifikováno 58 pacientů s diagnózou STEC-HUS. Klinická a biochemická charakteristika pacientů je uvedena v tabulce 1.

**Tabulka 1** 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 (x10 <sup>9</sup> /l)		53	11-229
	Leukocyty (10 <sup>9</sup> /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

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 1). Výskyt onemocnění byl vyšší v teplých měsících s maximem od července do září.



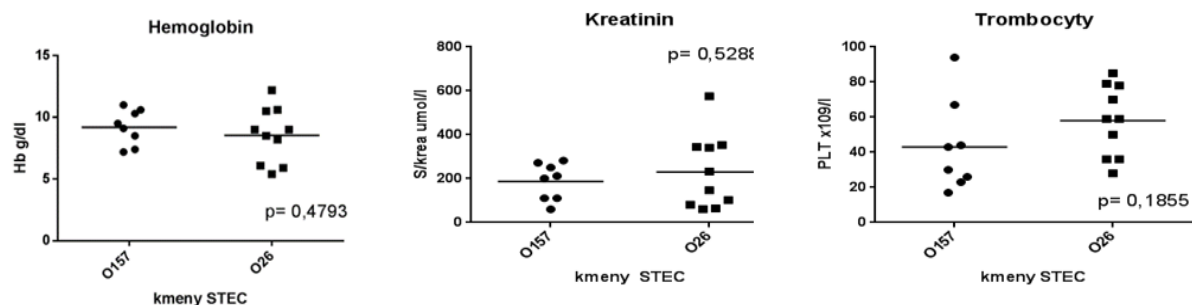
**Obrázek 1** Incidence STEC-HUS v ČR a přehled etiologie v období 1999-2015. Graf také zobrazuje počty případů pacientů s jednotlivými sérotypy STEC zachycenými v průběhu onemocnění.

Extrarenální manifestace HUS se v naší kohortě projevila u 31 (53,4 %) dětí. 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).

Během akutní ataky podlehl komplikacím HUS 5 dětí. Maligní edém mozku byl příčinou úmrtí u 4 pacientů a oběhové selhání s asystolií u 1 pacienta.

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). Produkce Stx2 byla zachycena u všech kmenů O26, 8 kmenů O157 a 2 kmenů O145.

Porovnání průběhů HUS u pacientů s infekcí STEC O26 a O157 neprokázalo žádný signifikantní rozdíl v klinice a laboratorních hodnotách (obrázek 2, tabulka 2).



**Obrázek 2** Porovnání vstupních laboratorních hodnot u infekcí STEC O26 a O157

**Tabulka 2** 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	
	Hematurie	0	4	0,06
	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	

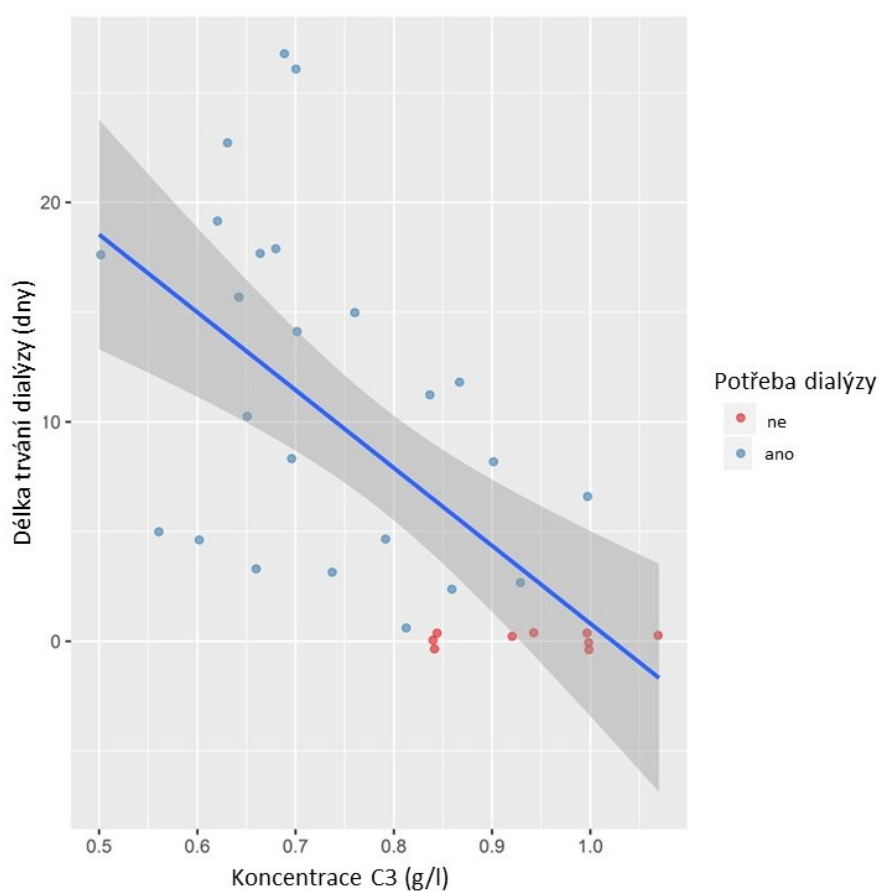
Hodnoty jsou popsány jako absolutní proměnné a jako medián. TRF, transfuze; UPV, umělá plicní ventilace

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

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. 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). Medián trvání oligoanurie před

zahájením dialýzy byl 3 dny (rozmezí 1-6 dní). 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. Extrarenální manifestace HUS se v naší kohortě projevila u 14 dětí. 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.

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 3).

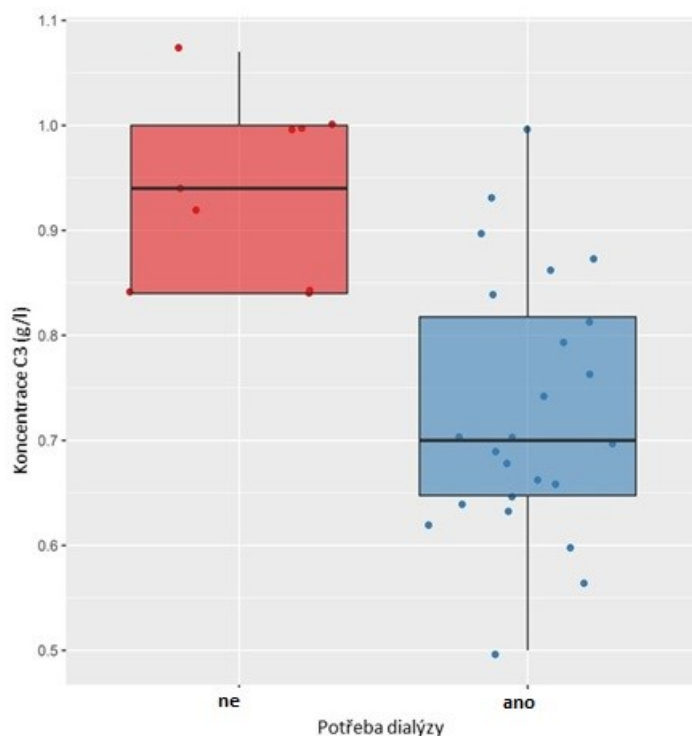


**Obrázek 3** Korelace mezi koncentrací C3 a délkou trvání dialyzační terapie (RRT) u pacientu se STEC-HUS ( $r = -0,62$ ,  $p = 0,0001$ )

Vstupní koncentraci C3 u pacientů při přijetí k hospitalizaci zobrazuje obrázek 4. 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),  $p = 0,001$ .

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 5).

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



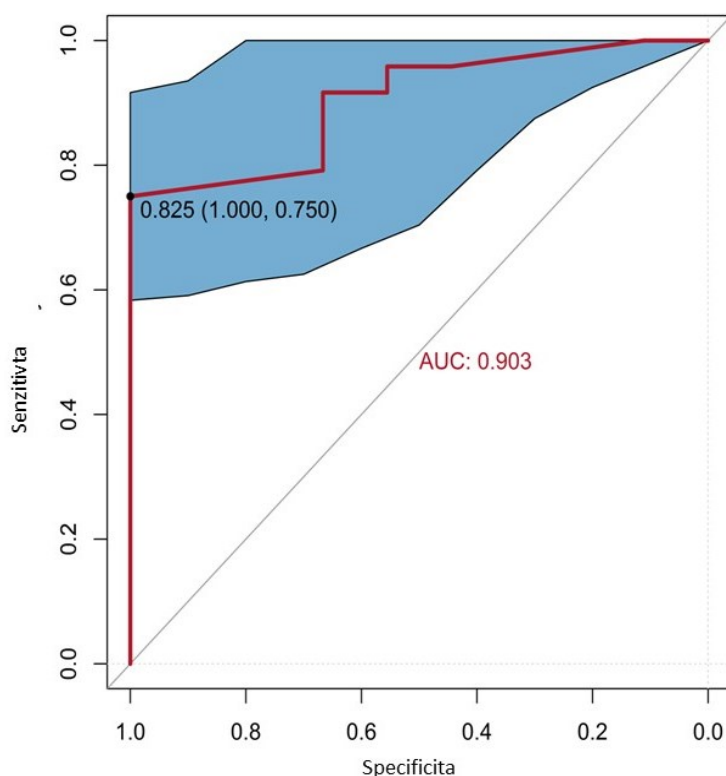
**Obrázek 4** Krabicový graf k porovnání C3 koncentrací u pacientů s a bez dialýzy během akutní fáze STEC-HUS. Skupina s dialýzou je vyznačena modře (medián = 0,7 g/l, IQR 0,5-1), skupina bez dialýzy je označena červenou barvou (medián= 0,94 g/L, IQR 0,84-1,07), p=0,001

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).

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

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. Pacienti s nízkou koncentrací C3 (Skupina 1) měli signifikantně více renálních symptomů (p=0,015).



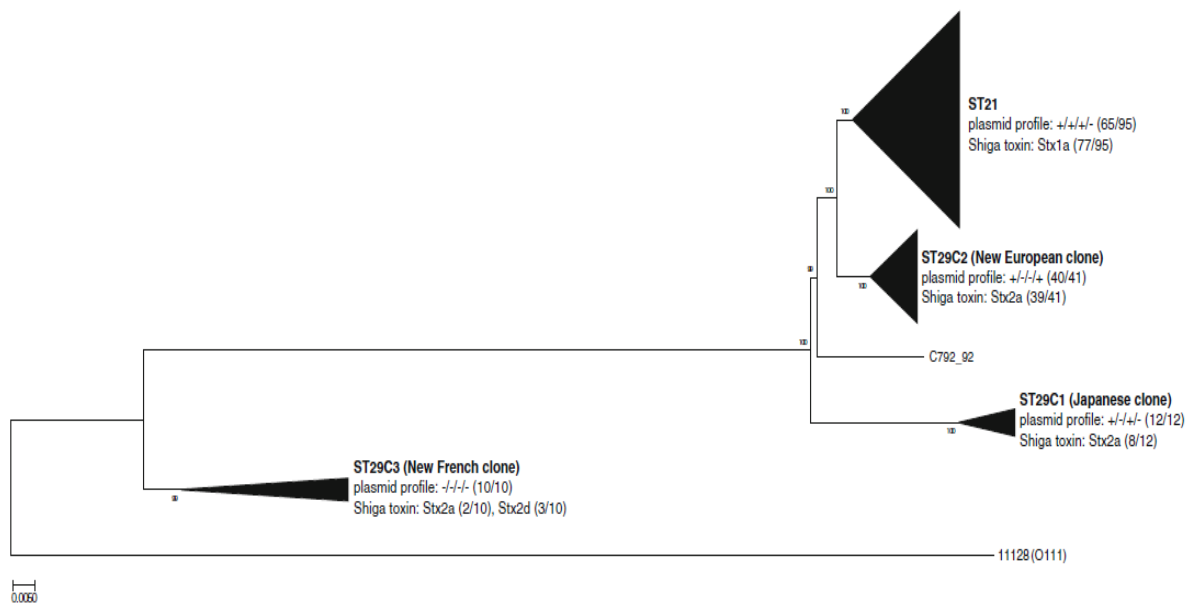


**Obrázek 5** ROC křivka (Receiver operator curve) pro cut-off koncentraci C3 složky komplementu 0,825 g/l jako prediktor zahájení dialýzy (AUC 0,903)

### 6.3. Studie 3: Charakteristika dvou příbuzných kmenových linií Enterohemoragické *Escherichiae coli* O26 pomocí WGS

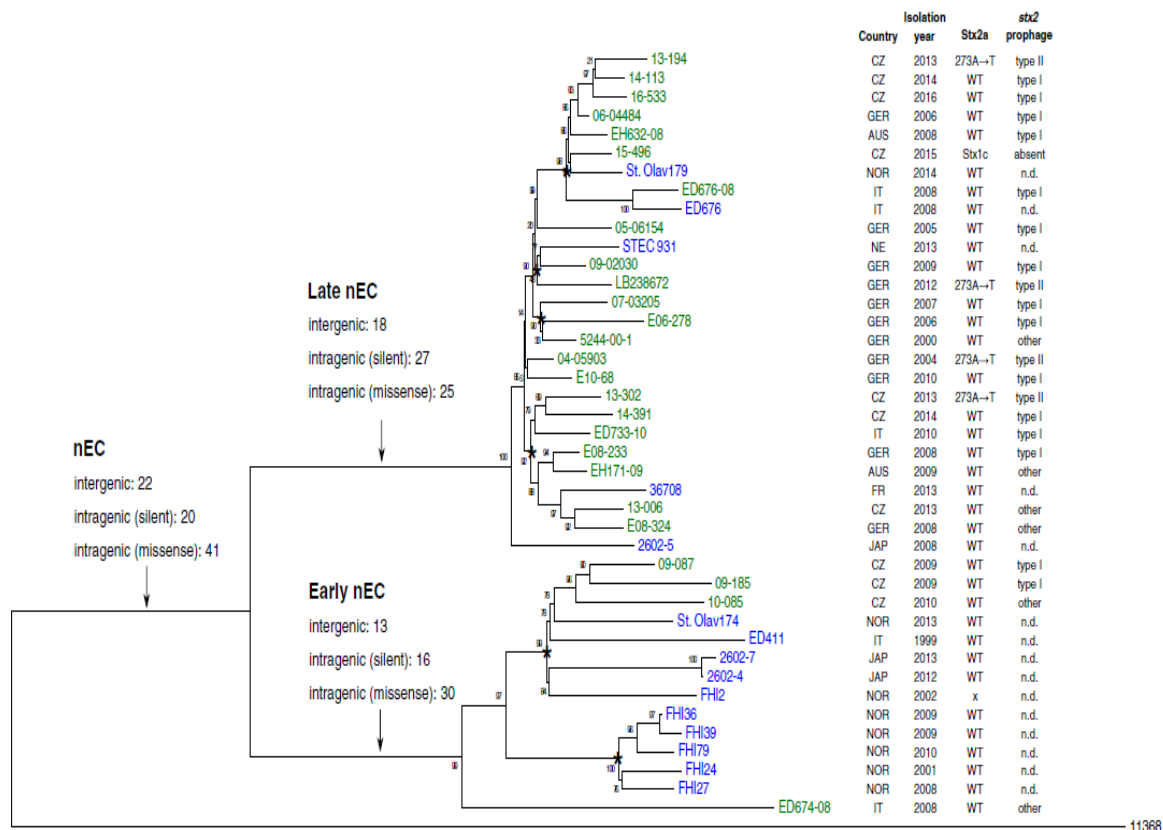
Nejdříve jsme provedli celogenomové sekvenování 16 kmenů EHEC O26 (izolovaných od pacientů s HUS nebo od pacientů s průjmy) v České republice během období 2006-2016. Kmeny O26 patřily do 2 hlavních fylogenetických linií, 6 izolátů patřilo k ST21 a 10 izolátů k ST29. 9/10 českých sérovarů ST29 EHEC O26 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.

Sestavením fylogramu založeném na single nucleotide polymorfizmu (SNP) s použitím modelu maximální podobnosti jsme identifikovali 4 hlavní linie EHEC O26 a fylogenetickou analýzou jsme zjistili, že kmeny nEC (ST29C2) se rozdělily do dvou odlišných skupin- klastrů (viz obrázek 6).



**Obrázek 6** 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)

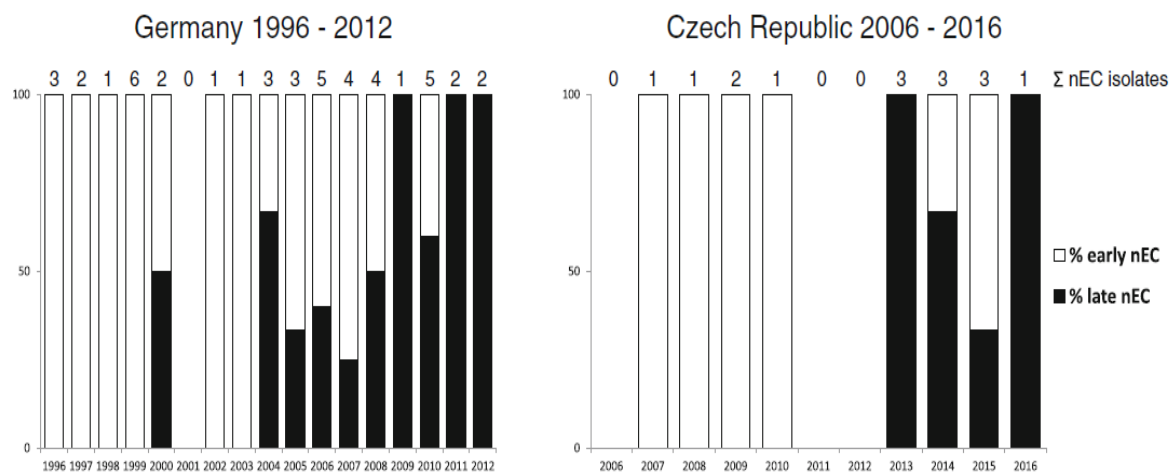
Výsledek byl v souladu s nálezem originální studie o nEC (Bielaszewska et al. 2013), kdy při analýze reprezentativní kolekce nEC pomocí pulsní gelové elektroforézy (PFGE) byly pozorovány dvě odlišné skupiny uvnitř nEC ST29 izolovaných mezi 1996 a 2012. Kmeny patřící do PFGE skupiny B byly prvně izolovány 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 7).



**Obrázek 7** Detailní celogenomová fylogeneze ST29C2 linie nEC EHEC O26. Kmeny sekvenované v této studii jsou označeny zeleně, kmeny, jejichž sekvence byly získané z jiných zdrojů, jsou označeny modře. Krajiny původu 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)

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. synapomorfni mutace). Dále jsme se zaměřili na paralelní evoluci missense synapomorfni 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 patogenezi onemocnění u člověka. Další ze synapomorfni 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 LnEC, 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 8.

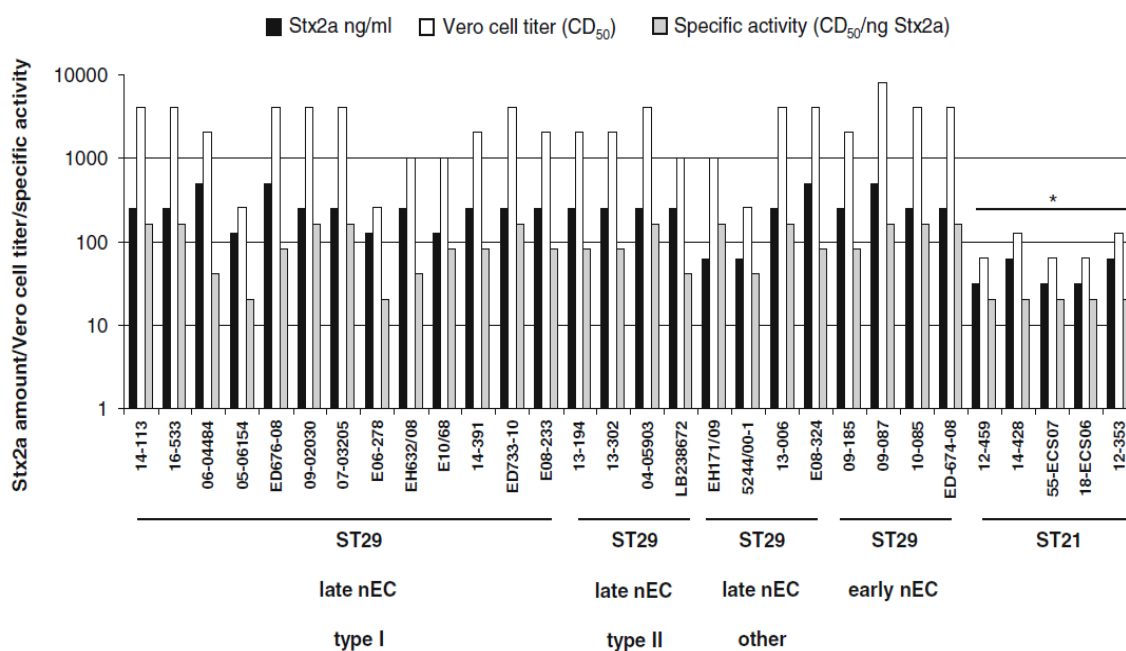


**Obrázek 8** Roční incidence Early nEC a Late nEC v Německu a České republice. Graf znázorňuje proporce EnEC a LnEC v rámci nEC kmenů (*E. coli* O26, ST29, EHEC-*hly* A+, *katP*-, *espP*-, *etpD*+) izolovaných v daném období. EnEC a LnEC kmeny byly rozlišeny pomocí *sen/ent* SNP-specifickou PCR

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. Detailně jsme se zaměřili na profágy nEC a analyzovali jsme *stx*-konvertující profágy u Early a Late nEC. 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.

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 9** 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.

## 7. DISKUSE

Naše výsledky ukázaly, že STEC sérotyp O26:H11 se významně uplatňuje jako původce STEC-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), 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, Karpman 2002). 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 zaměřená na aktivaci komplementu 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.

Naše studie prokázala, že nízká koncentrace C3 při přijetí k hospitalizaci je asociována se závažnějším stupněm akutního poškození ledvin (hodnoceno podle iniciální 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). 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 (Noris et al. 2012; Conway 2015; Orth et al. 2009 ; Zoja et al. 2017, Thurman et al. 2009, Ferraris et al. 2015). 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 (UK, Francie).

V poslední studii jsme využitím celogenomové na SNP založené analýzy 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 (EnEC a LnEC). Vzhledem k četným genetickým odlišnostem je pravděpodobné, že k jejich expanzi došlo nezávisle. Naše analýza *stx2a*-konvertujících profágů u nEC klonů identifikovala převládající typ profága (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). 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) a identifikovali jsme u nich novou a doposud nepopsanou mutaci Stx2a a obsahuje změnu aminokyselin (A273 → T273). Lokalizace mutace naznačuje možnou souvislost s vyžíváním 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 9). 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.



## 8. ZÁVĚR

HUS představuje závažné onemocnění dětského 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 mohou být jak na straně hostitele, tak na straně STEC.

Naše 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 studie zabývající se aktivací komplementu potvrdila 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. Na základě nejen našich výsledků lze předpokládat, že by terapeutické ovlivnění komplementu mohlo mít vliv na průběh onemocnění.

Také porozumění rizikovým faktorům na straně STEC způsobující STEC-HUS, může napomoci identifikovat děti s rizikem komplikovaného průběhu choroby. Proto posledním 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). Námí nově identifikovaný a dosud nepopsaný LnEC (27 kmenů) se liší od nEC několika vlastnostmi: 70 SNP, 3 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. 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 patogenese HUS, a že se jejich poselství uplatní v klinické péči o děti s tímto onemocněním.

## 9. SEZNAM LITERATURY

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Bitzan M. et al., 2010. Treatment of typical (enteropathic) hemolytic uremic syndrome. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*; 36(06): 594–610.
- 4) Bláhová K. et al., 2002. Long-term follow-up of Czech children with D+ hemolytic-uremic syndrome. *Pediatric Nephrology*; 17(6): 400–403.
- 5) Conway E.M., 2015. HUS and the case for complement. *Blood*;126(18):2085-90.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Garg A. X. et al., 2003. Long-term Renal Prognosis of. *Jama*; 290(10): 1360–1370.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) Karch H. et al., 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *International Journal of Medical Microbiology*.; 295(6-7): 405–418.
- 14) Karpman D., 2002. Haemolytic uraemic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Current Paediatrics*; 12(7): 569–574.
- 15) Lapeyraque A. et al., 2011. Eculizumab in Severe Shiga-Toxin – Associated HUS. *The New England Journal of Medicine*; 364(26):2561–2563.
- 16) 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.
- 17) 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.
  - 18) Marejková M. et al., 2013. Enterohemorrhagic *Escherichiacoli* as causes of Hemolytic Uremic Syndrome in the Czech Republic. *PLoS ONE*; 8 (9): e73927.
  - 19) 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.
  - 20) Noris M. et al., 2012. STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation. *Nature Reviews Nephrology*; 8(11): 622–633.
  - 21) 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.
  - 22) 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.
  - 23) 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.
  - 24) Orth D., Würzner R., 2010. Complement in typical hemolytic uremic syndrome. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*; 36(06):620-624.
  - 25) Pape L. et al., 2015. Eculizumab in Typical Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) With Neurological Involvement. *Medicine*; 94(24): e1000-.
  - 26) Siegler R. L., 1994. Spectrum of extrarenal involvement in postdiarrheal hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr*; 125(4): 511–518.
  - 27) Spinale J. M. et al., 2012. Long-term outcomes of Shiga toxin hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*; 28(11):2097-2105.
  - 28) Tarr P. I. et al., 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* ; 365(9464): 1073–1086.
  - 29) 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.
  - 30) Zhang W.L. et al., 2000. Molecular characteristics and epidemiological significance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains. *J Clin Microbiol*;38(6):2134–40.
  - 31) Zoja C. et al., 2017. Shiga toxin triggers endothelial and podocyte injury: the role of complement activation. *Pediatric Nephrology*; 34: 379–388.
  - 32) 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. (2018). Attack of the clones: whole genome-based characterization of two closely related enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 epidemic lineages. *BMC genomics*, *19*(1), 647. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5045-7>

IF 3,73

Karnisova L, Hradsky O, Blahova K, et al. Complement activation is associated with more severe course of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome, a preliminary study. *Eur J Pediatr*. 2018;177(12):1837-1844. doi:10.1007/s00431-018-3255-2

IF 2,3

b) bez impakt faktoru

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

### 10.2. Stat' ve sborníku/ knize

Karnišová L.; Marejková M.; Bláhová K. Typický hemoliticko-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.

### 10.3. Přednášky, plakátová sdělení na odborných setkáních

6/2014                      23rd Meeting of European Society of Paediatric Clinical Research, 20. 6. 2014, Maribor, Slovenia

- přednáška - Diarrhea- Associated Hemolytic Uremic Syndrome in children, an 18-year retrospective study
- 5/2015
 36. pracovní dny dětské nefrologie, Ústí nad Labem  
 - přednáška - Kongenitální trombotická trombocytopenická purpura (TTP) u novorozence - Upshaw- Schulman syndrom
- 7/2015
 5th International Conference "HUS & related diseases" in Innsbruck, Austria  
 - poster - Epidemiological data on HUS in Czech republic
- 12/2015
 1. kramářenský deň klinického výzkumu, Bratislava, Slovensko  
 - přednáška - Možné patogenetické faktory podílející se na vzniku a rozvoji STEC-HUS, Hostitel vs. Patogen
- 4/2016
 Vědecká konference 2.LF UK, Praha  
 - poster - Možné patogenetické faktory podílející se na vzniku a rozvoji STEC-HUS
- 5/2016
 37. pracovní dny dětské nefrologie, Olomouc  
 - přednáška - Léčba relapsů steroid-dependentního nefrotického syndromu bez použití kortikosteroidů  
 - poster - Možné patogenetické faktory podílející se na vzniku a rozvoji STEC-HUS
- 6/2017
 6th International Conference "HUS & related diseases" in Innsbruck, Austria  
 - poster- Complement activation in patients with typical HUS, retrospective study
- 6/2017
 38. pracovní dny dětské nefrologie, Český Krumlov  
 - přednáška- Aktivace komplementu u pacientů s typickým HUS v ČR
- 10/2017  
Praha
 Kongres klinické mikrobiologie, infekčních nemocí a epidemiologie,  
 - přednáška- Typický hemolyticko-uremický syndrom u dětí v České republice