

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**3. lékařská fakulta**



**Státní zdravotní ústav, Praha**  
**NRL pro *E. coli* a shigely**

**ing. Monika Marejková**

**Virulenční profily klinických izolátů enterohemoragických  
*Escherichia coli* a jejich vztah k závažnosti onemocnění**

**Virulence profiles of clinical isolates of enterohemorrhagic  
*Escherichia coli* and their relationship to disease severity**

**Dizertační práce v oboru preventivní medicína**

**Praha, duben 2014**

**Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze  
a Akademie věd České republiky*

**Obor:** Preventivní medicína

**Předseda oborové rady:** doc. MUDr. Alexander M. Čelko, CSc.

**Školící pracoviště:** NRL pro *E. coli* a shigely,  
Centrum epidemiologie a mikrobiologie  
Státní zdravotní ústav, Praha

**Autor:** ing. Monika Marejková

**Školitel:** RNDr. Petr Petráš, CSc.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracovala samostatně a použila pouze uvedené prameny a literaturu. Současně dávám svolení k tomu, aby tato dizertační práce byla používána ke studijním účelům.

V Praze 30. 4. 2014

Monika Marejková

## **BIBLIOGRAFICKÝ ZÁZNAM**

**MAREJKOVÁ, Monika,**

**Virulenční profily klinických izolátů enterohemoragických *Escherichia coli* a jejich vztah k závažnosti onemocnění**

[Virulence profiles of clinical isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and their relationship to disease severity].

Praha, 2014. 67 stran a 4 přílohy. Dizertační práce (Ph.D.) Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta ; Akademie věd České republiky, Státní zdravotní ústav Praha.

Školitel : Petráš, Petr.

**Klíčová slova:** Enterohemoragická *Escherichia coli* (EHEC), Shiga toxin (Stx), sérotyp, genotyp, virulenční profil, hemolyticko-uremický syndrom (HUS), průjem, epidemiologie, prevence infekcí EHEC, Česká republika.

[**Keywords:** Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), Shiga toxin (Stx), serotype, genotype, virulence profile, hemolytic-uremic syndrome (HUS), diarrhea, epidemiology, prevention of EHEC infections, Czech Republic.]

## PODĚKOVÁNÍ

V první řadě chci poděkovat svému školiteli, RNDr. Petru Petrášovi, CSc., za všestrannou pomoc, laskavý přístup a obrovskou podporu po celou dobu mého doktorandského studia.

Obrovské poděkování dále patří paní doc. Dr. Martině Bielaszewske z Ústavu Hygieny Univerzity v Münsteru, která mi svou intenzivní, dlouhodobou, nezištnou pomocí a neocenitelným přístupem skutečného odborníka v problematice EHEC umožnila tuto práci dokončit. Doc. Martině Bielaszewske zároveň děkuji za provedení testů na Verobuňkách.

Prof. Dr. Dr.h.c. Helge Karchovi, řediteli Ústavu Hygieny Univerzity v Münsteru a vedoucímu německé Konziliární laboratoře pro HUS děkuji za opakované umožnění stáže a podporu při psaní publikace.

Dr. Alexandru Mellmannovi z téhož Ústavu děkuji za pomoc s analýzou kmenů EHEC metodou multilokusové sekvenční analýzy.

Děkuji Nadaci „Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových“ za udělení nadačního příspěvku na cestovní stipendium, které mně umožnilo prezentovat poster na prestižní mezinárodní konferenci VTEC 2009 v Buenos Aires ve dnech 10.-13. května 2009.

Děkuji Společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii ČLS JEP za uhrazení registračního poplatku na zahraniční konferenci.

Poděkování patří i všem klinikům a kolegům z mikrobiologických laboratoří v celé České republice za zasílání vzorků i epidemiologům na všech úrovních a všem pracovníkům hygienické služby za epidemiologická šetření jednotlivých případů, včetně zajišťování kontaktů.

Děkuji všem spolupracovníkům z CEM – SZÚ Praha, především paní Miluši Vašákové, za technickou asistenci v laboratoři.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům a svému bratrovi za rodinné zázemí a neustálou podporu po celou dobu mého studia.

# OBSAH

<b>1. SOUHRN</b> .....	08
1.1 Český souhrn .....	08
1.2 Summary .....	10
<b>2. ÚVOD A LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	12
2.1 Onemocnění vyvolaná EHEC .....	12
2.2 Sérotypy EHEC a jejich klinický význam .....	12
2.3 Faktory virulence EHEC a patogeneze HUS .....	15
2.3.1 Toxiny .....	15
2.3.2 Adheziny a ostatní potenciální faktory virulence .....	18
2.4 Epidemiologie EHEC infekcí .....	18
2.5 Onemocnění vyvolaná EHEC v České republice .....	19
<b>3. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE</b> .....	21
<b>4. MATERIÁL A METODY</b> .....	24
4.1 Definice onemocnění, pacienti, vzorky humánního a nonhumánního původu a bakteriální kmeny .....	24
4.2 Metody .....	24
4.2.1 Detekce kmenů EHEC .....	24
4.2.2 Sérotypizace kmenů EHEC .....	25
4.2.3 Fenotypizace kmenů EHEC .....	25
4.2.4 Citlivost k antibiotikům .....	25
4.2.5 Genotypizace kmenů EHEC .....	25
4.2.6 Pulzní gelová elektroforéza .....	26
4.2.7 Multilokusová sekvenční analýza .....	27
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	31
5.1. Výsledky studie „Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> as Causes of Hemolytic Uremic Syndrome in the Czech Republic“ .....	31
5.2 Výsledky studie „Enterohemoragické <i>Escherichia coli</i> jako původci průjmu v České republice, 1965-2013“ .....	34
5.3 Výsledky studie “ An imported case of bloody diarrhea in the Czech Republic caused by a hybrid enteroaggregative hemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (EAHEC) O104:H4 strain associated with the large outbreak in Germany, May 2011“ .....	37
5.4 Výsledky studie „Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O26:H11/H-: A New Virulent Clone Emerges in Europe“ .....	39
<b>6. DISKUZE</b> .....	40

<b>7. ZÁVĚRY</b> .....	48
<b>8. SEZNAM ZKRATEK</b> .....	50
<b>9. SEZNAM LITERATURY</b> .....	52
<b>10. PŘÍLOHY <i>in extenso</i></b> - Seznam příloh .....	67
10.1 Marejková M, Bláhová K, Janda J, Fruth A, Petráš P. (2013) Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> as causes of hemolytic uremic syndrome in the Czech Republic. <i>PLoS One</i> . 2013;8(9):e73927. IF <sub>2012</sub> =3.730	
10.2 Marejková M, Petráš P. (2014) Enterohemoragické <i>Escherichia coli</i> jako původci průjmů v České republice, 1965–2013. <i>Epid Mikrob Imun.</i> 2014;63(3): v tisku. IF <sub>2012</sub> = 0.306	
10.3 Marejková M, Roháčová H, Reisingerová M, Petráš P. (2012) An imported case of bloody diarrhea in the Czech Republic caused by a hybrid enteroaggregative hemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (EAHEC) O104:H4 strain associated with the large outbreak in Germany, May 2011. <i>Folia Microbiol</i> ( <i>Praha</i> ). 2012;57(2):85–89. IF <sub>2012</sub> =0.791	
10.4 Bielaszewska M, Mellmann A, Bletz S, Zhang W, Köck R, Kossow A, Prager R, Fruth A, Orth-Höller D, Marejková M, Morabito S, Caprioli A, Piérard D, Smith G, Jenkins C, Čurová K, Karch H. (2013) Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O26:H11/H- : A new virulent clone emerges in Europe. <i>Clin Infect Dis</i> . 2013;56(10):1373–1381. IF <sub>2012</sub> = 9.374	

# 1. SOUHRN

## 1.1 Český souhrn

Enterohemoragické *Escherichia coli* (EHEC) jsou celosvětovými původci průjmů a tzv. diarreha-pozitivního (D+) hemolyticko-uremického syndromu (HUS). D+ HUS se vyvíjí jako systémová komplikace průjmu vyvolaná Shiga toxinem (Stx) především u dětí do 5 let a je nejčastější příčinou akutního selhání ledvin v dětském věku. Cílem této práce bylo určit význam EHEC jako původců HUS a průjmů v České republice, zavést rychlé a spolehlivé metody pro jejich detekci a molekulární subtypizaci, určit virulenční profily izolátů a jejich vztah ke klinickému průběhu onemocnění (tj. nekomplikovaný průjem vs. HUS) a získat informaci o epidemiologii EHEC infekcí. V letech 1998–2012 byly EHEC izolovány ze stolic 70 % pediatrických pacientů s HUS. Izoláty patřily k sérotypům [*fliC* typům H antigenu] O157:H7/NM[*fliC*<sub>H7</sub>] (kde 50 % byly sorbitol-fermentující kmeny), O26:H11/NM[*fliC*<sub>H11</sub>], O55:NM[*fliC*<sub>H7</sub>], O111:NM[*fliC*<sub>H8</sub>], O145:H28[*fliC*<sub>H28</sub>], O172:NM[*fliC*<sub>H25</sub>] a 2 kmeny byly netypovatelné. EHEC O26 tvořily 41 % všech izolátů. Více než třetina z nich patřila k novému, vysoce virulentnímu klonu, který se objevil v 90. letech v Německu a je v současné době častým původcem HUS v Evropě. Kmeny EHEC od pacientů s HUS patřily k 5 *stx* genotypům; 76 % kmenů obsahovalo *stx*<sub>2a</sub> gen, buď samotný (71 %) nebo v kombinaci s *stx*<sub>2c</sub> (5 %), což ukazuje, že *stx*<sub>2a</sub> genotyp infikujícího kmene je rizikovým faktorem pro progresi průjmu do HUS. Z non-*stx* faktorů virulence byl u většiny kmenů prokázán EHEC-*hlyA* kódující EHEC hemolyzin a u všech kmenů gen *eae* kódující adhesin intimin. Geny kódující další toxiny EHEC (*cdt-V*, *espP*) a adhesiny byly sérotyp-specifické. Většina ze 49 kmenů EHEC izolovaných od pacientů s průjmem bez HUS a jejich rodinných kontaktů patřila ke stejným sérotypům jako kmeny z HUS, tj. O157:H7/NM[*fliC*<sub>H7</sub>], O26:H11/NM[*fliC*<sub>H11</sub>] a O111:NM[*fliC*<sub>H8</sub>]. Vzácně se vyskytly sérotypy O118:NM[*fliC*<sub>H25</sub>] a O104:H4[*fliC*<sub>H4</sub>], z nichž poslední je importovaný hybridní kmen enteroagregativně hemoragické *E. coli* (EAHEC) izolovaný v souvislosti s německou epidemií v roce 2011. Na rozdíl od kmenů z HUS, 71 % EHEC od pacientů s průjmem obsahovalo *stx*<sub>1a</sub> gen (samotný nebo v kombinaci s *stx*<sub>2a</sub> a/nebo *stx*<sub>2c</sub>); přítomnost *stx*<sub>1a</sub> tedy indikuje schopnost kmene vyvolat nekomplikovaný průjem bez progresu do HUS. EHEC infekce se vyskytovaly během celého roku, s vrcholem v květnu až říjnu a



nejvíce ve Středočeském a Královéhradeckém kraji. Ve 3 případech došlo k přenosu infekce v rodinách a v 1 případě k přenosu EHEC O157:H7 z ovce na pacienta. Doba vylučování EHEC u pacientů a asymptomatických kontaktů se pohybovala v rozmezí od 9 do 68 dnů (medián 22 dnů). Výsledky této práce ukazují, že EHEC jsou významnými původci HUS a průjmů v České republice a že typ *stx* genu je důležitým indikátorem klinického průběhu onemocnění, konkrétně progresu nekomplikovaného průjmu do HUS. Vzhledem k absenci specifické terapie a prevence (očkování) EHEC infekcí je proto v současné době nejúčinnější prevencí potenciálně letálního HUS rychlá detekce EHEC ve stolici pacienta, určení rizika progresu do HUS pomocí subtypizace *stx* genu a v případě potřeby okamžité zahájení vhodné podpůrné terapie, která snižuje riziko rozvoje akutního renálního selhání. Protože jak pacienti, tak bezpříznakoví nosiči, kteří dlouhodobě vylučují EHEC, jsou závažnými potencionálními zdroji infekce pro své okolí, skrining EHEC v rodinách pacientů a důsledné sledování vylučování EHEC po prodělané infekci jsou nezbytným základem pro zavedení příslušných preventivních opatření zabraňujících šíření EHEC infekce.

**Klíčová slova:** : Enterohemoragická *Escherichia coli* (EHEC), Shiga toxin (Stx), sérotyp, genotyp, virulenční profil, hemolyticko-uremický syndrom (HUS), průjem, epidemiologie, prevence infekcí EHEC, Česká republika.

## 1.2 Summary

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) cause diarrhea and diarrhea-associated (D+) hemolytic-uremic syndrome (HUS) worldwide. D+ HUS develops as Shiga toxin (Stx)-mediated systemic complication of diarrhea mostly in children under 5 years and is the most common cause of acute renal failure in childhood. The aim of this study was to determine the role of EHEC in etiology of HUS and diarrhea in the Czech Republic, to develop rapid and reliable methods for EHEC detection and molecular subtyping, to analyze virulence gene profiles of the EHEC isolates and their correlation with the clinical outcome of the infection (i.e. uncomplicated diarrhea vs. HUS) and to gain insight into the epidemiology of EHEC infections. During 1998-2012 EHEC were isolated from stool samples of 70 % of pediatric patients with HUS. The isolates belonged to serotypes [*fliC* types] O157:H7/NM[*fliC*<sub>H7</sub>] (50 % were sorbitol-fermenting strains), O26:H11/NM[*fliC*<sub>H11</sub>], O55:NM[*fliC*<sub>H7</sub>], O111:NM[*fliC*<sub>H8</sub>], O145:H28[*fliC*<sub>H28</sub>], O172:NM[*fliC*<sub>H25</sub>], and Orough:NM[*fliC*<sub>H25</sub>]. EHEC O26 accounted for 41 % of all isolates. More than one third of them belonged to a new, highly virulent clone that emerged in Germany in the 1990s and has spread since then as a frequent cause of HUS in Europe. EHEC isolates from HUS patients belonged to 5 *stx* genotypes; 76 % of them contained *stx*<sub>2a</sub> gene, either alone (71 %) or together with *stx*<sub>2c</sub> (5 %), demonstrating that the *stx*<sub>2a</sub> genotype in the infecting strain is a predictor for the risk of progression of EHEC infection to HUS. Most strains also harbored EHEC-*hlyA* encoding EHEC hemolysin and all strains possessed *eae* encoding the adhesin intimin. Genes encoding other EHEC toxins (*cdt-V*, *espP*) and adhesins were serotype-specific. The majority of EHEC strains isolated from patients with uncomplicated diarrhea and their family members belonged to serotypes O157:H7/NM[*fliC*<sub>H7</sub>], O26:H11/NM[*fliC*<sub>H11</sub>] a O111:NM[*fliC*<sub>H8</sub>], which were also associated with HUS. Moreover, rare serotypes such as O118:NM[*fliC*<sub>H25</sub>] and O104:H4[*fliC*<sub>H4</sub>] were found; the latter strain was imported from Germany and shown to be the hybrid of an EHEC and enteroaggregative *E. coli* (EAHEC), which caused the 2011 outbreak in Germany. In contrast to isolates from HUS patients, 71% of EHEC isolated from patients with diarrhea harbored *stx*<sub>1a</sub> gene (either alone or together with *stx*<sub>2a</sub> and/or *stx*<sub>2c</sub>) demonstrating that the presence of *stx*<sub>1a</sub> in the infecting strain indicates its potential to cause uncomplicated diarrhea without progression to HUS. EHEC infections occurred throughout the year, peaked between May and October, and were the most common in

the Central Bohemian and Královéhradecký regions. Transmission of EHEC O157:H7 infection was detected within 3 families, and from a sheep to a patient. Duration of EHEC fecal shedding in patients and their asymptomatic contacts ranged from 9 to 68 days (median, 22 days). Taken together, our data demonstrate that EHEC are important causes of HUS and diarrhea in the Czech Republic and the *stx* subtype of the infecting strain is a predictor for the clinical outcome of the infection, specifically for the progression of uncomplicated diarrhea to HUS. Because there is no specific therapy and prevention (vaccination) for EHEC infections, a rapid detection of EHEC in patients' stools, prompt subtyping of *stx* genes, and administration of a suitable supportive therapy in patients at risk of HUS development are at present the most effective measures to reduce the risk of acute renal failure and thus potentially lethal HUS during EHEC infection. Moreover, because long-term EHEC shedders (both patients and asymptomatic individuals) are important potential sources of the infection, a consistent screening for EHEC shedding in patients as well as in their asymptomatic family members are necessary to implement effective measures to prevent the spread of EHEC infections.

**Keywords:** Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), Shiga toxin (Stx), serotype, genotype, virulence profile, hemolytic-uremic syndrome (HUS), diarrhea, epidemiology, prevention of EHEC infections, Czech Republic.

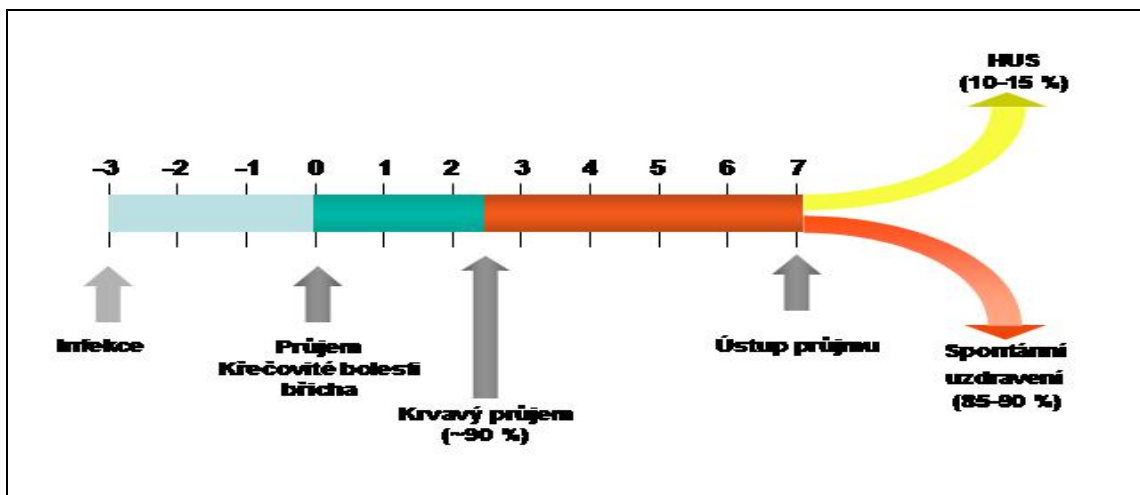
## 2. ÚVOD A LITERÁRNÍ PŘEHLED

Enterohemoragické *Escherichia coli* (EHEC) jsou definovány jako skupina Shiga toxin (Stx)-produkujících *E. coli* patogenních pro člověka [Levine M, et al., 1987; Nataro JP a Kaper JB, 1998]. EHEC jsou rozšířeny celosvětově a mají několik společných charakteristik: 1) vyvolávají průjmová onemocnění různé závažnosti, která mohou být komplikována potenciálně letálním hemolyticko-uremickým syndromem (HUS), který je důsledkem systémové toxémie; 2) produkují jeden či více typů Stx, který je hlavním faktorem virulence těchto patogenů; 3) zpravidla obsahují ostrůvek patogenity nazývaný LEE (locus for enterocyte effacement), který kóduje schopnost adherovat ke střevní sliznici typickým způsobem označovaným jako „attaching and effacing lesions“; 4) obsahují plasmidy různé velikosti, které kódují řadu non-Stx faktorů virulence; 5) patří k určitému spektru sérotypů, z nichž pět nejčastějších (tzv. „top five“) jsou celosvětovými původci HUS; 6) zvířata, především dobytek, který vylučuje EHEC asymptomaticky, jsou jejich hlavními přirozenými rezervoáry [Nataro JP a Kaper JB, 1998; Karmali MA, 2004; Karch H, et al., 2005; Karmali MA, et al., 2010]. Infekce vyvolané EHEC představují závažný zdravotnický problém nejen z hlediska jejich schopnosti vyvolat HUS, který je nejčastější příčinou akutního selhání ledvin u dětí [Scheiring J, et al., 2008] a je potenciálně smrtelný, ale i pro schopnost působit rozsáhlé epidemie [Rangel JM, et al., 2005; Frank C, et al., 2011]. Dalším důvodem zdravotnické závažnosti EHEC infekcí je skutečnost, že i po 30 letech od jejich objevení jako původců lidských onemocnění [Riley LW, et al., 1983, Karmali MA, et al., 1983] stále chybí specifická terapie a prevence (očkování). Protože Stx typ infikujícího kmene má zásadní význam pro progresi lokální střevní EHEC infekce (průjmu) do systémové toxémie (HUS), nejúčinnější prevencí HUS je v současné době rychlá detekce EHEC ve stolici pacienta s průjmem [Tarr PI, et al., 1990], určení rizika progresu do HUS na základě rychlé subtypizace *stx* genu [Friedrich AW, et al., 2002; Bielaszewska M, et al., 2006] a v pozitivním případě okamžité zahájení vhodné terapie („volume expansion“), která snižuje riziko rozvoje HUS nebo alespoň mitiguje renální poškození [Ake JA, et al., 2005].

### 2.1. Onemocnění vyvolaná EHEC

EHEC vyvolávají široké spektrum lidských onemocnění zahrnující nekomplikovaný vodnatý průjem, průjem s příměsí krve, hemoragickou kolitidu a

klasicky (tj. diarrhea-associated, D+) HUS [Ambrožová H, Marejková M, 2012; Karch H, et al., 2005, Nataro JP, Kaper JB, 1998; Karmali MA, et al., 2004; Croxen MA, et al., 2013]. D+ HUS je klinicky charakterizován mikroangiopatickou hemolytickou anemií (hematokrit < 30 % s nálezem schistocytů v krevním nátěru), trombocytopenií (počet krevních destiček < 150.000/mm<sup>3</sup>) a akutním renálním selháním (hladina sérového kreatininu vyšší než je horní limit normálního rozmezí pro daný věk) [Tarr PI, et al., 2005]. HUS se vyvíjí jako systémová komplikace průjmů vyvolaných EHEC především u dětí do 5 let věku. Jeho patofyziologickým podkladem je trombotická mikroangiopatie, která postihuje především kapiláry ledvinných glomerulů, tlustého střeva a mozku a je důsledkem poškození mikrovaskulárního endotelu účinkem Stx [Bielaszewska M, Karch H, 2005a; Tarr PI, et al., 2005; Zoja C, et al., 2010; Karmali MA, et al., 2010]. Smrtnost HUS se uvádí mezi 3–5 % a častou příčinou úmrtí bývají neurologické komplikace [Gerber A, et al., 2002; Sheiring J, et al., 2008]. Až 30 % pacientů, kteří se uzdraví z akutního onemocnění, má trvalé následky ve formě hypertenze, proteinurie, zúžení střeva, neurologických postižení, případně až chronického selhání ledvin, vedoucího k nutnosti celoživotní dialýzy či transplantace. K vzácnějším pozdním následkům se řadí diabetes mellitus a žlučové kameny [Bláhová K, et al., 2002; Garg AX, et al., 2003; Rosales A, et al., 2012]. Onemocnění vyvolaná EHEC začínají 3–7 dnů (medián 3 dny) po infekci jako vodnatý průjem doprovázený křečovými bolestmi břicha, který u většiny (až 90 %) případů přechází během 1–3 dnů v krvavý průjem.



**Obrázek 1. Typický klinický průběh infekce EHEC O157:H7 u dětí do 10 let věku**  
[Podle Tarr PI, et al., 2005 (modifikováno)]

Zvýšenou teplotu či horečku udává asi polovina pacientů. Leukocyty ve stolicích jsou přítomny u ~50 % vyšetřených osob, ale jen výjimečně dosahují vysokých hodnot.

HUS se vyvíjí 5–13 dnů (medián 7 dnů) po začátku průjmu, přičemž riziko rozvoje HUS u pacientů pod 10 let věku je 10–15 % [Karch H, et al., 2005; Tarr PI, et al., 2005; Werber D, et al., 2007]. Typický klinický průběh infekce vyvolané EHEC O157:H7 je znázorněn na **obrázku 1** (na str. 13).

## 2.2. Sérotypy EHEC a jejich klinický význam

V současné době je známo více než 400 sérotypů Stx-produkujících *E. coli*, z nichž více než 100 bylo popsáno ve spojení s lidským onemocněním [Karmali MA, 2004; Brandt SM, et al., 2011; Dallman T, et al., 2013]. Nejvýznamnějším a celosvětově rozšířeným EHEC sérotypem je O157:H7/NM (klasické sorbitol-nefermentující (NSF) kmeny), který je nejčastějším původcem sporadických onemocnění, především HUS [Karch H, et al., 2005; Tarr PI, et al., 2005; Gerber A, et al., 2002; Banatvala N, et al., 2001; Espié E, et al., 2008; Lynn RM, et al., 2005; Marejková M, et al., 2013] a vyvolal řadu rozsáhlých epidemií [Rangel JM, et al., 2005]. Kromě toho byla od pacientů s průjmem či HUS izolována celá řada dalších, tzv. non-O157:H7 EHEC sérotypů, z nichž nejčastější jsou, ve spojení se sporadickými případy či epidemickými výskyty, O26:H11/NM, O103:H2/NM, O111:H8/NM, O145:H28/NM a sorbitol-fermentující (SF) O157:NM [Gerber A, et al., 2002; Beutin L, et al., 2004; Karch H, et al., 2005; Karmali MA, et al., 1985; EFSA 2013; Marejková M, et al., 2013; Marejková M, et al., 2009; Mellmann A, et al., 2008; Ethelberg S, et al., 2009; Gould LH, et al., 2013; Brooks JT, et al., 2005; Orth D, et al., 2009; Eklund M, et al., 2006; Karch M, et al. 1990; Tozzi E, et al., 2003; Käppeli U, et al., 2011; Taylor EV, et al., 2013; Luna-Gierke RE, et al., 2014]. Dalšími virulentními EHEC sérotypy, z nichž některé se vyskytují převážně v určitých geografických oblastech, jsou O91:H21, O113:H21, O118:H16, a O121:H19 [Paton AW, et al., 1999; Werber D, et al., 2007; Tarr CL, et al., 2002; Maidhof H, et al., 2002].

V souvislosti se sporadickými případy HUS byla popsána i řada dalších, méně častých sérotypů EHEC, z evropských zemí například v Německu [Mellmann A, et al., 2008], Francii [Espie E, et al. 2008], Švýcarsku [Käppeli U, et al., 2011; Stritt A, et al., 2013], Dánsku [Ethelberg S, et al., 2004], Belgii [Buvens G, et al., 2013], Itálii [Tozzi E, et al., 2003] a v České republice [Marejková M, et al., 2013]; ale také v USA [Brooks

JT, et al., 2005; Gould LH, et al., 2013], jižní Americe [Rivas M, et al., 2006], Austrálii [Elliott EJ, et al., 2001] a Japonsku [Konno T, et al., 2013].

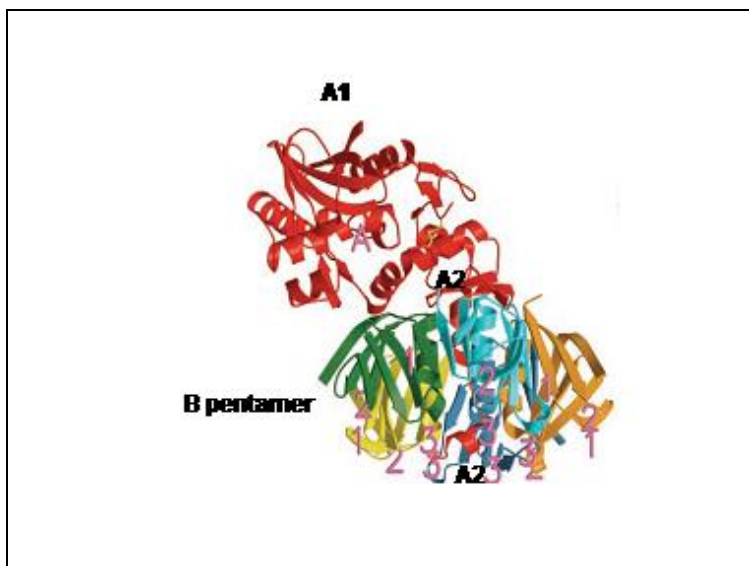
## **2.3. Faktory virulence EHEC a patogeneze HUS**

### **2.3.1. Toxiny**

Hlavními faktory virulence EHEC jsou Shiga toxiny, též označované synonymem verotoxiny (VT) [Karmali MA, et al., 1985; Scheutz F, et al., 2012]. *stx* (*vtx*) geny jsou kodovány v genomech bakteriofágu, které jsou integrovány do EHEC chromozomu [Makino KK, et al., 1999; Yokoyama K, et al., 2000]. Existují 2 hlavní typy Stx, a to Stx1a (téměř shodný s Stx *Shigella dysenteriae* 1) a Stx2a. Stx1a a Stx2a sdílejí 57% a 60% identitu v sekvenci nukleotidu jejich A a B podjednotek [Jackson MP, et al., 1987] a liší se antigenně [Scotland SM, et al., 1985]. V rámci hlavních typů se rozlišuje řada subtypů. V rámci Stx1a jsou to subtypy Stx1c a Stx1d, zatímco skupina Stx2a je mnohem heterogennější se subtypy Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f a Stx2g [Scheutz F, et al., 2012]. Jednotlivé subtypy se liší sekvencí nukleotidu, receptorovou specifitou a schopností aktivace elastázou přítomnou ve hlezu střešní sliznice, která zvyšuje toxicitu [Scheutz F, et al., 2012; Melton-Celsa AR, et al., 2002; Bielaszewska M, et al., 2006; Bauwens A, et al., 2013]. U kmenů vyvolávajících lidská onemocnění se nejčastěji vyskytují Stx1a, Stx1c, Stx2a, Stx2b, Stx2c, a Stx2d [Friedrich AW, et al., 2002; Bielaszewska M, et al., 2006; Friedrich AW, et al., 2003; Marejková M, et al., 2013; Scheutz F, et al., 2012; Zhang WL, et al., 2014; Karch H, et al., 2005]. Pouze některé Stx typy a subtypy, konkrétně Stx2a, Stx2c a Stx2d, jsou dle epidemiologických studií signifikantně spojeny se schopností kmenů, které je produkují, vyvolat HUS [Friedrich AW, et al., 2002; Gerber A, et al., 2002; Persson S, et al., 2007; Bielaszewska M, et al., 2006; Ethelber S, et al., 2004; Käppeli U, et al., 2011; Brooks JT, et al., 2005]. Oproti tomu kmeny EHEC produkující Stx1a, Stx1c, Stx2b, Stx2e, Stx2f a Stx2g jsou většinou izolovány od pacientů s nekomplikovaným průjmem, tj. bez progresu do HUS [Friedrich AW, et al., 2002; Friedrich AW, et al., 2003; Beutin L, et al., 2004; Sonntag AK, et al., 2005a; Sonntag AK, et al., 2005b; Prager R, et al., 2009; Prager R, et al., 2011), z toho poslední tři subtypy velmi vzácně. I když patofyziologický podklad signifikantního spojení Stx2a se schopností EHEC vyvolat HUS není zatím zcela jasný, *in vitro* studie prokázaly, že Stx2a vykazuje mnohonásobně vyšší cytotoxicitu vůči mikrovaskulárnímu endotelu lidských

ledvinných glomerulů a mozku, jež jsou hlavními cílovými orgány v průběhu HUS, než Stx1a [Louise CB, Obrigh TG, 1995; Bauwens A, et al., 2011].

Po strukturní stránce jsou Shiga toxiny AB<sub>5</sub> toxiny složené z jedné enzymaticky aktivní podjednotky A (32 kDa), která má RNA *N*-glykozidázovou aktivitu a inhibuje proteosyntézu, a pěti podjednotek B (každá 7,7 kDa), které se specificky vážou na glykosfingolipidové receptory cílových buněk [Fraser et al., 2004; Zoja C, et al., 2010; Bauwens A, et al., 2013]. Krystalický model Stx2a holotoxinu je znázorněn na **obrázku 2**. Hlavním buněčným receptorem pro Stx1a a Stx2a je globotriaosylceramide (Gb3), zatímco Stx2e se přednostně váže k globotetraosylceramidu (Gb4) [Bauwens A, et al., 2013].



### Obrázek 2. Struktura Stx2a holotoxinu

Krystalický model Stx2a holotoxinu s vyznačenou podjednotkou A (červeně) a pentamerem podjednotek B (zelená, tyrkysová, okrová, modrá, žlutá). Podjednotka A se skládá ze dvou řetězců, z nichž řetězec A1 (28 kDa) má *N*-glykozidázovou aktivitu a vazbou na ribozomy inaktivuje proteosyntézu, a řetězec A2 (4 kDa) spojuje A1 podjednotku s pentamerem B podjednotek. Písmeno “A” v A1 podjednotce označuje enzymaticky aktivní místo a čísla v podjednotce B místa specificky reagující s Gb3 receptorem. [Dle Fraser et al., 2004 (modifikováno)].

Podle současných poznatků o patogeneze HUS jsou Shiga toxiny, produkované EHEC kolonizujícími tlusté střevo, absorbovány do krevního oběhu a transportovány, pravděpodobně pomocí polymorfonukleárních leukocytů [Brigotti M, et al., 2008], do mikrovaskulatury cílových orgánů, tj. především ledvin, tlustého střeva a mozku. Zde, po vazbě na receptor endotelových buněk (Gb3) působí poškození endotelu kombinací



procesů zahrnujících inhibici proteosyntézy, apoptózu, nekrózu a aktivaci protrombotických mechanismů [Ambrožová H, Marejková M, 2012; Bielaszewska M, Karch H, 2005a; Karch H, et al., 2005; Bauwens A, et al., 2013; Zoja C, et al., 2010]. K poškození ledvin přispívá též aktivace komplementu vyvolaná Stx2a [Orth D, Würzner R, 2010]. Orgánové trombotické mikroangiopatické změny vyvolané Shiga toxiny jsou podkladem klinických projevů HUS a hemoragické kolitidy [Karmali MA, 2004; Karch H, et al., 2005].

Kromě Shiga toxinu produkují EHEC i řadu dalších toxinů, které mohou hrát roli v patogenezi onemocnění, především HUS. Tyto zahrnují EHEC hemolyzin, serin proteázu EspP, cytoletální distendující toxin (CDT) a cytotoxin subtilázu [Bielaszewska M, Karch H, 2005a]. EHEC hemolyzin je cytolyzin [Schmidt H, et al., 1995] se schopností působit ve vyšších dávkách lýzu mikrovaskulárních endotelových buněk [Aldick T, et al., 2007] a v sublytických dávkách jejich apoptózu, stejně jako apoptózu střevních epitelových buněk [Bielaszewska M, et al., 2013b]. EspP je protein ze skupiny autotransporterů SPATEs (serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*), s potenciálem štěpit koagulační faktor V přítomný v plazmě [Brunner W, et al., 1997]. Bylo popsáno několik subtypů (EspP  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  a  $\epsilon$ ), z nichž subtyp EspP  $\alpha$  je přítomen u EHEC O157:H7 a nejčastěji se vyskytujících non-O157 EHEC sérotypů působících závažná lidská onemocnění včetně HUS [Brockmeyer J, et al., 2007; Weiss A, Brockmeyer J, 2012]. CDT je tříšložkový protein, který má jako jediný známý bakteriální toxin schopnost poškozovat bakteriální DNA [Jinadasa et al., 2011]. Důsledkem poškození DNA je zástava buněčného cyklu v G2 fázi, která rezultuje v inhibici proliferace a nakonec v buněčnou smrt [Bielaszewska et al., 2005b; Jinadasa et al., 2011]. Pro tyto vlastnosti je CTD klasifikován jako genotoxin a cyklomodulin [Jinadasa RN, et al., 2011]. V současné době je známých pět typů CDT u *E.coli* různých patogenních skupin [Jinadasa et al., 2011], z nichž dva (CDT-III a CDT-V) byly identifikovány u EHEC [Janka A, et al., 2003; Bielaszewska M, et al., 2004; Friedrich AW, et al., 2006]. CDT-V způsobuje poškození lidských mikrovaskulárních endotelových buněk *in vitro* [Bielaszewska M, et al., 2005b; Friedrich AW, et al., 2006], což naznačuje jeho možnou roli k patogenezi HUS. Cytotoxin subtiláza je AB<sub>5</sub> toxin, který byl poprvé popsán u EHEC O113:H21 [Paton AW, et al., 2004] a později identifikován též u řady dalších, především LEE-negativních, EHEC. Po intraperitoneálním podání myším působí subtiláza rozsáhlé mikrovaskulární trombózy a

nekrózy v ledvinách a mozku, které se podobají histopatologickým nálezům u pacientů s HUS [Paton AW, et al., 2004]. Tato pozorování podporují možné přispění subtilázy k mikrovaskulárním změnám při HUS.

### 2.3.2 Adheziny a ostatní potenciální faktory virulence

Střevní kolonizace, která je prvním krokem v patogenezi onemocnění vyvolaných EHEC, je umožněna řadou fimbriálních a nefimbriálních adhezínů [Torres AG, et al., 2005]. Nejlépe prostudovaným adhezínem je intimin, kódovaný *eae* genem, který je lokalizován v ostrůvku patogenity LEE a je hlavní složkou LEE-kódovaného komplexu, který je zodpovědný za tvorbu “attaching and effacing“ lézí na sliznici tlustého střeva [Schmidt MA, 2010]. Existuje více než 20 typů a subtypů *eae*, které byly identifikovány u kmenů enteropatogenních *E. coli* (EPEC) a vyskytují se též u většiny nejčastěji se vyskytujících séroskupin EHEC [Karch H, et al., 2005; Schmidt MA, 2010; Zhang WL, et al., 2002]. Další adheziny EHEC jsou Efa1 (EHEC factor for adherence) [Janka A, et al., 2002], Saa (Stx-producing *E. coli* autoagglutinating adhesin) [Paton AW, et al., 2001], LPF (long polar fimbriae) [Torres AG, et al., 2005], Iha (iron-regulated gene A homologue adhesin) [Tarr PI, et al., 2000], ToxB [Tatsuno I, et al., 2001] a Sfp fimbriae (nový typ fimbrií poprvé identifikován u SF EHEC O157:NM) [Brunner W, et al., 2001].

K dalším potenciálním faktorům, které mohou přispívat k virulenci EHEC, patří sekreční systém typu II [Schmidt H, et al., 1997], *ter* cluster [Yin X, et al., 2009; Bielaszewska M, et al., 2011b], ureáza [Steyert SR a Kaper JB, 2012], siderofor yersiniabactin [Karch H, et al., 1999], a virulenci markery kódovány na ostrovu patogenity OI (O island)-122 (*sen*, *pagC* a *nleB*, *nleE* a *efa1/lifA*) [Wickham ME, et al., 2006].

## 2.4. Epidemiologie EHEC infekcí

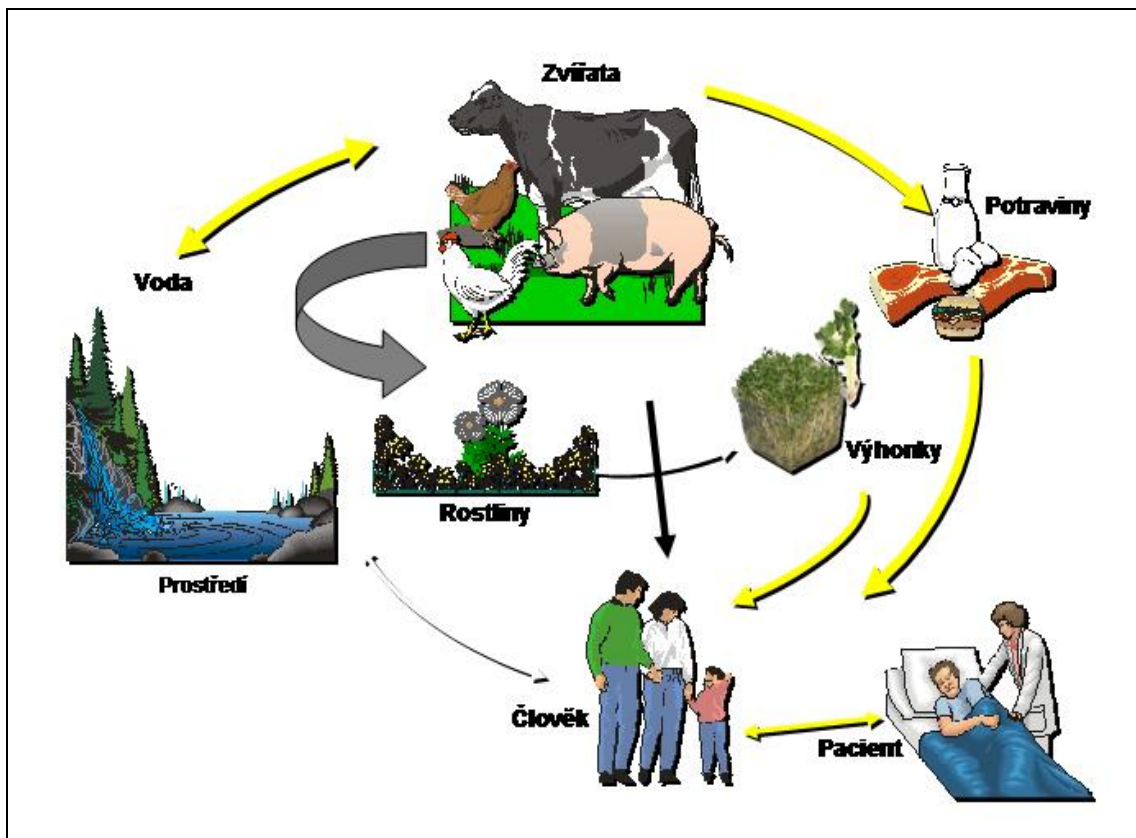
Nejdůležitějším rezervoárem EHEC je hovězí dobytek [Alexa P, et al., 2011; Ambrožová H, Marejková M. 2012; Čížek A, et al., 2008; Karch H, et al., 2005; Čížek A, et al., 1999; Jenkins C, et al., 2003; Hancock DD, et al., 1994; Karmali MA, et al., 2010]. Dále byly EHEC izolovány od ovcí, koz, koní, krys, ptáků a řady dalších zvířat [Ambrožová H, Marejková M, 2012; Karch H, et al., 2005; Čížek A, et al., 1999; Heuvelink AE, et al., 1999; Kudva IT, et al., 1996; Trevena WB, et al., 1996; Mora A,

et al., 2012; Wallace JS, et al., 1997; Karmali MA, et al., 2010]. Klasickým způsobem přenosu EHEC na člověka je konzumace kontaminovaných a tepelně nedostatečně opracovaných potravin živočišného původu, jako jsou nepropečené hamburgery nebo nepasterizované mléko či výrobky z něj [Karch H, et al., 2005; Rangel JM, et al., 2005; Skočková A, et al., 2013a].

Stále častěji se vyskytují lidská onemocnění i po požití potravin rostlinného původu zejména kontaminové syrové zeleniny [Ambrožová H, Marejková M, 2012; Buchholz U, et al., 2011; Karch H, et al., 2005; Rangel JM, et al., 2005; Wendel AM, et al., 2009, Taylor EV, et al., 2013; Skočková A, et al., 2013b].

Do této skupiny patří i epidemie v roce 2011 v Německu, která se šířila po požití kontaminovaných klíčků pískavice - řecké seno, a byla zatím nejzávažnější epidemií EHEC z hlediska klinického průběhu a počtu úmrtí [Buchholz U, et al., 2011; Karch H, et al., 2012]. Původcem této epidemie byl vzácný sérotyp *E.coli* O104:H4, která je hybridem EHEC (produkce Stx2a) a enteroagregativní *E. coli* [Bielaszewska M, et al., 2011]. Tato epidemie postihla přes 4000 osob v 16 zemích Evropy, v USA a Kanadě, z nichž více než 900 onemocnělo HUS a 54 zemřelo [Karch H, et al., 2012; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2013]. Jejimi typickými rysy byla vysoká frekvence progresu do HUS (~22 %), častý výskyt neurologických komplikací a výrazná převaha žen (především mladšího a středního věku) [Frank C, et al., 2011; Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2013; Karch H, et al., 2012].

Tato epidemie jasně ukázala klinický význam tzv. non-O157:H7 EHEC sérotypů. Kromě potravin, i kontaminovaná pitná voda a koupání ve vodních zdrojích kontaminovaných zvířecím trusem vedly ke vzniku epidemií a sporadických infekcí [Feldman KA, et al., 2002; Holme R, et al., 2003, Karch H, et al., 2005; Rangel JM, et al., 2005]. Vzhledem k nízké infekční dávce EHEC (<50 bakterií) [Tilden J Jr, et al., 1996] je důležitým způsobem šíření též fekálně-orální přenos ze zvířete na člověka a z člověka na člověka [Ambrožová H, Marejková M, 2012; Karch H, et al., 2005; Rangel JM, et al., 2005], včetně potenciálního rizika přenosu infekce fekálně-orální cestou od asymptomatických osob [Mody RK, a Griffin PM, 2013]. Hlavní způsoby přenosu infekce EHEC na člověka jsou graficky znázorněny na **obrázku 3** (str.20).



**Obrázek 3. Hlavní způsoby přenosu EHEC infekce na člověka**

[Obrázek kompilován z literárních údajů]

## 2.5. Onemocnění vyvolaná EHEC v České republice

V České republice existuje dlouhodobá tradice průkazu infekcí vyvolaných EHEC. Již v r. 1988, t.j. pouhých 5 let po první literární zprávě o *E. coli* O157:H7 v USA [Riley LW, et al., 1983], byla v České republice identifikována první menší epidemie *E. coli* O157:H7 v České Lípě. Tato epidemie zahrnovala 5 případů HUS u dětí od 4 do 20 měsíců, včetně jednoho úmrtí [Bielaszewska M, Janda J, 1989; Lhotová H, et al., 1990]. Další hromadný výskyt HUS, 4 případy onemocnění u dětí od 10 měsíců do 3 let, byl zaznamenán v létě r. 1995 v okresech Teplice a Ústí nad Labem. Jako způsob přenosu infekce bylo identifikováno pití nepasterizovaného mléka od kozy, která vylučovala v trusu EHEC O157:H7 [Bielaszewska M, et al., 1997].

Česká republika je také zemí, kde byly (kromě Německa), poprvé izolovány SF EHEC O157:NM, a to jako původci sporadických případů HUS [Bielaszewska M, et al., 1998] a rodinné epidemie s případy HUS a průjmu, kde byl stejný kmen izolován od

krávy a jednalo se tak o ve světě první popsany důkaz, že dobytek může být rezervoárem kmenů SF EHEC O157:NM a tedy zdrojem humánních onemocnění [Bielaszewska M, et al., 2000]. Úspěchem české mikrobiologie v oblasti diagnostiky EHEC byl i záchyt německého epidemického kmene *E. coli* O104:H4 v Národní referenční laboratoři (NRL) pro *E. coli* a shigely SZÚ v květnu 2011. Americká turistka, která jej získala při pobytu v Severním Německu v době epidemie, byla s krvavým průjmem hospitalizována v pražské nemocnici [Marejková M, et al., 2012]. Výsledky nedávné studie prevalence EHEC u dobytka v České republice potvrdily důležitost monitorování těchto agens v souladu s prioritami European Food Safety Authority (EFSA) a European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Ve vybrané populaci zdravého dobytka byla zjištěna vysoká incidence EHEC, které patřily k 5 séro skupinám (O157, O26, O103, O128, O153) [Alexa P, et al., 2011], z nichž první tři patří mezi nejčastější vyvolavatele HUS [Karch H, et al., 2005].

### 3. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem dizertační práce bylo zjistit fenotypové a genotypové charakteristiky EHEC izolovaných od pacientů s průjmem a HUS v České republice a nalézt jejich vztah k závažnosti onemocnění. Z preventivního aspektu bylo důležité zavést rychlou a zároveň spolehlivou laboratorní diagnostiku EHEC ve stolicích pacientů, včetně izolace etiologického agens a podrobné typizace Stx-kódujících genů (*stx*). Protože typ Stx produkovaný infikujícím kmenem je kritickým faktorem pro progresi infekce do HUS, co nejrychlejší sdělení výsledku umožňuje ošetřujícímu lékaři zvolení správné terapie a může tak zabránit rozvoji HUS nebo alespoň zmírnit jeho klinický průběh. Dalším záměrem z hlediska prevence bylo dohledávání asymtomatických nosičů EHEC v rodinách pacientů, kteří jsou potenciálními zdroji šíření infekce, dále identifikace možných zdrojů a vehikul infekce. Dílčí cíle byly definovány takto:

1. zavést citlivé metody záchytu kmenů EHEC ve stolicích pacientů s průjmem a HUS a zkvalitnit tak laboratorní diagnostiku těchto patogenů v České republice;
2. zavést metody detekce a subtypizace *stx* genů (PCR, restriction fragment length polymorphism - RFLP);
3. zavést molekulární sérotypizaci EHEC, tj. identifikaci jejich somatických a flagelárních antigenů pomocí PCR a RFLP;
4. zjistit sérotypy, *stx* genotypy a další faktory virulence, diagnosticky důležité fenotypy a citlivost k antibiotikům u kmenů EHEC izolovaných od pacientů s průjmem a HUS čerstvě, t.j. v období od roku 2006 a v předchozích letech (od roku 1965), u kmenů EHEC, které byly uchovávány v laboratorní sbírce NRL pro *E. coli* a shigely;
5. ve spolupráci s orgány Ochrany veřejného zdraví (krajskými a dalšími epidemiology) provádět skríníng EHEC u rodinných kontaktů pacientů a pokusit se odhalit možné zdroje infekce EHEC;
6. fylogenetickou analýzou kmenů EHEC od pacientů s HUS zařadit získaná data do evropského kontextu;
7. zmapovat geografickou a sezónní distribuci EHEC v České republice.

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Definice onemocnění, pacienti, vzorky humánního a nonhumánního původu a bakteriální kmeny

HUS byl definován jako případ mikroangiopatické hemolytické anemie (hematokrit < 30 % s nálezem schistocytů v krevním nátěru), trombocytopenie (počet krevních destiček <150.000/mm<sup>3</sup>) a akutního renálního selhání (hladina sérového kreatininu vyšší než je horní limit normálního rozmezí pro daný věk).

Průjem byl definován jako tři nebo více řídkých stolic za den a krvavý průjem jako průjem s viditelnou příměsí krve ve stolici.

V souvislosti s onemocněním HUS byly analyzovány v letech 1998 až 2012 na přítomnost infekce EHEC vzorky stolic od 56 pediatrických pacientů. Jednalo se o sporadické případy onemocnění; pacienti byli ve věku 10-85 měsíců (medián 27,5 měsíců), pocházeli z různých regionů České republiky a 61 % z nich byli chlapci.

Čtyřicet dva kmenů EHEC pocházelo od pacientů s průjmem nebo krvavým průjmem bez progresu do HUS. Tyto byly zaslány do NRL pro *E. coli* a shigely jako izoláty *E. coli* určené séro skupiny k průkazu Stx. Jeden další kmen byl izolován v NRL ze vzorku stolice pacientky, která byla infikována německým epidemickým kmenem *E. coli* O104:H4. Pacienti s průjmovým onemocněním byli ve věku 0-62 let (medián 2 roky) a 18 z nich bylo hospitalizováno. V souvislosti s epidemiologickým šetřením bylo k průkazu EHEC zasláno do NRL 68 vzorků humánního a nonhumánního původu včetně 33 vzorků stolic od rodinných kontaktů, dále vzorky feces od zvířat, vzorek vody, a izoláty *E. coli* z písku na dětském hřišti a z vody.

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Detekce kmenů EHEC ve vzorcích

Vzorky stolic od pacientů s HUS, rodinných kontaktů a zvířat byly pomnoženy v Hajna bujonu (Conda, Španělsko) s novobiocinem (Oxoid, Velká Británie) po dobu 5–7 hodin (37 °C, třepání 150–180 rpm). Následně byla provedena imunomagnetická separace (IMS) pomocí Dynabeads EPEC/VTEC O157, O26, O111, O145 a O103 (DynaL, Norsko) dle pokynů výrobce. Pomnožené vzorky zpracovány IMS, a paralelně i pomnožené vzorky nepodrobené IMS, byly kultivovány (37 °C přes noc) na pevných selektivních a diagnostických médiích usnadňujících záchyt EHEC, t.j. na sorbitol MacConkey agaru (SMAC) (Oxoid), cefixim-teluritovém SMAC agaru (CT-SMAC)

(Oxoid), enterohemolyzinovém (EHLY) agaru (Oxoid), a též na klasickém krevním agaru (Columbia, Oxoid). Narostlá kultura z každé plotny byla stažena do 1 ml fyziologického roztoku. 100 ul suspenze bylo naředěno v poměru 1:10 sterilní destilovanou vodou, zahříváno 10 minut při 100 °C a poté zcentrifugováno (12000 rpm, 10 minut). Supernatant (surová bakteriální DNA) byl templátem pro PCR detekci *stx* genů (*stx*<sub>1a</sub> s použitím primerů KS7/KS8, *stx*<sub>2a</sub> s použitím primerů LP43/LP44, *stx*<sub>2f</sub>), genu *eae* kódujícího adhezín intimin a genů *rfb*<sub>O157</sub>, *O26wzy*, *wbdI* (O111), *ihp1* (O145) a *eae* (O103), kódujících somatické (O) antigeny nejčastěji se vyskytující u EHEC vyvolávajících lidská onemocnění (O157, O26, O111, O145 a O103).

Ze vzorků, které byly *stx*-pozitivní v PCR skríníngu, byly kmeny izolovány na základě: **A)** typických fenotypů nejčastějších séroskupin EHEC (NSF O157 rostou v sorbitol-negativních koloniích na SMAC a CT-SMAC; O26, O111, O145 a O103 produkují EHEC hemolyzín, který vyvolává neúplnou hemolýzu na EHLY agaru) v kombinaci se sklíčkovou aglutinací kolonií k průkazu O antigenu detekovaného PCR skríníngem; **B)** v případě přítomnosti neobvyklých séroskupin EHEC (tj. když vzorek byl negativní na O157, O26, O111, O145 a O103 antigeny) pomocí PCR skríníngu *stx* genů u několika kolonií narostlých na výše uvedených médiích, izolací *stx*-pozitivního kmene a následnou sklíčkovou aglutinací.

Při podezření na importovanou nákazu německým epidemickým kmenem (viz kapitola 5.3 a příloha 10.3) byl pomnožený vzorek stolice inokulován kromě klasických pevných médií usnadňujících záchyt EHEC (SMAC, CT-SMAC, EHLY) i na selektivní půdu Brilliance ESBL Agar (Oxoid).

Vzorek vody o objemu 5 litrů byl přefiltrován membránovým filtrem (velikost pórů 0.45 µm) a filtr byl dále zpracován stejným způsobem jako stolice.

#### 4.2.2 Sérotypizace kmenů EHEC

U všech *stx*-pozitivních kmenů byl prováděn fenotypový průkaz O antigenu a bičíkového (H) antigenu aglutinací s komerčními antiséry (Denka Seiken, Japonsko; Sifin, Německo; SSI, Dánsko; Robert Koch Institute, Německo) dle návodu výrobce. Přítomnost O antigenů detekovaných konvenční sérotypizací (O26, O55, O111, O118, O145, O157, O172 a O104) byla ověřena PCR detekcí genů *O26wzy*, *wbgN* (O55), *wbdI* (O111), *O118wzx*, *ihp1* (O145), *rfb*<sub>O157</sub>, *wzx*<sub>O172</sub>, *rfb*<sub>O104</sub>. *fliC* geny kódující hlavní podjednotku H antigenu byly subtypovány metodou RFLP (restriction fragment length



polymorphism) pomocí restriční endonukleázy *HhaI* (New England Biolabs, USA) podle dříve popsáných postupů [Machado J, et al., 2000].

#### 4.2.3 Fenotypizace kmenů EHEC

Izoláty byly potvrzeny jako *E. coli* biochemicky setem API 20E (bioMérieux, Francie) a pomocí MALDI-TOF analýzy (Microflex LT, Bruker Daltonics, Německo). Pohyblivost byla zjišťována zkumavkovou metodou s použitím 0,5% agaru a sledována po dobu 10 dnů. Schopnost kmenů okyselovat sorbitol byla testována na médiu SMAC a rezistence k teluritu na CT-SMAC. Fermentace sorbitolu bylo ověřeno pomocí API 20E testu, který byl též použit k průkazu fermentace ramnózy, produkce lyzin dekarboxylázy a ureázy. Produkce  $\beta$ -D-glukuronidázy byla detekována pomocí COLtestu (Erba Lachema, Česká republika). Produkce EHEC hemolyzinu byla testována na EHLy agaru a schopnost hemolýzy na Columbia krevním agaru, po inkubaci přes noc. Produkce Stx1a a Stx2a byla detekována reverzní pasivní aglutinací s latexovými částicemi senzibilizovanými anti-Stx1a nebo anti-Stx2a protilátkou pomocí kitu VTEC-RPLA Seiken (Denka Seiken, Japonsko). Biologická aktivita Stx byla ověřena testem cytotoxicity na buněčné kultuře Vero [Karmali MA, et al., 1985].

#### 4.2.4 Citlivost k antibiotikům

Citlivost kmenů EHEC ke 12 antibiotikům (ampicilinu, cefotaximu, ceftazidimu, gentamicinu, trimethoprim/ sulfamethoxazolu, ciprofloxacinu, amikacinu, meropenemu, piperacilin/tazobactamu, tigecyclinu, chloramfenikolu a nitrofurantoinu) byla zjišťována pomocí diskové difuzní metody (disky Oxoid) s použitím standardních postupů [EUCAST, 2013].

#### 4.2.5 Genotypizace kmenů EHEC

PCR reakce byly prováděny na přístroji MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) použitím reagensí PPP Master mix a PCR Ultra H<sub>2</sub>O od firmy Top-Bio (Česká republika). Primery jsme získali od společnosti Generi Biotech (Česká republika). Všechny kmeny byly testovány na přítomnost genů *stx*<sub>1a</sub>, *stx*<sub>2a</sub> a jejich subtypů pomocí PCR nebo PCR-RFLP [Scheutz et al., 2012; Friedrich et al., 2002]. Subtypy *stx*<sub>2a</sub> a *stx*<sub>2c</sub>/*stx*<sub>2d</sub> byly rozlišeny pomocí RFLP PCR produktu amplifikovaného primery GK3/GK4 s použitím restriční endonukleázy *HaeIII* (New England Biolabs) [Friedrich AW, et al., 2002].

Metodou PCR byly u kmenů zjišťovány geny kódující další toxiny (*cdt-V*, EHEC-*hlyA*,  $\alpha$ -*hlyA*), serin proteázu EspP (*espP*), adheziny (*eae*, *efa1*, *lpfA*<sub>O26</sub>, *lpfA*<sub>O157OI-141</sub>, *lpfA*<sub>O157OI-154</sub>, *iha*, *sfpA*), sekreční systém typu II (*etpD*), rezistenci k teluritu (*terE*), produkci ureázy (*ureD*), příjem železa (*irp2*, *fyuA*) a geny na ostrůvku patogenity OI-122 (*sen*, *pagC*, *nleB*, *nleE*). Geny *eae* a *espP* byly subtypovány pomocí publikovaných postupů [Zhang et al., 2002; Blanco et al., 2004; Brockmeyer et al., 2007]. U epidemického kmene *E. coli* O104:H4 byl testován gen *aggA* (kódující agregativní typ adherence) a *terD*.

Přehled použitých primerů a PCR podmínky, včetně literárních zdrojů, pro detekci antigenů a faktorů virulence kmenů EHEC jsou uvedeny v **Tabulce 1**. Reakce probíhaly jako duplex PCR (detekovaný gen + interní kontrola 16S rDNA) v objemu 25  $\mu$ l. Reakční směs obsahovala 12,5  $\mu$ l PPP Master mix, 0,5  $\mu$ l každého primeru o koncentraci 30 pmol, 1  $\mu$ l bakteriální DNA kmene purifikované pomocí InstaGene Matrix (Bio-Rad) a PCR Ultra H<sub>2</sub>O do výsledného objemu 25  $\mu$ l. V případě, že templát pro PCR byla surová bakteriální DNA (získaná postupem viz kapitola 4.2.2.), přidávala se do reakční směsi v objemu 2,5  $\mu$ l. PCR produkty byly detekovány elektroforézou v 2% agarózovém gelu (agaróza SERVA, Německo) a vizualizovány pod UV světlem po obarvení PCR ethidium bromidem (Top-Bio).

#### 4.2.6 Pulzní gelová elektroforéza (PFGE)

Kmeny izolované v epidemiologické souvislosti (rodinné výskyty, přenos infekce ze zvířete na člověka) byly podrobeny makrorestrikční analýze pomocí PFGE. PFGE bakteriální DNA štěpené makrorestrikčním enzymem *XbaI* (Promega, USA) byla provedena podle protokolu PulseNet [Ribot EM, et al., 2006]. Pulzní profily byly vyhodnoceny pomocí softwaru BioNumerics (verze 5.1).

#### 4.2.7 Multilokusová sekvenční analýza (MLST)

MLST byla provedena pomocí sekvencování vnitřních fragmentů 7 housekeeping genů (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* a *recA*) pomocí dříve popsané metody [Mellmann et al., 2008]. Sekvence byly analyzovány a „minimum-spanning tree“ byl vytvořen s použitím softwaru SeqSphere (verze 0.9 beta 1) (Ridom GmbH, Münster, Německo). Alely jednotlivých genů a sekvenční typy (ST), tj. specifické kombinace alel všech 7 housekeeping genů, byly označeny v souladu s webovou stránkou pro MLST (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>).

**Tabulka 1: Přehled primerů použitých pro detekci antigenů a faktorů virulence kmenů EHEC metodou PCR**

Primer	Sekvence (5' - 3')	Cílový gen	PCR podmínky <sup>a</sup>		PCR produkt (bp)	Reference
			Annealing teplota	Počet cyklů		
LP43 LP44	ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C	<i>stx</i> <sub>2</sub> A (subtypy <i>stx</i> <sub>2</sub> <sup>b</sup> , <i>stx</i> <sub>2c</sub> , <i>stx</i> <sub>2d</sub> ACT, <i>stx</i> <sub>2d</sub> <sup>d</sup> , <i>stx</i> <sub>2e</sub> )	57°C	30	584	Friedrich AW, et al., 2002
KS7 KS8	CCC GGA TCC ATG AAA ACA TTA TTA ATA GC CCC GAA TTC AGC TAT TCT GAG TCA ACG	<i>stx</i> <sub>1</sub> B (subtypy <i>stx</i> <sub>1</sub> <sup>e</sup> a <i>stx</i> <sub>1e</sub> )	57°C	30	282	Friedrich AW, et al., 2002
<i>stx</i> <sub>1a</sub> -F1 <i>stx</i> <sub>1a</sub> -R2	CCT TTC CAG GTA CAA CAG CGG TT GGA AAC TCA TCA GAT GCC ATT CTG G	<i>stx</i> <sub>1a</sub>	66°C	35	478	Scheutz F, et al. 2012
<i>stx</i> <sub>1c</sub> -F1 <i>stx</i> <sub>1c</sub> -R1	CCT TTC CTG GTA CAA CTG CGG TT CAA GTG TTG TAC GAA ATC CCC TCT GA	<i>stx</i> <sub>1c</sub>	66°C	35	252	Scheutz F, et al. 2012
GK3 GK4	ATG AAG AAG ATG TTT ATG TCA GTC ATT ATT AAA CTG	<i>stx</i> <sub>2</sub> B <sup>b</sup> , <i>stx</i> <sub>2e</sub> B, <i>stx</i> <sub>2d</sub> ACTB <sup>e</sup>	51°C	30	260	Friedrich AW, et al., 2002
VT2-cm VT2-f	AAG AAG ATA TTT GTA GCG G TAA ACT GCA CTT CAG CAA AT	<i>stx</i> <sub>2d</sub> B <sup>d</sup>	55°C	30	256	Friedrich AW, et al., 2002
<i>stx</i> <sub>2c</sub> -F1 <i>stx</i> <sub>2c</sub> -R2	GAA AGT CAC AGT TTT TAT ATA CAA CGG GTA CCG GCC ACY TTT ACT GTG AAT GTA	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	65°C	35	177	Scheutz F, et al. 2012
<i>stx</i> <sub>2d</sub> -F1 <i>stx</i> <sub>2d</sub> -R1	AAA RTC ACA GTC TTT ATA TAC AAC GGG TG TTYCCGGCCACTTTTACTGTG	<i>stx</i> <sub>2d</sub>	65°C	35	179	Scheutz F, et al. 2012
<i>stx</i> <sub>2d</sub> -F1 <i>stx</i> <sub>2d</sub> -R2	AAA RTC ACA GTC TTT ATA TAC AAC GGG TG GCC TGA TGC ACA GGT ACT GGA C	<i>stx</i> <sub>2d</sub>	65°C	35	280	Scheutz F, et al. 2012
FK1 FK2	CCC GGA TCC AAG AAG ATG TTT ATA G CCC GAA TTC TCA GTT AAA CTT CAC C	<i>stx</i> <sub>2c</sub> B	55°C	30	280	Friedrich AW, et al., 2002
128-1 128-2	AGA TTG GGC GTC ATT CAC TGG TTG TAC TTT AAT GGC CGC CCT GTC TCC	<i>stx</i> <sub>2d</sub> A	55°C	30	428	Friedrich AW, et al., 2002
SK1 SK2	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC CCC GGA TCC GTC TCG CCA GTA TTC G	<i>eae</i>	57°C	30	863	Schmidt H, et al., 1994
SK1 LP4	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC CCC GTG ATA CCA GTA CCA ATT ACG GTC	<i>eae</i> β	51°C	25	2287	Zhang WL, et al., 2002
SK1 LP3	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC CCC GAA TTC TTA TTC TAC ACA AAC CGC	<i>eae</i> γ	54°C	25	2792	Zhang WL, et al., 2002

Tabulka pokračuje na straně 28

Primer	Sekvence (5' - 3')	Cílový gen	PCR podmínky <sup>a</sup>		PCR produkt (bp)	Reference
			Annealing teplota	Počet cyklů		
EAE-FB LP5	AAA ACC GCG GAG ATG ACT TC AGC TCA CTC GTA GAT GAC GGC AAG CG	<i>eae ε</i>	66°C	35	722	Blanco JE, et al., 2004
EAE-FB EAE-C2	AAA ACC GCG GAG ATG ACT TC CTG ATA TTT TAT CAG CTT CA	<i>eae γ2/θ</i>	58°C	35	808	Blanco JE, et al., 2004
Iha-I Iha-II	CAG TTC AGT TTC GCA TTC ACC GTA TGG CTC TGA TGC GAT G	<i>iha</i>	56°C	30	1305	Toma C, et al., 2004
IpfAO26-1 IpfAO26-2	CCG CTT GTG TTG TGT CTC C AGC AGA TTT ACC AGT ATT CA	<i>IpfAO26</i>	50°C	30	296	Bielaszewska M, et al., 2005c
IpfO141-F IpfO141-R	CTG CGC ATT GCC GTA AC ATT TAC AGG CGA GAT CGT G	<i>IpfAO157/OI-141</i>	55°C	30	412	Toma C, et al., 2004
O154-FCT O154-RCT	GCA GGT CAC CTA CAG GCG GC CTG CGA GTC GGC GTT AGC TG	<i>IpfAO157/OI-154</i>	59°C	30	525	Toma C, et al., 2004
E643f E1598r	TAT CAG GCC AAT CAA AAC AG AGA CAC TGG TAA ATT TCG C	<i>efal-1</i>	57°C	30	974	Janka A, et al., 2002
E5242f E5854r	TAA GCG AGC CCT GAT AAG CA CGT GTT GCT JGC CTT JGC	<i>efal-2</i>	57°C	30	630	Janka A, et al., 2002
E7044f E7710r	TGT CTA ACT GGA TTG TAT GGC ATG TTG TTC CCG GCC CAG T	<i>efal-3</i>	57°C	30	685	Janka A, et al., 2002
sfpA-U sfpA-L	AGC CAA GGC CAA GGG ATT ATT A TTA GCA ACA GCA GTG AAG TCT C	<i>sfpA</i>	57°C	30	440	Friedrich AW, et al., 2004
c338f c2135r	AGC ATT AAA TAA AAG CAC GA TAC TTG CTG TGG TCT GCT AT	<i>cdt-VA</i>	52°C	30	1329	Bielaszewska M, et al., 2004
c1309f c2166r	AGC ACC CGC AGT ATC TTT GA AGC CTC TTT TAT CGT CTG GA	<i>cdt-VB</i>	52°C	30	1363	Bielaszewska M, et al., 2004
P105 c2767r	GTC AAC GAA CAT TAG ATT AT ATG GTC ATG CTT TGT TAT AT	<i>cdt-VC</i>	57°C	30	748	Bielaszewska M, et al., 2004
hly-F hly-R	AAC AAG GAT AAG CAC TGT TCT GGC T ACC ATATAA GCG GTC ATT CCC GTC A	<i>α-hlyA</i>	63°C	30	1177	Chapman TA, et al. 2006
Z4326-a Z4326-b	GGA TGG AAC CAT ACC TGG CGC AAT CAA TTG CTA ATG C	<i>sen</i>	57°C	30	551	Karmali MA, et al., 2003
NleB-f NleB-r	GGT GTG CTG GTA GAT GGA CAG GGT ATG ATT CTT GTT TAT G	<i>nleB</i>	53°C	35	175	Bielaszewska M, et al., 2007

Tabulka pokračuje na straně 29

Primer	Sekvence (5' - 3')	Cílový gen	PCR podmínky <sup>a</sup>		PCR produkt (bp)	Reference
			Annealing teplota	Počet cyklů		
NleE-f NleE-r	CTA ATA CTC AGG GCG TGT CC ACC GTC TGG CTT TCT CGT TA	<i>nleE</i>	53°C	35	192	Bielaszewska M, et al., 2007
Z4321-a Z4321-b	ATG AGT GGT TCA AGA CTG G CCA ACT CCA ACA GTA AAT CC	<i>pagC</i>	55°C	30	521	Karmali MA, et al., 2003
hlyAF hlyAR	GCA TCA TCA AGC GTA CGT TCC AAT GAG CCA AGC TGG TTA AGC T	EHEC- <i>hlyA</i>	57°C	30	534	Paton AW, et al., 1998
esp-A esp-B	AAA CAG CAG GCA CTT GAA CG GGA GTC GTC AGT CAG TAG AT	<i>espP</i>	56°C	30	1830	Brunder W, et al., 1999
espPa-1 espPa-2	CAA AAG CAA CCA TAG AGA AC ATT TTG TCA TCG GTT TCC CT	<i>espPa</i>	64°C	35	763	Brockmeyer J, et al., 2007
espPβγ-1 espPβ-2	CAC AGC AGA AGA CAG CAC TAT TAT TTT GTC ATC GGT TTC CTG	<i>espPβ</i>	68°C	35	841	Brockmeyer J, et al., 2007
espPβγ-1 espPγ-2	CAC AGC AGA AGA CAG CAC TAT ATC TTT ACT GCT GTT CCC CG	<i>espPγ</i>	63°C	35	757	Brockmeyer J, et al., 2007
espPδ-1 espPδ-2	TAC GTC AAC CAA AAA GTC CG TAG TGC TGT CTT CTG CTG TG	<i>espPδ</i>	68°C	35	635	Brockmeyer J, et al., 2007
katP-1 katP-2	GGC GGA AGA GAA GAT GAC TG GCC ACA GTC TCC TCA TCA TC	<i>katP</i>	55°C	30	236	Bielaszewska M, et al., 2009
D1 D13R	CGT CAG GAG GAT GTT CAG CGA CTG CAC CTG TTC CTG ATT A	<i>etpD</i>	56°C	30	1062	Schmidt H, et al., 1997
TerE1 TerE2	TAA AAG GCG GCA ACG TAT CTC TGA CCG TCC CGT TGT CGT TGT TGT AA	<i>terE</i>	55°C	30	353	Taylor D, et al., 2002
UreD-f UreD-r	CGT CAT CAT GTC GGT CTG CTC A GCG TGG CTC CGG CGT AGT TTT	<i>ureD</i>	58°C	30	569	Friedrich AW, et al., 2005
Irp2 FP Irp2 RP	AAG GAT TCG CTG TTA CCG GAC TCG TCG GGC AGC GTT TCT TCT	<i>irp2</i>	57°C	30	280	Karch H, et al., 1999
FyuA f FyuA r	TGA TTA ACC CCG CGA CGG GAA CGC AGT AGG CAC GAT GTT GTA	<i>fyuA</i>	63°C	30	880	Johnson JR, et al., 2000
TerD1 TerD2	AGT AAA GCA GCT CCG TCA AT CCG AAC AGC ATG GCA GTC T	<i>terD</i>	55°C	30	434	Bielaszewska M, et al., 2011b
aggA-F aggA-R	AAA TAT GAG AAG AAA GAA AAA AAT TAA TTC CGG TAT GG	<i>aggA</i>	50°C	35	500	Boisen N, et al., 2008

Tabulka pokračuje na straně 30

Primer	Sekvence (5' - 3')	Cílový gen	PCR podmínky <sup>a</sup>		PCR produkt (bp)	Reference
			Annealing teplota	Počet cyklů		
FSa1	CAA GTC ATT AAT AC(A/C) AAC AGC C	<i>fliC</i>	60°C	30	1400-1600	Machado J, et al., 2000
rFSa1	GAC AT(A/G) TT(A/G) GA(G/A/C) ACT TC(G/C) GT					
O157F	CGG ACA TCC ATG TGA TAT GG	<i>rjb0157</i>	57°C	30	259	Paton AW, et al., 1998
O157R	TTG CCT ATG TAC AGC TAA TCC					
O26wzy1	CAT TCA ACT ACG CTA GAG CAA	O26wzy	55°C	30	977	D'Souza JM, et al., 2002
O26wzy2	TCA TAA TGA GTA TGG TAA CCC					
wbgN (O55)-F	TGT AAT TCG ATG CAC CAA TTC AG	<i>wbgN</i> (O55)	57°C	30	70	Perelle S, et al., 2004
wbgN (O55)-R	CGC TTC GAC GTT CGA TAC ATA A					
wbdI (O111)-F	CGA GGC AAC ACA TTA TAT AGT GC TTT	<i>wbdI</i> (O111)	57°C	30	146	Perelle S, et al., 2004
wbdI (O111)-R	TTT TTG AAT AGT TAT GAA CAT CTT GTT TAG C					
ihp1 (O145)-F	CGA TAA TAT TTA CCC CAC CAG TAC AG	<i>ihp1</i> (O145)	57°C	30	132	Perelle S, et al., 2004
ihp1 (O145)-R	GCC GCC GCA ATG CTT					
eae (O103)-F	GCTGAGGCAACATGTAGAATGAA	<i>eae</i> (O103)	57°C	30	137	Perelle S, et al., 2004
eae (O103)-R	TGTGTCCATGCTGTATTGTTTTT					
wzxO172-1	ATC GCG GGC ATG TTT GTT TT	<i>wzxO172</i>	60°C	30	745	Guo H, et al., 2004
wzxO172-2	AAT CGC AAC CAA TGC TCC CT					
O104rfb O-f	TGA ACT GAT TTT TAG GAT GG	<i>rjb0104</i>	55°C	30	351	Bielaszewska M, et al., 2011a
O104rfb O-r	AGA ACC TCA CTC AAA TTA TG					
fliCH4-a	GGC GAA ACT GAC GGC TGC TG	<i>fliC<sub>H4</sub></i>	55°C	30	201	Bielaszewska M, et al., 2011a
fliCH4-b	GCA CCA ACA GTT ACC GCC GC					
O118wzx-F	GTG GGA GTC TGA ATC AAG TTG CGA	O118wzx	52°C	30	344	Liu Y, et al., 2008
O118wzx-R	AGC AAC CTT ACC CAA TCC TAA GGG					
P11P(f)	GAG GAA GGT GGG GAT GAC GT	16S rDNA	57°C	30	216	Crothers 2004
P13P(R)	AGG CCC GGG AAC GTA TTC AC					

<sup>a</sup> PCR podmínky (počáteční denaturace, počet cyklů amplifikace, denaturace, annealing, extenze a finální extenze) byly převzaty z literatury nebo podle potřeby optimalizovány v naší laboratoři.

<sup>b</sup> dle současné nomenklatury [Scheut F, et al., 2012] amplifikovaný produkt odpovídá *stx<sub>2a</sub>*.

<sup>c</sup> dle současné nomenklatury amplifikovaný produkt odpovídá *stx<sub>2a</sub>*.

<sup>d</sup> dle současné nomenklatury amplifikovaný produkt odpovídá *stx<sub>2b</sub>*.

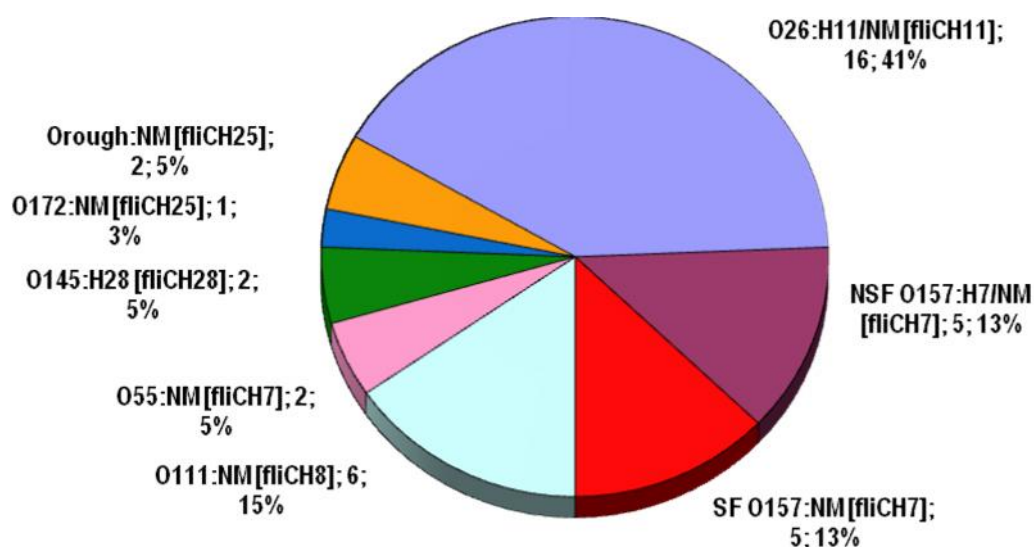
<sup>e</sup> dle současné nomenklatury amplifikovaný produkt odpovídá *stx<sub>1a</sub>*.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Výsledky studie „*Enterohemorrhagic Escherichia coli* as Causes of Hemolytic Uremic Syndrome in the Czech Republic“ [viz Příloha 10.1]

V první studii, která byla publikována v roce 2013 v časopisu PLoS ONE, jsou prezentovány sérotypy, virulenci profily, diagnosticky významné fenotypy, antimikrobiální citlivost, sezónní distribuce a výsledky fylogenetické analýzy kmenů EHEC izolovaných od dětských pacientů s HUS během let 1998–2012 v České republice. Tři pacienti (ve věku 18, 25 a 30 měsíců) zemřeli v průběhu akutní fáze HUS, vyvolané ve dvou případech EHEC O26, a v jednom případě SF EHEC O157.

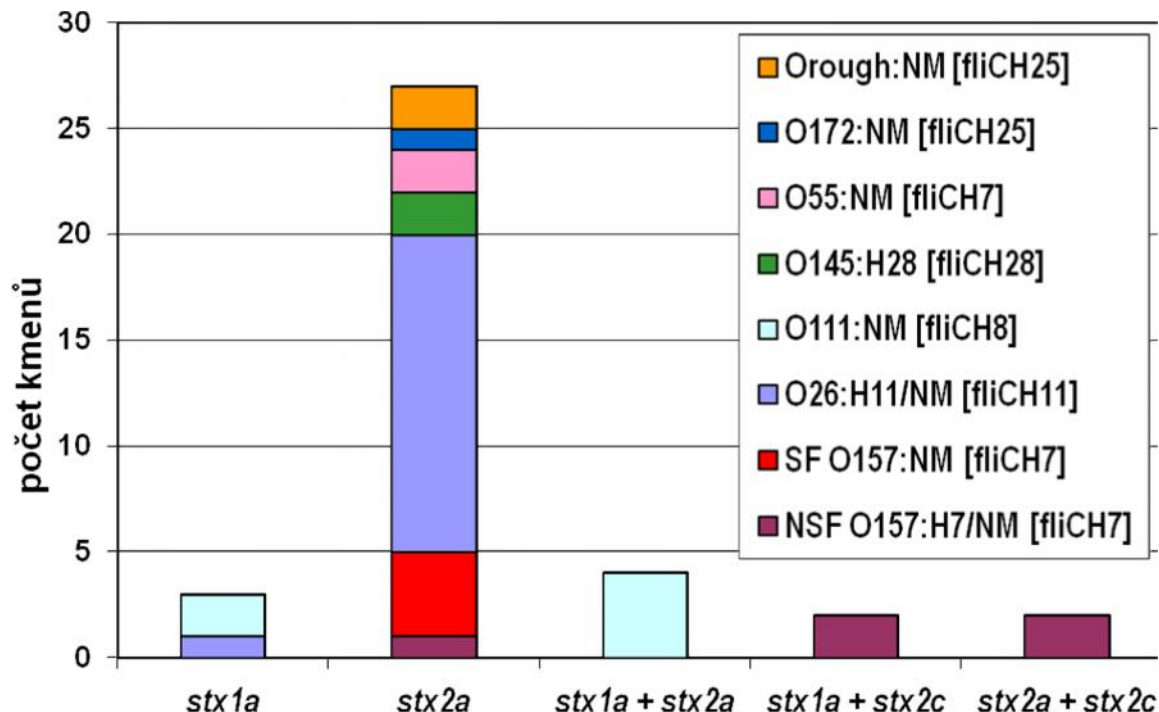
Kmeny EHEC byly prokázány ve stolici 39 (70 %) z celkového počtu 56 pacientů. Nejčastějším sérotypem byl O26:H11/NM[*fliC*<sub>H11</sub>] (41 % kmenů), potom následovaly O111:NM[*fliC*<sub>H8</sub>] (15 %), NSF O157:H7/NM[*fliC*<sub>H7</sub>] (13 %) a SF O157:NM[*fliC*<sub>H7</sub>] (13 %). Dále byly identifikovány sérotypy O55:NM[*fliC*<sub>H7</sub>], O145:H28[*fliC*<sub>H28</sub>], O172:NM[*fliC*<sub>H25</sub>], který se vyskytuje u HUS velice vzácně, a Orough:NM[*fliC*<sub>H25</sub>] (Orough – O antigen pro spontánní aglutinaci netytovatelný) (**Graf 1**). U všech kmenů byla přítomnost určeného O antigenu ověřena pomocí PCR.



**Graf 1:** Distribuce kmenů EHEC izolovaných od pacientů s HUS v České republice, 1998-2012, podle sérotypů (n = 39)

Více než třetina kmenů séroskupiny O26, dále 2 kmeny NSF O157, a všechny SF O157, O111, O55, Orough a O172 byly nepohyblivé, proto nebylo možné dourčit H antigen konvenční sérotypizací. Molekulární typizace H antigenu pomocí *fliC*-RFLP analýzy prokázala, že nepohyblivé kmeny O157 a O26 obsahovaly *fliC*<sub>H7</sub>, resp. *fliC*<sub>H11</sub>, stejně jako i pohyblivé kmeny těchto séroskupin. Podobně umožnila *fliC*-RFLP analýza spolehlivě určit H antigen u všech nepohyblivých kmenů ostatních séroskupin. Kmeny O172 a Orough obsahovaly *fliC*<sub>H25</sub>.

Všechny kmeny (kromě jednoho SF O157, který ztratil *stx* gen) produkovaly Stx. V souboru bylo identifikováno pět různých *stx* genotypů (**Graf 2**). Genotyp *stx*<sub>2a</sub> byl přítomen u všech kmenů séroskupin O55, O145, Orough, většiny kmenů SF O157 a O26 a kmene O172. Genotyp *stx*<sub>2a</sub> nebo *stx*<sub>2a</sub>+*stx*<sub>2c</sub> byl zjištěn u celkem 29 (76 %) kmenů, *stx*<sub>1a</sub> samotně nebo v kombinaci s *stx*<sub>2a</sub> nebo *stx*<sub>2c</sub> u ostatních 9 kmenů (24 %) (Graf 2). Čtyři z pěti NSF O157 obsahovaly *stx*<sub>2c</sub> v kombinaci s *stx*<sub>1a</sub> nebo *stx*<sub>2a</sub>. Kmeny séroskupiny O111 měly nejčastěji genotyp *stx*<sub>1a</sub>+*stx*<sub>2a</sub>. Celkově tyto výsledky ukazují, že kmeny s produkcí Stx<sub>2a</sub>, samotného nebo spolu s Stx<sub>2c</sub>, vyvolávají významně častěji závažnou formu onemocnění, t.j. HUS, než kmeny s produkcí Stx<sub>1a</sub> nebo Stx<sub>1a</sub>+Stx<sub>2a</sub>/Stx<sub>2c</sub>.



**Graf 2: Distribuce kmenů EHEC jednotlivých sérotypů izolovaných od pacientů s HUS v České republice, 1998–2012, podle *stx* genotypů (n = 38; jeden SF O157:NM kmen ztratil *stx* gen)**



Z genů kódujících non-Stx toxiny EHEC byl EHEC-*hlyA*, kódující EHEC hemolyzin, přítomen u kmenů všech séro skupin s výjimkou O55. Na rozdíl od NSF O157, kmeny SF O157 neexprimovaly EHEC hemolyzin na EHLV agaru. Gen *cdt-V*, kódující cytoletální distendující toxin typu V, byl prokázán u jednoho z pěti NSF O157 kmenů a u všech pěti SF O157. Subtypizací *espP* genu kódujícího serin proteázu EspP byl u kmenů séro skupin NSF O157, O26 a O145 zjištěn subtyp *espPa*, kódující silně proteolytickou formu EspP, zatímco kmeny O172 a Orough obsahovaly subtyp *espPγ*. Dále byly sledovány geny kódující adheziny. Všechny kmeny měly gen *eae*, jehož subtypy byly sérotyp-specifické. U kmenů Orough a vzácné séro skupiny O172 byl prokázán subtyp *eae* ε. Geny kódující další adheziny (*efa1*, *lpfA*<sub>O26</sub>, *lpfA*<sub>O157O1-141</sub>, *lpfA*<sub>O157O1-154</sub>, *iha*) byly obvykle spojeny s konkrétním sérotypem, kmeny O172 a Orough obsahovaly pouze *efa1*. Všechny kmeny NSF O157, O26, O145 a většina kmenů O111 obsahovaly *terE*, jeden z genů *ter* klastru kódujícího rezistenci k teluritu, a rostly tedy dobře na půdě CT-SMAC.

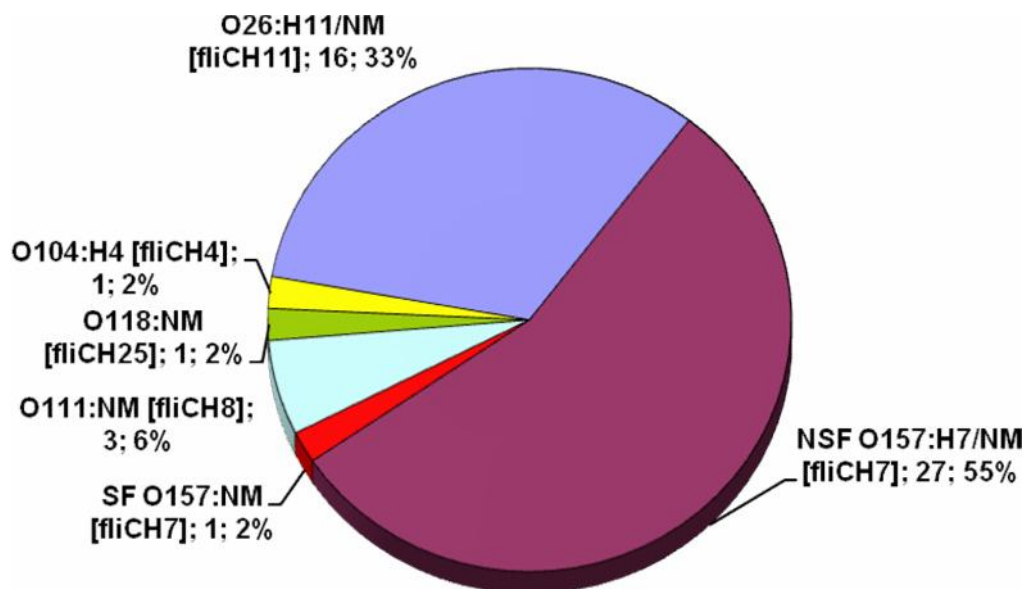
Většina kmenů byla citlivá k sledovaným antibiotikům. Pouze u jednoho antibiotika (ampicilinu) byla častěji pozorována rezistence, a to u kmenů O26 a O111. Z grafu sezónní distribuce EHEC případů vyplývá, že většina (74,4 %) kmenů byla izolována v období květen – září, ale sezónnost nebyla pozorována pro kmeny jednotlivých sérotypů.

Fylogenetická analýza EHEC izolátů od pacientů s HUS metodou MLST demonstrovala 9 sekvenčních typů (ST), které korelovaly se sérotypy. Dva z nich, a to ST660 u kmenů O172:NM a Orough:NM (všechny genotypu *stx*<sub>2a</sub>) a ST1595 u 1 NSF O157:H7 kmene (genotyp *stx*<sub>2a</sub>+*stx*<sub>2c</sub>) se nevyskytují u kmenů tzv. HUSEC (HUS-associated *E. coli*) sbírky, která obsahuje všechny sekvenční typy a sérotypy EHEC kmenů izolovaných od pacientů s HUS v Německu [Mellmann et al., 2008]. Tyto dva české kmeny mohou tedy představovat nové fylogenetické typy (fylotypy) kmenů EHEC schopných vyvolat HUS.

## 5.2 Výsledky studie „Enterohemoragické *Escherichia coli* jako původci průjmu v České republice, 1965–2013“ [viz Příloha 10.2]

V druhé studii, která byla přijata do tisku v březnu 2014 v časopisu *Epidemiologie, mikrobiologie a imunologie*, jsou prezentovány sérotypy, virulenční profily, diagnosticky významné fenotypy a antimikrobiální citlivost 49 kmenů EHEC, izolovaných od 24 pacientů s průjmem, 19 pacientů s krvavým průjmem a 6 rodinných kontaktů s infekcí EHEC, v letech 1965–2013. Jeden kmen EHEC byl izolován od epidemiologicky souvisejícího zvířete. Dále byla zmapována sezónnost a distribuce kmenů podle krajů.

Celkem 49 humánních kmenů EHEC patřilo k 5 sérotypům (**Graf 3**).



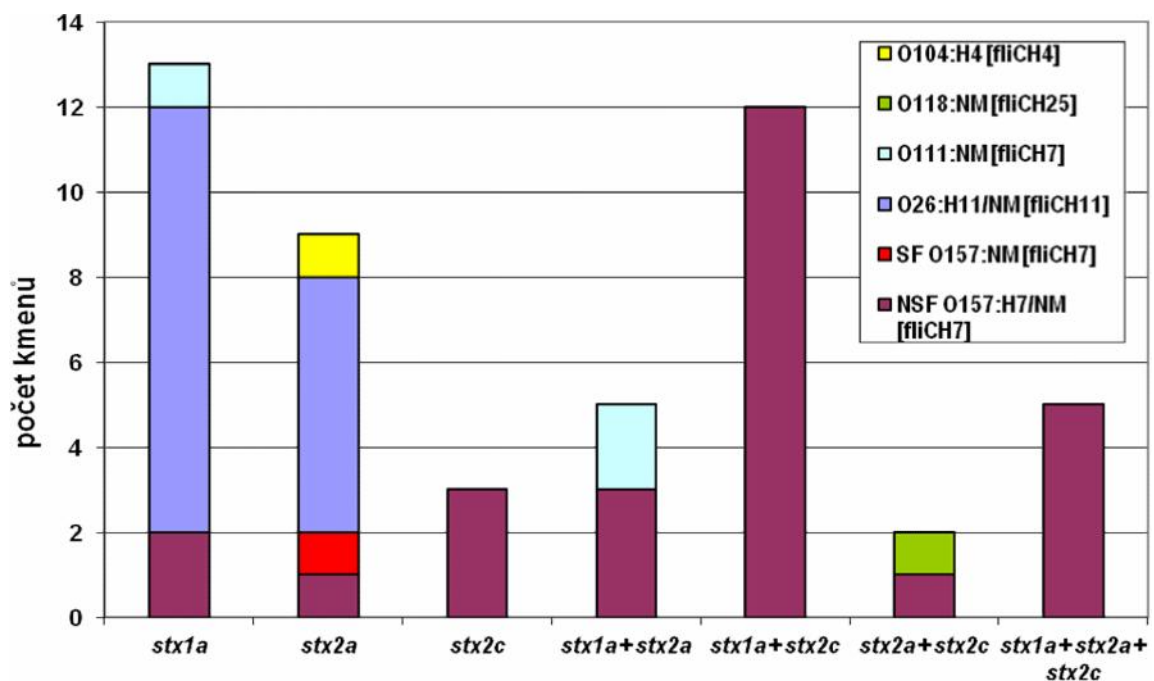
**Graf 3: Distribuce kmenů EHEC izolovaných od pacientů s průjmem, krvavým průjmem a od rodinných kontaktů v České republice, 1965–2013, podle sérotypů (n = 49)**

Více než polovinu (55,1 %) tvořily NSF O157:H7/NM[*fliC<sub>H7</sub>*] a téměř jednu třetinu (32,7 %) O26:H11/NM[*fliC<sub>H11</sub>*]; 3 kmene byly sérotypu O111:NM[*fliC<sub>H8</sub>*]. Po

jednom kmenu se vyskytly SF O157:NM[*fliC<sub>H7</sub>*] a vzácně sérotypy O118:NM[*fliC<sub>H25</sub>*] a O104:H4[*fliC<sub>H4</sub>*], z nichž poslední je importovaný kmen izolovaný v souvislosti s německou epidemií v roce 2011 (podrobnosti viz kapitola 5.3 a příloha 10.3).

Kmeny SF O157, O118, 70 % NSF O157, 44 % O26 a všechny O111 byly nepohyblivé. *fliC*-RFLP analýza umožnila dourčit H antigen nepohyblivých kmenů ve všech séroskupinách.

Všechny kromě jednoho kmene (NSF O157 od pacienta s průjmem bez krve) produkovaly Shiga toxin. Izoláty od pacientů s průjmem patřily k sedmi *stx* genotypům. U NSF O157 dominoval *stx<sub>1a</sub>+stx<sub>2c</sub>*, většina kmenů O26 měla genotyp *stx<sub>1a</sub>*, kmen O118 obsahoval *stx<sub>2a</sub>+stx<sub>2c</sub>* (**Graf 4**). Gen *stx<sub>1a</sub>* samotný nebo v kombinaci s *stx<sub>2a</sub>* a/nebo *stx<sub>2c</sub>* byl identifikován u 35 kmenů (71 %). Na rozdíl od kmenů EHEC působících HUS (viz kapitola 5.1) je tedy přítomnost *stx<sub>1a</sub>* genu (samotného nebo v kombinaci s *stx<sub>2a</sub>* a/nebo *stx<sub>2c</sub>*) významně spojena se schopností EHEC vyvolat pouze nekomplikovaný průjem bez progresu do HUS.



**Graf 4: Distribuce kmenů EHEC jednotlivých sérotypů izolovaných od pacientů s průjmem a rodinných kontaktů v České republice, 1965–2013, podle *stx* genotypů (n = 49)**

Další z toxinů EHEC a významný diagnostický marker, EHEC hemolyzin, byl prokázán u většiny kmenů séroskupin NSF O157 a O26 a u všech kmenů O111. Kmen O118 jako jediný hemolyzoval na klasickém krevním agaru. Gen *cdt-V*, kódující

cytoletální distendující toxin typu V, se vyskytl jen vzácně, u dvou kmenů NSF O157 a kmene SF O157. Subtypizací *espP* genu byl prokázán *espPa*, kódující silně proteolytickou formu EspP, u všech NSF O157, 75 % O26, a kmene O118. Jeden z patnácti kmenů O26 obsahoval gen *etpD*, kódující sekreční systém typu II, a na základě typické kombinace plazmidových genů (EHEC-*hlyA* a *etpD* pozitivní, *espP* a *katP* negativní) tak patřil k novému, vysoce virulentnímu klonu EHEC O26 [Bielaszewska M, et al., 2013a] (podrobnosti viz kapitola 5.4 a příloha 10.4).

Kromě jednoho kmene (O104:H4) byl u všech EHEC izolátů od pacientů s průjmem prokázán adhezin intimin, sérotyp-specifického subtypu. Kmen EHEC O118, jehož výskyt je popisován v určitých geografických oblastech, měl subtyp *eae*  $\beta$ . Náš soubor kmenů od pacientů s průjmem obsahoval jediný kmen SF O157, u kterého byl detekován gen *sfpA* kódující Sfp fimbrie, který je typický pro tyto kmene.

Kmeny všech séroskupin s výjimkou SF O157 byly rezistentní k teluritu a rostly na CT-SMAC, což představuje důležitý diagnostický marker těchto kmenů usnadňující jejich izolaci z primokultur. Ani jeden z kmenů séroskupiny O26 nefermentoval ramnózu, což je rovněž potenciálně diagnosticky využitelná vlastnost EHEC O26.

Většina kmenů byla citlivá ke všem testovaným antimikrobiálním agens. Pouze 4 kmene EHEC O26 byly rezistentní k ampicilinu (a jeden z nich též k chloramfenikolu) a kmen O104:H4 rezistentní k 5 antibiotikům. (Charakteristiky kmene O104:H4 jsou prezentovány v příloze 10.3).

Průjmová onemocnění vyvolaná EHEC se vyskytovala v průběhu celého roku s nejvyšším záchytem v květnu až říjnu. Nejvíce případů bylo zaznamenáno ve Středočeském a Královéhradeckém kraji, a dále v kraji Libereckém, Moravskoslezském a v Praze.

V průběhu studie se ve třech případech podařilo prokázat rodinný výskyt infekce EHEC. EHEC stejného sérotypu, *stx* genotypu a virulenčního profilu, jaký byl izolován od pacienta, byl prokázán též u sourozenců, rodičů nebo prarodičů. Z toho dva rodinné kontakty měly průjem bez příměsí krve a u ostatních čtyř se jednalo o bezpříznakové nosičství. V jednom případě se podařilo prokázat přenos EHEC z domácího zvířete na člověka. Kmeny NSF EHEC O157:NM[*fliC<sub>H7</sub>*] s produkcí Sx1a+Stx2a byly izolovány ze stolice 13měsíčního chlapce s krvavým průjmem a jedné ze 6 ovcí, které chovali rodiče dítěte na rodinné farmě v Libereckém kraji. Kmeny izolované od pacienta a ovce vykazovaly stejné *stx* genotypy, faktory virulence a fenotypy; jejich epidemiologická souvislost byla potvrzena metodou PFGE.

### 5.3 Výsledky studie „An imported case of bloody diarrhea in the Czech Republic caused by a hybrid enteroaggregative hemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC) O104:H4 strain associated with the large outbreak in Germany, May 2011“ [viz Příloha 10.3]

V této studii, která byla prezentována v časopisu *Folia Microbiologica* v roce 2012, je popsán případ krvavého průjmu vyvolaného hybridem enteroagregativně hemoragické *E. coli* (EAHEC) O104:H4, včetně zjištěných fenotypových a genotypových charakteristik kmene. Jednalo se o importovanou infekci epidemickým kmenem *E. coli* O104:H4 v souvislosti s rozsáhlou epidemií HUS a průjmových onemocnění, která vypukla v Německu v květnu 2011 a jako vehikulum byly na základě epidemiologických studií identifikovány kontaminované klíčky pískavice - řecké seno [Buchholz U, et al., 2011].

Do NRL pro *E. coli* a shigely byl zaslán vzorek stolice americké turistky, která přijela ze Severního Německa do České republiky již s průjmovým onemocněním a krátce nato byla hospitalizována s krvavým průjmem v pražské nemocnici Na Bulovce. V anamnéze pacientka uváděla konzumaci salátů z čerstvé zeleniny při pobytu v Německu.

Vzhledem z anamnézy vyplývajícímu podezření na importovanou nákazu německým epidemickým kmenem byl pomnožený vzorek stolice inokulován kromě klasických pevných médií usnadňujících záchyt EHEC (SMAC, CT-SMAC, EHLy) i na selektivní půdu ESBL agar (epidemický kmen byl producentem širokospektré  $\beta$ -laktamázy). Na všech půdách narostla prakticky homogenní kultura. Přítomnost telurit-rezistentních kolonií *E. coli* na CT-SMAC a tmavě modrých ESBL pozitivních kolonií na ESBL agaru (**Obr. 4**), v kombinaci s nepřítomnou hemolýzou na EHLy agaru, svědčící pro absenci produkce EHEC hemolyzinu, signalizovaly suspektní nález německého epidemického kmene.



**Obrázek 4:**  
**Epidemický kmen „EAHEC“ O104:H4**  
**na selektivní chromogenní půdě pro**  
**ESBL-pozitivní kmény z čeledi**  
**Enterobacteriaceae**

U izolovaného kmene byly pomocí nového multiplex PCR protokolu, vyvinutého pro rychlý průkaz původce epidemie [Bielaszewska M, et al., 2011a], detekovány geny *rfb*<sub>O104</sub>, *fliC*<sub>H4</sub>, *stx*<sub>2a</sub>, *terD* a *aggA*. Stejně jako německý epidemický kmen, český izolát neobsahoval geny *stx*<sub>1a</sub>, *eae* a EHEC-*hlyA*. Přítomnost antigenu O104 a H4 byla potvrzena sklíčkovou aglutinací a produkce Stx2a metodou RPLA. Všechny zjištěné vlastnosti potvrdily, že se jedná o německý epidemický kmen, který je kombinací EHEC (produkuje Stx2a) a enteroagregativní *E. coli* (obsahuje gen kódující agregativní adhezenční fimbrie I).

## 5.4 Výsledky studie „Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H<sup>-</sup>: A New Virulent Clone Emerges in Europe“ [viz Příloha 10.4]

V této mezinárodní studii, publikované v časopise *Clinical Infectious Diseases* v roce 2013, byla zjišťována korelace mezi *stx* genotypem a závažností onemocnění v souboru kmenů EHEC O26 izolovaných od pacientů s průjmem, krvavým průjmem nebo HUS v sedmi evropských zemích, včetně České republiky, v letech 1996-2012. NRL pro *E.coli* a shigely poskytla pro tuto studii celkem 18 kmenů EHEC O26 izolovaných od pacientů s HUS nebo průjmem a s určenými *stx* genotypy a profily plazmidových virulenčních genů.

Celkem 272 kmenů zařazených do studie pocházelo z Německa (n=182), Rakouska (n=38), Itálie (n=24), České republiky (n=18), Belgie (n=7), Velké Británie (n=2) a Slovenska (n=1). Kmeny byly charakterizovány genotypovými a fenotypovými metodami, a zařazeny do tří *stx* genotypů. Genotyp *stx*<sub>2a</sub> byl signifikantně častěji spojen s rozvojem HUS (3/4 kmenů z celkového počtu 139), zatímco kmeny genotypu *stx*<sub>1a</sub> (celkem 107) byly v 92 % izolovány od pacientů s nekomplikovaným průjmem. EHEC O26 genotypu *stx*<sub>1a</sub>+*stx*<sub>2a</sub> se podílely přibližně ve stejné míře na lehčí i závažnější formě onemocnění.

Téměř 50 % kmenů genotypu *stx*<sub>2a</sub> patřilo na základě typické kombinace plazmidových genů (EHEC-*hlyA* a *etpD* pozitivní, *espP* a *katP* negativní) k novému klonu EHEC O26, který byl poprvé popsán v 90. letech v Německu [Zhang WL, et al., 2000]. Všechny tyto kmeny současně vykazovaly sekvenční typ ST29 pomocí metody MLST, který je pro kmeny nového klonu typický [Bielaszewska M, et al., 2013a]. Dalších asi 50 % kmenů genotypu *stx*<sub>2a</sub> patřilo k sekvenčnímu typu ST21 (který se vyskytoval též u většiny EHEC O26 genotypů *stx*<sub>1a</sub> a *stx*<sub>1a</sub>+*stx*<sub>2a</sub>) a vykazovalo různé kombinace plazmidových genů, které se většinou lišily od kmenů ST29. Klonální analýza metodou PFGE ukázala blízkou příbuznost mezi kmeny nového klonu (tj. ST29) izolovaných v různých zemích a v různých časových obdobích, a demonstrovala tak, že nový klon tvoří vysoce konzervovaný systém. Tento klon se vyskytl ve všech zúčastněných zemích (kromě Velké Británie), včetně České republiky, kde byl zjištěn u 7 ze 16, tj. skoro poloviny, *stx*<sub>2a</sub> pozitivních EHEC O26. Šest z těchto sedmi izolátů pocházelo od pacientů s HUS a pouze jeden od pacienta s průjmem bez příměsi krve, což vypovídá o vysoké virulenci EHEC O26 nového klonu i na úrovni České republiky.

## 6. DISKUZE

Naše výsledky ukázaly, že EHEC se vyskytují jako původci průjmu, krvavého průjmu a HUS v České republice. Vedle klasické a nejznámější NSF EHEC O157:H7 jsou zastoupené i kmeny dalších, non-O157:H7 sérotypů. Nejčastějším non-O157:H7 sérotypem v České republice, jak ve spojení s HUS, tak i s nekomplikovaným průjmem, je O26:H11, podobně jako bylo popsáno i jinde ve světě [Beutin L, et al., 2004; Karch H, et al., 2005; EFSA 2013; Ethelberg S, et al., 2009; Gould LH, et al., 2013; Käppeli U, et al., 2011; Blanco JE, et al., 2004]. Mezi kmeny izolovanými od pacientů s HUS séroskupina O26 dominuje a na druhém místě je NSF O157:H7 (**Graf 1**), stejně jako bylo pozorováno v některých letech v Itálii [Tozzi E, et al., 2003]. Mezi EHEC izolovanými od pacientů s průjmem je situace obrácená (**Graf 3**).

Polovinu všech EHEC O157 izolatů od pacientů s HUS tvořily SF O157 kmeny. Tato situace je odlišná od studií z jiných zemí, kde SF EHEC O157 (pakiže byly vůbec identifikovány), tvořily maximálně jednu třetinu všech O157 izolatů od pacientů s HUS [Mellmann A, et al., 2008]. SF EHEC O157 byly také častěji izolovány od pacientů s HUS než z nekomplikovaného průjmového onemocnění, podobně jako bylo publikováno i v Rakousku [Orth D, et al., 2009]. Výsledky zahraničních studií ukazují, že infekce SF EHEC O157 mnohem častěji vedou k rozvoji HUS a mají vyšší riziko úmrtí [Rosser T, et al., 2008; Alpers K, et al., 2009] než je tomu u infekcí NSF EHEC O157 [Rangel JM, et al., 2005]. Úmrtí dítěte s HUS vyvolaným SF EHEC O157 jsme zaznamenali i v naší studii. Další dva dětské pacienti s HUS zemřeli na následek infekce EHEC O26, přičemž jeden z nich [Marejková M, et al., 2009; Zieg J, et al., 2012] byl infikován virulentním kmenem patřícím k novému klonu EHEC O26 [Zhang WL, et al., 2000].

Celkem 7 kmenů Stx2a-produkujících EHEC O26 izolovaných od pacientů v České republice do roku 2012 (6 kmenů z HUS a 1 z průjmu bez krve), patřilo na základě fylogenetické analýzy (ST29) a typické kombinace plasmidových genů k tomuto novému klonu EHEC O26. Evropská studie, zahrnující 7 států včetně České republiky (viz příloha 10.4), ukázala, že nový klon, který byl poprvé identifikován v 90. letech v Německu [Zhang WL, et al., 2000], se od r. 1996 rozšířil do podstatné části Evropy a tvoří přibližně 50 % všech *stx*<sub>2a</sub>-pozitivních EHEC O26 izolovaných od pacientů s HUS [Bielaszewska et al., 2013a]. Vysokou virulenci tohoto klonu dokazuje nejen jeho signifikantní spojení se sporadickými případy HUS včetně případů



smrtebných [Marejková M, et al., 2009; Zieg J, et al., 2012], ale i jeho epidemický potenciál dokumentovaný výskytem zatím (naštěstí) pouze klastrů či malých epidemií HUS [Zhang WL, et al., 2000; Allerberger F, et al., 2003]. Rezervoáry těchto kmenů a jejich možné zdroje pro člověka jsou zatím neznámé. Ze všech těchto důvodů představuje výskyt těchto kmenů v České republice závažný zdravotnický problém, a proto je třeba z preventivních důvodů nadále pečlivě a soustavně monitorovat jejich výskyt jak u pacientů, tak i v prostředí včetně potenciálních zvířecích rezervoárů.

Fylogenetická analýza kmenů EHEC izolovaných od pacientů s HUS metodou MLST prokázala dva nové sekvenční typy, a to ST660 u kmenů O172:NM a Orough:NM a ST1595 u jednoho NSF EHEC O157:H7, které se nevyskytují u kmenů tzv. HUSEC (HUS-associated *E. coli*) sbírky, obsahující všechny sekvenční typy a sérotypy EHEC kmenů izolovaných od pacientů s HUS v Německu [Mellmann A, et al., 2008]. Tyto dva české kmeny mohou tedy představovat nové fylogenetické typy kmenů EHEC schopných vyvolat HUS.

Z celkem 56 pacientů s diarreha-pozitivním HUS, jejichž stolice byly zaslány k průkazu EHEC do NRL v letech 1998-2012, byly EHEC detekovány ve stolicích 39 pacientů (70 %), a to pomocí skrínungu pomnožených vzorků stolic na *stx* a *eae* geny pomocí PCR a kultivačně. Podíl kultivačně pozitivních stolic od pacientů s HUS v naší studii je v souladu s daty uváděnými v jiných evropských studiích [Gerber A, et al., 2002; Tozzi E, et al., 2003, Espié' E, et al., 2008]. Kultivační průkaz EHEC u pacientů s HUS je komplikován skutečností, že množství bakterií EHEC ve stolici po začátku prodromálního průjmu rychle klesá [Tarr PI, et al., 1990], takže pravděpodobnost záchytu kmene v době rozvoje HUS (tj. asi za týden po začátku průjmu) se značně snižuje a část stolic může být kultivačně falešně negativních. Toto zdůrazňuje nutnost odebrat stolici na průkaz EHEC co nejdříve po začátku prodromálního průjmu, což zatím není běžná praxe, a úkolem mikrobiologa je tedy informovat o této skutečnosti ošetřujícího lékaře. V případě, že stolice byla odebrána až v době rozvoje HUS, provedení imunomagnetické separace, která koncentruje bakterie EHEC dostupné pro kultivaci pomocí magnetických částic sensibilizovaných specifickými anti-O protilátkami, podstatně zvyšuje pravděpodobnost úspěšné izolace infikujícího kmene EHEC. V naší studii se podařilo izolovat kmeny EHEC ze všech vzorků stolic, které byly PCR pozitivní na přítomnost *stx* genů. Záchyt kmene EHEC v pomnoženém vzorku byl (v případě hraničního počtu EHEC bakterií ve stolici) umožněn díky imunomagnetické separaci. Dále kultivace pomnoženého vzorku na selektivních a

diagnostických pevných médiích vyvinutých pro předběžnou detekci EHEC usnadnila izolaci kmenů nejčastěji se vyskytujících EHEC na základě jejich typických fenotypů. Tyto zahrnují a) neschopnost fermentace sorbitolu (růst v bezbarvých koloniích na SMAC a CT-SMAC) typická pro kmeny NSF O157, b) produkci EHEC hemolyzinu (vyvolává neúplnou hemolýzu na EHLy agaru) u kmenů NSF O157, O26, O111, O145, O103 a c) rezistenci k teluritu (růst na CT-SMAC) u kmenů NSF O157, O26, O145, O111, ale i O118 a O104 izolovaných z případů průjmu v naší studii - viz níže.

Skutečnost, že se nám podařilo izolovat agens ze všech *stx*-pozitivních stolic detekovaných metodou PCR, potvrzuje, že byly v NRL zavedeny citlivé a spolehlivé metody pro průkaz a izolaci EHEC ve stolicích pacientů s HUS, kde množství bakterií je často již velmi nízké, a dále demonstruje, že zvolená strategie průkazu a izolace EHEC umožňuje identifikovat jak EHEC O157, tak i non-O157 séroskupiny. Navíc vysoký záchyt SF EHEC O157 v naší studii ukazuje, že i protokol používaný v NRL pro detekci těchto kmenů (PCR skríníng *sfpA* genu kódujícího Sfp fimbrie typické pro SF O157), které neprodukuje EHEC hemolyzin a jsou citlivé k teluritu, takže nerostou na CT-CMAC [Karch H, et al., 2005], je spolehlivý.

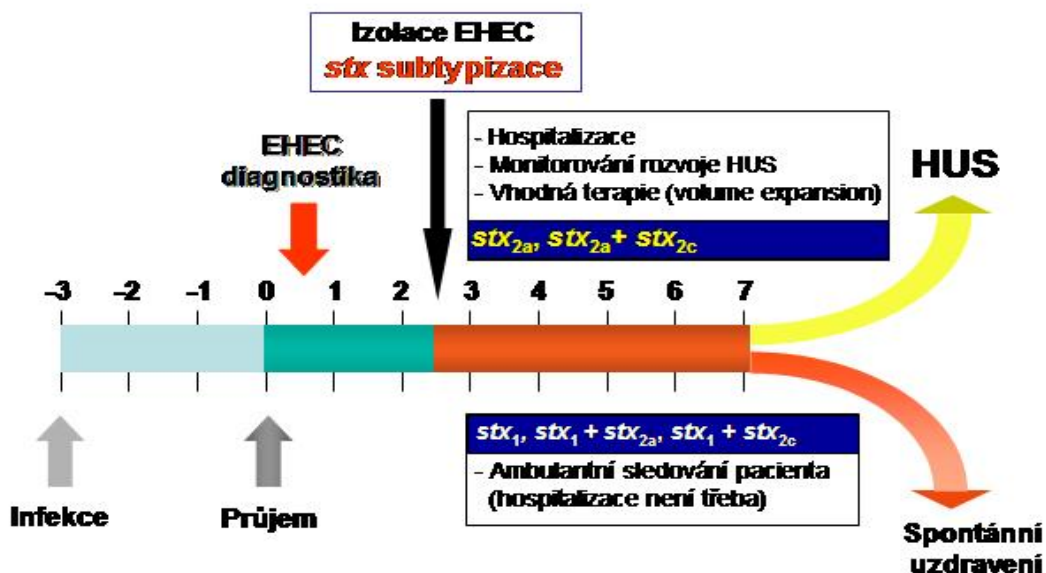
Všechny izolované kmeny EHEC od pacientů s HUS v České republice obsahovaly gen *eae* kódující adhezín intimin, podobně jako je popsáno i v zahraničních studiích, kde *eae*-negativní kmeny jsou identifikovány v souvislosti s HUS vzácně [Käppeli U, et al., 2011; Friedrich AW, et al., 2002]. Vzhledem k tomu, že PCR skríníng používaný v NRL pro *E.coli* a shigely umožňuje záchyt *stx*-pozitivních/*eae*-negativních kmenů ve stolici, je absence *eae*-negativních kmenů EHEC u pacientů s HUS v České republice jednak důsledkem výrazně nižší schopnosti takových kmenů vyvolat HUS než je tomu u *eae*-pozitivních EHEC [Bielaszewska et al., 2006], a pravděpodobně i poměrně nízkého počtu případů HUS, a tedy i příslušných kmenů EHEC v této zemi.

Zatímco infekce EHEC u pacientů s HUS byla sledována systematicky a pomocí metod nezávislých na sérotypu (PCR průkaz *stx*), skríníng EHEC u pacientů s průjmem a krvavým průjmem byl omezen na „top“ pět EHEC séroskupin (O157, O26, O103, O111 a O145), kdy byly tyto izoláty, na základě vyhlášky 473/2008 Sb. „O systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce“ ve znění novely 275/2010 Sb., zasílány jako suspektní EHEC k průkazu *Stx/stx* do NRL. Tato skutečnost se odráží na spektru identifikovaných séroskupin EHEC, kdy více než 90 % izolátů zaslaných v souvislosti s

průjmem patřilo k séroskupinám O157, O26 a O111. Jediné 2 výjimky byly kmeny séroskupin O118 a O104, které byly rozpoznány jako EHEC díky tomu, že první z nich byl zaslán do NRL jako suspektní *E. coli* O145 a druhý byl izolován v NRL ze stolice pacientky s podezřením na infekci německým epidemickým kmenem v roce 2011. EHEC séroskupin O103 a O145 nebyly v České republice jako původci průjmu (bez progresu do HUS) identifikovány. To může být ovlivněno i tím, že testování těchto séroskupin nebylo součástí rutinní diagnostiky všech laboratoří, a tudíž byly tyto kmeny do NRL k průkazu Stx zasílány v nižší frekvenci než je tomu u séroskupin O157 a O26.

Všechny kmeny EHEC izolované od pacientů s HUS, nekomplikovaným průjmem a jejich kontaktů v České republice byly podrobeny subtypizaci *stx*<sub>1a</sub> a/nebo *stx*<sub>2a</sub> genu pomocí dříve popsanych protokolů PCR nebo PCR-RFLP [Friedrich AW, et al., 2002; Scheutz F, et al., 2012] aplikovaných a optimalizovaných v naší laboratoři. Produkce Stx byla ověřena fenotypovými metodami (testem na Vero buňkách a VTEC-RPLA). Naše výsledky ukazují, že kmeny s produkcí Stx<sub>2a</sub>, samotného nebo spolu s Stx<sub>2c</sub>, jsou významně častěji spojovány se systémovou formou onemocnění, t.j. HUS, než kmeny s produkcí Stx<sub>1a</sub> samotného nebo Stx<sub>1a</sub> spolu s Stx<sub>2a</sub> (nebo s Stx<sub>2c</sub>), které jsou častěji izolovány z průjmu a krvavého průjmu. K podobným závěrům dospěli autoři studií z Německa, Dánska, Belgie a USA [Friedrich AW, et al., 2002; Ethelberg S, et al., 2004; Brooks JT, et al., 2005; Buvens G, Piérard D, 2012]. Ve srovnání s typem Stx, non-Stx toxiny kmenů EHEC (EHEC hemolyzin, cytoletální distendující toxin, serin proteáza EspP) byly identifikovány u kmenů stejných sérotypů bez ohledu na jejich klinický původ (tj. izolované z HUS vs. nekomplikovaného průjmu), což naznačuje, že tyto toxiny nemají rozhodující význam pro progresi EHEC infekce do HUS, i když k patogenezi HUS mohou přispívat [Aldick T, et al., 2007; Bielaszewska M, Karch H, 2005a; Bielaszewska M, et al., 2005b; Bielaszewska M, et al., 2013a]. Protože Stx typ kmene má zásadní význam pro progresi lokální infekce EHEC (průjmu) do systémové toxémie (HUS), je v současné době nejúčinnější prevencí závažného, tj. anurického, HUS rychlá detekce EHEC ve stolici pacienta s průjmem [Tarr PI, et al., 1990], rychlá subtypizace *stx* genů [Friedrich AW, et al., 2002; Bielaszewska M, et al., 2006; tato studie] a u pacientů se zvýšeným rizikem rozvoje HUS (tj. v případě nálezu *stx*<sub>2a</sub> genotypu u infikujícího kmene) aplikace vhodné terapie (volume expansion), která snižuje riziko anurického renálního selhání [Ake JA, et al., 2005]. Z preventivního hlediska je tedy nutné, jako součást určení rizika rozvoje HUS u pacienta s průjmem,

provádět rychlou subtypizaci *stx* genů u izolovaných kmenů EHEC a výsledky okamžitě hlásit ošetřujícímu lékaři, který zajistí vhodný terapeutický postup (**Obrázek 5**).



**Obrázek 5: Subtyp *stx* genu kmene EHEC je indikátorem klinického průběhu infekce.** Význam subtypizace *stx* genů pro určení rizika rozvoje HUS u pacienta s průjmem vyvolaným EHEC a schematické znázornění dalších postupů založených na mikrobiologickém nálezu.

Z hlediska laboratorní diagnostiky bychom chtěli dále zdůraznit význam molekulární sérotypizace, obzvláště metody *fliC*-RFLP, která umožnila rychlou a spolehlivou detekci H antigenů u nepohyblivých kmenů (na základě našich výsledků více než polovina kmenů EHEC izolovaných z humánních infekcí v České republice byla nepohyblivá). Toto je zvláště důležité při epidemiologických šetřeních, kdy rychlá předběžná informace o stejných *fliC*-RFLP profilech nepohyblivých kmenů EHEC izolovaných z různých zdrojů je východiskem pro jejich další, podrobné srovnání pomocí molekulárních metod včetně PFGE.

Několik pozorování v naší studii přispělo k rozšíření znalostí o epidemiologii EHEC infekcí v České republice. Konkrétně, pomocí analýzy virulenčních profilů, fenotypových vlastností a metody PFGE se nám podařilo identifikovat epidemiologickou souvislost izolátů NSF EHEC O157:H7 (produkujících Sx1a+Stx2a)

od dítěte s krvavým průjmem a jedné ze šesti ovcí z rodinné farmy. Je to první dokumentovaný případ přenosu EHEC infekce z ovce na člověka v České republice. Ojedinelé případy přenosu z ovce byly popsány i v jiných zemích, např. v Holandsku, kde dítě onemocnělo HUS několik dnů po návštěvě zoologické zahrady a stejné kmeny EHEC O157 byly izolovány ze stolice pacienta a fekálních vzorků zde chovaných ovcí a koz [Heuvelink AE, et al., 2002]. Ve švédské prevalenční studii EHEC O157 u ovcí byly porovnávány izolované kmeny od zvířat s kolekcí humánních izolátů, a shodný PFGE profil byl zjištěn u izolátu od ovce z roku 2007 a kmene od pacienta z roku 2008 [Söderlund R, et al., 2012]. Zvířata jiných druhů byla identifikována v České republice jako zdroj nákazy u sporadických případů či v menších epidemiích EHEC již v předchozích letech. V roce 1995 byl v severních Čechách zaznamenán výskyt HUS u čtyř dětí ve věku do tří let spojen s konzumací nepasterizovaného mléka od kozy, která vylučovala v trusu EHEC O157:H7 [Bielaszewska M, et al., 1997]. V roce 1998 byl popsán přenos infekce SF EHEC O157:NM přímým kontaktem z krávy na dva chlapce (sourozence), z nichž starší (6letý) onemocněl průjmem a u druhého (15měsíčního) se rozvinul HUS [Bielaszewska M, et al., 2000].

V nedávno popsané studii [Skočková A, et al., 2013a] byly na přítomnost *Stx*-produkcující *E.coli* testovány vzorky neošetřeného kravského mléka ze šesti farem a též syrového masa z tržní sítě v České republice. Z celkem 67 získaných kmenů *E.coli* pouze jeden (izolát z vepřového masa) byl *stx*-pozitivní, a patřil subtypu *stx*<sub>2e</sub>, který jen ojedinelé bývá identifikován u kmenů izolovaných z humánních infekcí [Sonntag AK, et al., 2005a]. V jiné studii [Alexa P, et al., 2011] byla sledována prevalence EHEC u dobytka na třech farmách v České republice. Vylučování EHEC bylo pozorováno ve všech třech sledovaných stádech, s nálezem kmenů ve 30–100 % vzorků rektálních výtěrů odebraných v letních měsících a 30–60 % vzorků odebraných v zimních měsících. Kromě EHEC séroskupin O128 a O153 byly u dobytka detekovány další tři séroskupiny, O157, O26, O103, z nichž první dvě byly nejčastěji zastoupeny mezi EHEC izolovanými od pacientů s HUS a průjmem v naší studii a všechny tři jsou často popisovány v souvislosti s HUS v zahraničních studiích [Gerber A, et al., 2002; Mellmann A, et al., 2008]. V předchozích letech studovali Čížek a spol. prevalenci EHEC O157 ve vzorcích trusu dobytka na farmě v jihovýchodní části České republiky. EHEC O157 byla nalezena ve 20 % vzorků od dobytka a ve 40 % vzorků feces od potkanů z této farmy [Čížek A, et al., 1999]. Další studie [Čížek A, et al., 2008] byla zaměřena na výskyt EHEC O157 testováním in-line mléčných filtrů ve 192 farmách

dobytka na Moravě. EHEC O157 byla prokázána ve 4 ze 192 mléčných filtrů. Tyto studie ukazují, že stejně jako je tomu ve světě, dobytek je významným rezervoárem EHEC a možným zdrojem infekce pro člověka i v České republice a potvrzují důležitost monitorování EHEC v souladu s prioritami European Food Safety Authority (EFSA) a European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).

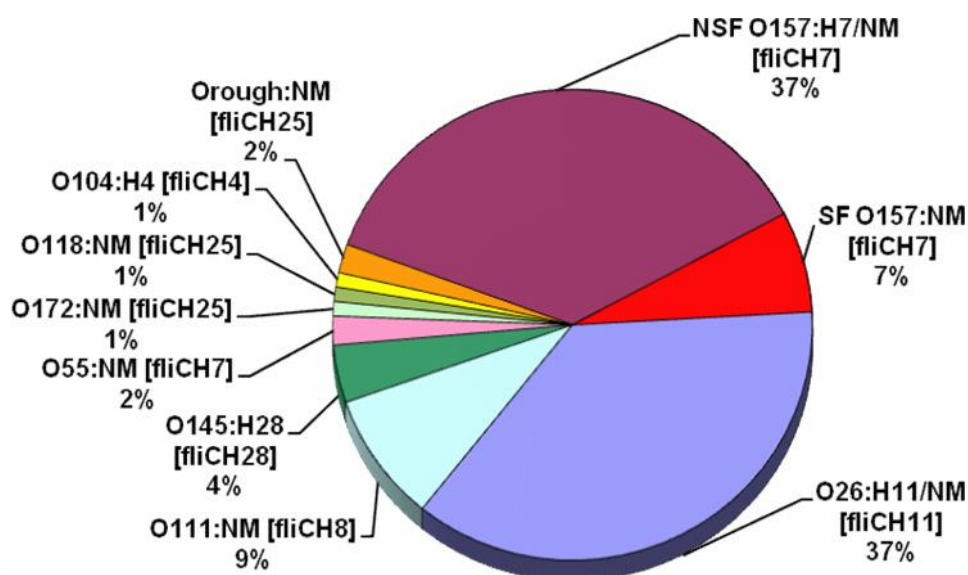
Za významný přínos ke zlepšení znalostí o epidemiologii EHEC v České republice považujeme i analýzu šíření infekce EHEC v okolí pacientů a doby vylučování EHEC po prodělané infekci. V létech 2006–2013 bylo zaznamenáno nosičství EHEC v rodinách 4 pacientů s HUS (nepublikovaná data) a 3 pacientů s průjmem nebo krvavým průjmem. U většiny rodinných kontaktů se jednalo o asymptomatické nosičství. Případy bezpříznakového nosičství EHEC u rodinných kontaktů pacientů s HUS či průjmem vyvolaným EHEC byly zaznamenány i v zahraničí [Hanna JN, et al., 2007; Lienemann T, et al., 2012]. Sledování doby vylučování infikujících kmenů EHEC u části pacientů a jejich kontaktů ukázalo, že dlouhodobé vylučování EHEC se vyskytuje u dětí i dospělých, a to jak u pacientů s manifestním onemocněním, tak i u osob bezpříznakových. Vzhledem k velmi nízké infekční dávce EHEC jsou tito nosiči závažnými potencionálními zdroji infekce pro své okolí. Z preventivního hlediska to znamená nutnost skríningu EHEC i v rodinách pacientů, důsledné a dlouhodobé sledování vylučování kmene EHEC jak u pacientů, tak i u bezpříznakových osob, a vyloučení osob s pozitivním nálezem z návštěvy dětských kolektivů a styku s potravinami až do vymizení patogena ze stolice [Mody RK, et al., 2013].

Typická letní sezónnost onemocnění EHEC [Karmali MA, 2004; Karch H, et al., 2005; Rangel JM, et al., 2005] nebyla striktně pozorována v České republice. Případy infekcí EHEC se vyskytovaly v průběhu celého roku, i když nejvyšší záchyt kmenů byl v květnu až říjnu. Nejvíce případů infekcí EHEC bylo zaznamenáno ve Středočeském, Královéhradeckém kraji a Praze, dále v Libereckém a Moravskoslezském kraji. V současné době není jasné, zda tyto mezikrajové rozdíly odráží skutečné rozdíly v prevalenci EHEC nebo jsou důsledkem různého systému detekce a zasílání suspektních izolátů k další typizaci do NRL.

V průběhu velké německé epidemie v květnu až červenci 2011 se nám podařilo zachytit importovaný epidemický kmen *E. coli* O104:H4 u americké turistky, která přijela do Prahy ze Severního Německa s průjmovým onemocněním a krátce nato zde byla hospitalizována. U izolátu byly pomocí nového multiplex PCR protokolu,

vyvinutého pro rychlý průkaz epidemického kmene [Bielaszewska M, et al., 2011a], detekovány všechny markery popsané u německého epidemického kmene, který je hybridem EHEC (produkuje Stx2a) a enteroagregativní *E. coli* [Bielaszewska M, et al., 2011a]. Rychlá izolace a identifikace kmene *E. coli* vzácného sérotypu a atypických vlastností byla umožněna díky použití vhodných selektivních médií a nově vyvinutých a v naší laboratoři promptně aplikovaných molekulárních postupů, což je nezbytným předpokladem pro záchyt nových, neobvyklých patogenů. Přestože onemocnění vyvolaná EHEC představují převážně pediatrický problém, tato epidemie byla neobvyklá i tím, že většina pacientů byli dospělí s výraznou převahou žen [Buchholz U, et al., 2011; Frank C, et al., 2011]. I americká turistka, od které byl v naší laboratoři izolován importovaný epidemický kmen, byla žena ve věku 62 let.

Pro ilustraci uvádíme na závěr zastoupení séroskupin všech humánních kmenů EHEC izolovaných v České republice do konce roku 2013 (**Graf 5**). Vyplývá z něj, že EHEC O26 a NSF O157 se podílejí stejnou mírou na těchto infekcích v České republice. Je to rozdíl oproti jiným zemím Evropské unie, kde jsou EHEC O26 jako agens lidského onemocnění zastoupené výrazně méně častěji než NSF EHEC O157 [ECDC, 2013; Orth D, et al., 2007].



**Graf 5: Zastoupení kmenů EHEC izolovaných od pacientů s HUS, průjmem, krvavým průjmem a od asymptomatických kontaktů v České republice, v letech 1965-2013, podle sérotypů (celkem 101 kmenů)**

## 7. ZÁVĚRY

**V průběhu práce se podařilo splnit všechny vytýčené cíle:**

1. V NRL pro *E. coli* a shigely byly zavedeny a optimalizovány rychlé a citlivé metody pro detekci kmenů EHEC a tak byla výrazně zvalitněna laboratorní diagnostika těchto patogenů. Informace o přítomnosti kmene EHEC ve stolici pacienta je možné nahlásit ošetřujícímu lékaři v nejkratší možné době.
2. Byly zavedeny metody subtypizace *stx* genů. Rovněž tato indicie, informace o subtypu Stx, je z preventivního hlediska velice potřebná pro lékaře k úvaze o pravděpodobnosti progresu průjmu do HUS a rozhodování o správné volbě terapie. Naše výsledky ukazují, že kmeny s produkcí Stx2a, samotného nebo spolu s Stx2c, jsou významně častěji spojovány s komplikovanou formou onemocnění, t.j. HUS.
3. Molekulární sérotypizace EHEC, tj. identifikace somatických a flagelárních antigenů pomocí PCR a RFLP dovolila přesné určení sérotypu a porovnání s údaji publikovanými ve světové literatuře.
4. Byly zjištěny sérotypy, *stx* genotypy a další faktory virulence, diagnosticky důležité fenotypy, antibiotická rezistence a to jak u čerstvých izolátů z let 2006–2013, tak i zpětně (od roku 1965) u kmenů z laboratorní sbírky NRL pro *E.coli* a shigely. Nejčastěji zastoupenými sérotypy jsou NSF O157:H7/NM a O26:H11/NM. Kromě *stx* genů obsahovaly kmeny všech sérotypů i řadu non-*stx* faktorů virulence, jejichž spektrum bylo většinou sérotyp-specifické.
5. Z preventivního aspektu bylo velice důležité navázání spolupráce s orgány Ochrany veřejného zdraví (krajskými a dalšími epidemiology), a to při sledování bezpříznakového nosičství v rodinách pacientů s infekcí EHEC a při vyhledávání možných zdrojů infekce. Během dizertační práce se v jednom případě skutečně podařilo najít zvířecí zdroj (ovce z rodinné farmy).
6. České kmeny od pacientů s HUS byly podrobeny fylogenetické analýze metodou MLST a ve spolupráci s Ústavem hygieny Univerzity v Münsteru porovnány se sbírkou HUSEC (HUS-associated *E. coli*), která obsahuje kmeny izolované od pacientů s HUS v Německu. Byly tak zjištěny dva nové sekvenční typy, které tato sbírka neobsahuje a představují tedy nové fylogenetické typy EHEC schopné vyvolat HUS.



7. Byla zmapována sezónní a krajová distribuce EHEC v České republice. Infekce EHEC se vyskytovaly během celého roku, s vrcholem v květnu až říjnu a nejvíce ve Středočeském a Královéhradeckém kraji.

**Předkládaná práce tak podstatně přispěla ke zvýšení znalostí o úloze EHEC jako původců HUS a průjmů v České republice, epidemiologii těchto infekcí, a podařilo se vypracovat a aplikovat postupy rizikové analýzy a prevence těchto závažných infekcí.**

## 8. SEZNAM ZKRATEK

<b>CDT</b>	Cytoletální distendující toxin
<b>CNCTC</b>	Česká sbírka typových kultur SZÚ, Praha (Czech National Collection of Type Cultures)
<b>CT-SMAC</b>	Cefixim-teluritový sorbitol MacConkey agar
<b>ECDC</b>	Evropské centrum pro prevenci a kontrolu nemocí (European Centre for Disease Prevention and Control)
<b>EHEC</b>	Enterohemoragická <i>Escherichia coli</i>
<b>EHLy</b>	Enterohemolyzinový agar
<b>ESBL</b>	Širokospektrá $\beta$ -laktamáza (Extended spectrum $\beta$ -lactamase)
<b>EUCAST</b>	Evropská komise pro testování antimikrobní citlivosti (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
<b><i>fliC</i>-RFLP</b>	Restriction fragment length polymorphism <i>fliC</i> genu kódujícího podjednotku flagelinu
<b>H antigen</b>	Bičíkový (flagelární) antigen
<b>HUS</b>	Hemolyticko-uremický syndrom
<b>IMS</b>	Imunomagnetická separace
<b>LEE</b>	Lokus pro poškození enterocytů (Locus for enterocyte effacement)
<b>MALDI-TOF MS</b>	Hmotnostní spektrometrie s využitím ionizace laserem za přítomnosti matrice v kombinaci s průletovým analyzátozem (Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)
<b>MLST</b>	Multilokusová sekvenční analýza (Multilocus sequence typing)
<b>NRL</b>	Národní referenční laboratoř
<b>NSF</b>	Sorbitol nefermentující
<b>NM</b>	Nepohyblivé (Non motile)
<b>O antigen</b>	Somatický antigen
<b>PCR</b>	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
<b>PFGE</b>	Pulzní gelová elektroforéza
<b>RFLP</b>	Polymorfismus založený na profilu restričních fragmentů (Restriction fragment length polymorphism)
<b>RPLA</b>	Reverzní pasivní latexová aglutinace

<b>SF</b>	Sorbitol fermentující
<b>SMAC</b>	Sorbitol MacConkey agar
<b>SPATEs</b>	Serin proteázové autotransportéry enterobakterií
<b>Stx</b>	Shiga toxin
<b>Stx1a</b>	Shiga toxin 1a
<b>Stx2a</b>	Shiga toxin 2a

## 9. SEZNAM LITERATURY

**Ake JA**, Jelacic S, Ciol MA, Watkins SL, Murray KF, Christie DL, Klein EJ and Tarr PI. (2005) Relative nephroprotection during *Escherichia coli* O157:H7 infections: association with intravenous volume expansion. *Pediatrics*. 2005;115(6): e673–680.

**Aldick T**, Bielaszewska M, Zhang W, Brockmeyer J, Schmidt H, Friedrich AW, Kim KS, Schmidt MA, Karch H. (2007) Hemolysin from Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O26 strains injures microvascular endothelium. *Microbes Infect*. 2007; 9(3):282–290.

**Alexa P**, Konstantinova L, Zajacova-Sramkova Z. (2011) Faecal shedding of verotoxigenic *Escherichia coli* in cattle in the Czech Republic. *Veterinárni Medicina*. 2011;56(4):149–155.

**Allerberger F**, Friedrich AW, Grif K, Dierich MP, Dornbusch HJ, Mache CJ, Nachbaur E, Freilinger M, Rieck P, Wagner M, Caprioli A, Karch H, Zimmerhackl LB. (2003) Hemolytic-uremic syndrome associated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H infection and consumption of unpasteurized cow's milk. *Int J Infect Dis*. 2003;7(1):42–45.

**Alpers K**, Werber D, Frank C, Koch J, Friedrich AW, Karch H, An Der Heiden M, Prager R, Fruth A, Bielaszewska M, Morlock G, Heissenhuber A, Didler A, Gerber A, Ammon A. (2009) Sorbitol fermenting enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- causes another outbreak of haemolytic uraemic syndrome in children. *Epidemiol Infect*. 2009;137(3):389–395.

**Ambrožová H**, Marejková M. (2012) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* - dangerous new pathogens. *Cas Lek Cesk*. 2002;151(11):514–518.

**Ammon A**. (2009) Sorbitol fermenting enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- causes another outbreak of haemolytic uraemic syndrome in children. *Epidemiol Infect*. 2009;137(3):389–395.

**Banatvala N**, Griffin PM, Greene KD, Barrett TJ, Bibb WF, Green J, HUS Study Collaborators. (2001) The United States national prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. *J Infect Dis*. 2001;183(7):1063–1070.

**Bauwens A**, Bielaszewska M, Kemper B, Langehaneberg P, von Bally G, Reichelt R, Mulaac D, Humpf HU, Friedrich AW, Kim KS, Karch H, Müthing J. (2011) Differential cytotoxic actions of Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2 on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Thromb Haemost*. 2011;105(3):515–528.

**Bauwens A**, Betz J, Meisen I, Kemper B, Karch H, Müthing J. (2013) Facing glycosphingolipid–Shiga toxin interaction: dire straits for endothelial cells of the human vasculature. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(3):425–457.

**Beutin L**, Krause G, Zimmermann S, Kaulfuss S, Gleier K. (2004) Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(3):1099–1108.

**Bielaszewska M**, Janda J. (1989) Mikrobiologické aspekty infekce kmeny *E. coli* produkujícími verotoxin u dětí s hemolyticko-uremickým syndromem. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 1989;38(4):237–244.

**Bielaszewska M**, Janda J, Bláhová K, Minarikova H, Jílková E, Karmali MA, Laubová J, Sikulova J, Preston MA, Khakhria R, Karch H, Klazarová H, Nyč O. (1997) Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with consumption of unpasteurised goats milk. *Epidemiol Infect.* 1997;119(3):299–305.

**Bielaszewska M**, Schmidt H, Karmali MA, Khakhria R, Janda J, Bláhová K, Karch H. (1998) Isolation and characterization of sorbitol-fermenting Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H- strains in the Czech Republic. *J Clin Microbiol.* 1998;36(7):2135–2137.

**Bielaszewska M**, Schmidt H, Liesegang A, Prager R, Rabsch W, Tschäpe H, Čížek A, Janda J, Bláhová K, Karch H. (2000) Cattle can be a reservoir of sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H- strains and a source of human diseases. *J Clin Microbiol.* 2000;38(9):3470–3473.

**Bielaszewska M**, Fell M, Greune L, Prager R, Fruth A, Tschäpe H, Schmidt MA, Karch M. (2004) Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. *Infect Immun.* 2004;72(3):1812–1816.

**Bielaszewska M**, Karch H. (2005a) Consequences of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection for the vascular endothelium. *Thromb Haemost.* 2005;94(2):312–318.

**Bielaszewska M**, Sinha B, Kuczius T, Karch H. (2005b) Cytolethal distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells. *Infect Immun.* 2005;73(1):552–562.

**Bielaszewska M**, Zhang W, Tarr PI, Sonntag AK, Karch H (2005c) Molecular profiling and phenotype analysis of *Escherichia coli* O26:H11 and O26:NM: secular and geographic consistency of enterohemorrhagic and enteropathogenic isolates. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):4225–4228.

**Bielaszewska M**, Friedrich AW, Aldick T, Schürk-Bulgrin R, Karch H. (2006) Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clin Infect Dis.* 2006;43(9):1160–1167.

**Bielaszewska M**, Sonntag AK, Schmidt MA, Karch H. (2007) Presence of virulence and fitness gene modules of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O26. *Microbes and Infection.* 2007;9(7):891–897.

**Bielaszewska M**, Prager R, Vandivinit L, Müsken A, Mellmann A, Holt NJ, Tarr PI, Karch H, Zhang W. (2009) Detection and characterization of the fimbrial *sfp* cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O165:H25/NM isolates from humans and cattle. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(1): 64–71.

**Bielaszewska M**, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H. (2011a) Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis.* 2011;11(9):671–676.

**Bielaszewska M**, Middendorf B, Tarr PI, Zhang W, Prager R, Aldick T, Dobrindt U, Karch H, Mellmann A. (2011b) Chromosomal instability in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: impact on adherence, tellurite resistance and colony phenotype. *Mol Microbiol.* 2011;79(4):1024–1044.

**Bielaszewska M**, Mellmann A, Bletz S, Zhang W, Köck R, Kossow A, Prager R, Fruth A, Orth-Höller D, Marejková M, Morabito S, Caprioli A, Piérard D, Smith G, Jenkins C, Čurová K, Karch H. (2013a) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H- : A new virulent clone emerges in Europe. *Clin Infect Dis.* 2013;56(10):1373–1381.

**Bielaszewska M**, Rüter C, Kunsmann L, Greune L, Bauwens A, Zhang W, Kluczius T, Kim KS, Mellmann A, Schmidt MA, Karch H. (2013b) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin employs outer membrane vesicles to target mitochondria and cause endothelial and epithelial apoptosis. *PLoS Pathog.* 2013;9(12):e1003797.

**Bláhová K**, Janda J, Kreisinger J, Matějková E, Šedivá A. (2002) Long-term follow-up of Czech children with D+ hemolytic-uremic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2002; 17(6): 400–403.

**Blanco JE**, Blanco M, Alonso MP, Mora A, Dahbi G, Coira MA, Blanco J. (2004) Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Human Patients: Prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *J Clin Microbiol.* 2004;42(1):311–319.

**Boisen N**, Struve C, Scheutz F, Krogfelt KA, Nataro JP. (2008) New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infect Immun* 2008;76(7): 3281–3292.

**Brandt SM**, King N, Cornelius AJ, Premaratne A, Besser TE, On SL. (2011) Molecular risk assessment and epidemiological typing of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using a novel PCR binary typing system. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(7): 2458–2470.

**Brigotti M**, Carnicelli D, Ravanelli E, Barbieri S, Ricci F, Bontadini A, Tozzi AE, Scavia G, Caprioli A, Tazzari PL. (2008). Interactions between Shiga toxins and human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol.* 2008;84(4):1019–1027.

**Brockmeyer J**, Bielaszewska M, Fruth A, Bonn ML, Mellmann A, Humpf HU, Karch H. (2007) Subtypes of the plasmid-encoded serine protease EspP in Shiga toxin-

producing *Escherichia coli*: distribution, secretion, and proteolytic activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007;73:6351–6359.

**Brooks JT**, Sowers EG, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, Hoekstra RM, Strockbine NA. (2005) Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. *J Infect Dis.* 2005;192(8):1422–1429.

**Brunder W**, Schmidt H, Karch H. (1997) EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol Microbiol.* 1997; 24(4):767–778.

**Brunder W**, Schmidt H, Frosch M, Karch H. (1999). The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. *Microbiology.* 1999;145:1005–1014.

**Brunder W**, Khan AS, Hacker J, Karch H. (2001) Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun.* 2001;69(7):4447–4457.

**Buchholz U**, Bernard H, Werber D, Böhmer MM, Remschmidt C, Wilking H, Deleré Y, an der Heiden M, Adlhoch C, Dreesman J, Ehlers J, Ethelberg S, Faber M, Frank C, Fricke G, Greiner M, Höhle M, Ivarsson S, Jark U, Kirchner M, Koch J, Krause G, Lubber P, Rosner B, Stark K, Kühne M. (2011) German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *N Engl J Med.* 2011;365(19):1763–1770.

**Buvs G**, Gheldre Y, Dediste A, Moreau AI, Mascart G, Simon A, Allemeersch D, Scheutz F, Lauwers S, Piérard D. (2011) Incidence and virulence determinants of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections in the Brussels-capital region, Belgium, in 2008–2010. *J Clin Microbiol.* 2011;50(4):1336–1345.

**Buvs G**, Piérard D. (2012) Virulence Profiling and Disease Association of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* O157 and Non-O157 Isolates in Belgium. *Foodborne Pathogens and Disease.* 2012;9(6):530–535.

**Buvs G**, De Rauw K, Roisin S, Vanfraechem G, Denis O, Jacobs F, Scheutz F, Piérard D. (2013) Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* O128ab:H2 Bacteremia in a 27-Year-Old Male with Hemolytic-Uremic Syndrome. *J Clin Microbiol.* 2013;51(5):1633–1635.

**Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** (2013) Outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 Infections Associated with Sprout Consumption - Europe and North America, May-July 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2013;62(50):1029–1031.

**Chapman TA**, Wu XY, Barchia I, Bettelheim A, Driesen S, Trott D, Wilson M, Chin JC. (2006) Comparison of Virulence Gene Profiles of *Escherichia coli* Strains Isolated from Healthy and Diarrheic Swine. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(7): 4782–4795.

**Čížek A**, Alexa P, Literák I, Hamrik J, Novák P, Smola J. (1999) Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle and Norwegian rats from a large-scale farm. *Lett Appl Microbiol.* 1999;28(6):435–439.

- Čížek A**, Dolejská M, Novotná R, Haas D, Vyskočil M. (2008) Survey of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* O157 and drug-resistant coliform bacteria from in-line milk filters on dairy farms in the Czech Republic. *J Appl Microbiol.* 2008;104(3):852–860.
- Crothers JLD**, Moore JE, Millar B, Watabe M, Rooney PJ. (2004) Determination of verocytotoxin and *eae* gene loci by multiplex PCR in *Escherichie coli* O157:H7 isolated from human faeces in Northern Ireland: a four-year study of trends, 1997–2000. *Brit J Biomed Sci.* 2004; 61(1): 1–7.
- Croxen MA**, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. (2013) Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(4):822–880.
- Dallman T**, Cross L, Bishop C, Perry N, Olesen B, Grant KA, Jenkins C. (2013) Whole Genome Sequencing of an Unusual Serotype of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(8):1302–1304.
- D'Souza JM**, Wang L, Reeves P. (2002) Sequence of the *Escherichia coli* O26 O-antigen gene cluster and identification of O26 specific genes. *Gene.* 2002;297:123–127.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** (2013) Annual Epidemiological Report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2013.
- Eklund M**, Scheutz F, Siitonen A. (2001) Clinical isolates of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. *J Clin Microbiol.* 2001;39(8):2829–2834.
- Eklund M**, Bielaszewska M, Nakari UM, Karch H, Siitonen A. (2006) Molecular and phenotypic profiling of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H- human isolates from Finland. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(7): 634–641.
- Elliott EJ**, Robins-Browne RM, O'Loughlin EV, Bennett-Wood V, Bourke J, Henning P, Hogg GG, Knight J, Powell H, Redmond D. (2001) Contributors to the Australian Paediatric Surveillance Unit. I. Nationwide study of haemolytic uraemic syndrome: clinical, microbiological, and epidemiological features. *Arch Dis Child.* 2001;85(2): 125–131.
- Espié E**, Grimont F, Mariani-Kurkdjian P, Bouvet P, Haeghebaert S, Filliol I, Loirat C, Decludt B, Minh NN, Vaillant V, de Valk H.I. (2008) Surveillance of hemolytic uremic syndrome in children less than 15 years of age, a system to monitor O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in France, 1996–2006. *Pediatr Infect Dis J.* 2008; 27(7): 595–601.
- Ethelberg S**, Olsen KE, Scheutz F, Jensen C, Schiellerup P, Enberg J, Petersen AM, Olesen B, Gerner-Smidt P, Mølbak K. (2004) Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(5):842–847.



**Ethelberg S**, Smith B, Torpdahl M, Lisby M, Boel J, Jensen T, Nielsen EM, Mølbak K. (2009) Outbreak of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection from consumption of beef sausage. *Clin Infect Dis* 2009;48(8):e78–81.

**EUCAST committees and subcommittees.** (2013) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST SOP 4.1, 2013. Dostupný na [www: http:// www.eucast.org/translations](http://www.eucast.org/translations)

**European Centre for Disease Prevention and Control.** (2013) Annual Epidemiological Report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2013.

**European Food Safety Authority (EFSA).** (2013) Scientific Opinion on VTEC-serovars and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA Journal*, 2013;11(4):3138. Dostupný na [www: http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3138.htm](http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3138.htm)

**Feldman KA**, Mohle-Boetani JC, Ward J, Furst K, Abbott SL, Ferrero DV, Olsen A, Werner SB. (2002) A cluster of *Escherichia coli* O157: nonmotile infections associated with recreational exposure to lake water. *Public Health Rep.* 2002;117(4): 380–385.

**Frank C**, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, an der Heiden M, Bernard H, Fruth A, Prager R, Spode A, Wadl M, Zoufaly A, Jordan S, Kemper MJ, Follin P, Müller L, King LA, Rosner B, Buchholz U, Stark K, Krause G. (2011) Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med.* 2011;365(19):1771–1780.

**Fraser ME**, Fujinaga M, Cherney MM, Melton-Celsa AR, Twiddy EM, O'Brien AD, James MNG. (2004) Structure of Shiga Toxin Type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem.* 2004;279(26):27511–27517.

**Friedrich AW**, Bielaszewska M, Zhang W, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, Karch H. (2002) *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis.* 2002;185(1):74–84.

**Friedrich AW**, Borell J, Bielaszewska M, Fruth A, Tschäpe H, Karch H. (2003) Shiga toxin 1c-producing *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic characterization and association with human disease. *J Clin Microbiol.* 2003;41(6):2448–2453.

**Friedrich AW**, Nierhoff KV, Bielaszewska M, Mellmann A, Karch H. (2004) Phylogeny, clinical associations, and diagnostic utility of the pilin subunit gene (*sfpA*) of sorbitol-fermenting, enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H-. *J Clin Microbiol.* 2004;42(10):4697–4701.

**Friedrich AW**, Köck R, Bielaszewska M, Zhang W, Karch H, Mathys W. (2005) Distribution of the urease gene cluster and urease activity among enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 from humans. *J Clin Microbiol.* 2005;43(2):546–550.

**Friedrich AW**, Lu S, Bielaszewska M, Prager R, Bruns P, Xu JG, Tschäpe H, Karch H. (2006) Cytolethal distending toxin in *Escherichia coli* O157:H7: spectrum of conservation, structure, and endothelial toxicity. *J Clin Microbiol.* 2006;44(5):1844–1846.

**Garg AX**, Suri RS, Barrowman N, Rehman F, Matsell D, Rosas-Arellano MP, Salvadori M, Haynes RB, Clark WF. (2003) Long-term renal prognosis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *JAMA.* 2003; 290(10):1360–1370.

**Gerber A**, Karch H, Allerberger F, Verweyen HM, Zimmerhackl LB. (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.* 2002;186(4):493–500.

**Gould LH**, Mody RK, Ong KL, Clogher P, Cronquist AB, Garman KN, Lathrop S, Medus C, Spina NL, Webb TH, White PL, Wymore K, Gierke RE, Mahon BE, Griffin PM. (2013) Emerging Infections Program Foodnet Working Group. Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. *Foodborne Pathog Dis.* 2013;10(5):453–460.

**Guo H**, Feng L, Tao J, Zhang C, Wang L. (2004) Identification of *Escherichia coli* O172 O-antigen gene cluster and development of a serogroup-specific PCR assay. *J Appl Microbiol.* 2004;97(1):181–190.

**Hancock DD**, Besser TE, Kinsel ML, Tarr PI, Rice DH, Paros MG. (1994) The prevalence of *Escherichia coli* O157.H7 in dairy and beef cattle in Washington State. *Epidemiol Infect.* 1994;113(2):199–207.

**Hanna JN**, Humphreys JL, Ashton SE, Murphy DM. (2007) Haemolytic uraemic syndrome associated with a family cluster of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2007;31(3):300–303.

**Heuvelink AE**, Zwartkruis-Nahuis JT, van den Biggelaar FL, van Leeuwen WJ, de Boer E. (1999) Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *Int J Food Microbiol.* 1999;52(1-2):67–75.

**Heuvelink AE**, Van Heerwaarden C, Zwartkruis-Nahuis JTM, van Oosterom R, Edink K, van Duynhoven YT, de Boer E. (2002) *Escherichia coli* O157 infection associated with a petting zoo. *Epidemiol Infect.* 2002;129(2):295–302.

**Holme R.** (2003) Drinking water contamination in Walkerton, Ontario: positive resolutions from a tragic event. *Water Sci Technol.* 2003;47(3):1–6.

**Jackson MP**, Neill RJ, O'Brien AD, Holmes RK, Newland JW. (1987) Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiol Lett.* 1987;44(1):109–114.

- Janka A**, Bielaszewska M, Dobrindt U, Karch H. (2002) Identification and distribution of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* factor for adherence (efa1) gene in sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-. *Int J Med Microbiol.* 2002; 292(3-4):207–214.
- Janka A**, Bielaszewska M, Dobrindt U, Greune L, Schmidt MA, Karch H. (2003) Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: characterization and evolutionary considerations. *Infect Immun.* 2003;71(6):3634–3638.
- Jenkins C**, Pearce MC, Smith AW, Knight HI, Shaw DJ, Cheasty T, Foster G, Gunn GJ, Dougan G, Smith HR, Frankel G. (2003) Detection of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111 and O145 from bovine faeces using immunomagnetic separation and PCR/DNA probe techniques. *Lett Appl Microbiol.* 2003; 37(3):207–212.
- Jinadasa RN**, Bloom SE, Weiss RS, Duhamel GE. (2011) Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiology.* 2011; 157(Pt 7):1851–1875.
- Johnson JR**, Stell AL. (2000) Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis.* 2000;181(1):261–272.
- Käppeli U**, Hächler H, Giezendanner N, Beutin L, Stephan R. (2011) Human infections with non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Switzerland, 2000–2009. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(2):180–185.
- Karch H**, Wiss R, Gloning H, Emmrich P, Aleksić S, Bockemühl J. (1990) Hemolytic-uremic syndrome in infants due to verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Dtsch Med Wochenschr.* 1990;115(13):489–495.
- Karch H**, Schubert S, Zhang D, Zhang WL, Schmidt H, Olschläger T, Hacker J. (1999) A genomic island, termed high-pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infect Immun.* 1999;67(11):5994–6001.
- Karch H**, Tarr PI, Bielaszewska M. (2005) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol.* 2005;295(6-7):405–418.
- Karch H**, Denamur E, Dobrindt U, Finlay BB, Hengge R, Johannes L, Ron EZ, Tønnum T, Sansonetti PJ, Vicente M. (2012) The enemy within us: lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak. *EMBO Mol Med.* 2012;4(9):841–848.
- Karmali MA**, Steele BT, Petric M, Lim C. (1983) Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet.* 1983;1(8325):619–620.

**Karmali MA**, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H. (1985) The association between hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 1985;151(5):775–782.

**Karmali MA**, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K, Kaper JB. (2003) Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):4930–4940.

**Karmali MA.** (2004) Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Mol Biotechnol.* 2004;26(2):117–122.

**Karmali MA**, Gannon V, Sargeant JM. (2010) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):360–370.

**Konno T**, Yatsuyanagi J, Takahashi S, Kumagai Y, Wada E, Chiba M, Saito S. (2013) Determination of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Serotype O165:HNM Infection in a Hemolytic Uremic Syndrome Patient with Adenovirus Serotype 41. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(5):394–397.

**Kudva IT**, Hatfield PG, Hovde CJ. (1996) *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *J Clin Microbiol.* 1996;34(2):4310–433.

**Levine M**, Xu JG, Kaper JB, Lior H, Prado V, Tall B, Nataro J, Karch H, Wachsmuth K. (1987) A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis.* 1987;156(1):175–182.

**Lhotová H**, Bielaszewska M, Kopalová E, Štolbová M. (1990) Haemolyticko-uremický syndrom - mikrobiologické šetření. *Cesk Epid Mikrobiol Imunol*, 1990;39(1):13–20.

**Lienemann T**, Salo E, Rimhanen-Finne R, Rönholm K, Taimisto M, Hirvonen JJ, Tarkka E, Kuusi M, Siitonen A. (2012) Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* JA, Serotype O78:H–in Family, Finland, 2009. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(4): 577–581.

**Liu Y**, Fratamico P, Debroy C, Bumbaugh AC, Allen JW. (2008) DNA sequencing and identification of serogroup-specific genes in the *Escherichia coli* O118 O antigen gene cluster and demonstration of antigenic diversity but only minor variation in DNA sequence of the O antigen clusters of *E. coli* O118 and O151. *Foodborne Pathog Dis.* 2008;5(4):449–457.

**Louise CB**, Obrig TG. (1995) Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J Infect Dis*, 1995;172(5):1397–1401.

**Luna-Gierke RE**, Griffin PM, Gould LH, Herman K, Bopp CA, Strockbine N, Mody RK. (2014) Outbreaks of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: USA. *Epidemiol Infect.* 2014; Jan 7:1–11. [Epub ahead of print]

- Lynn RM**, O'Brien SJ, Taylor CM, Adak GK, Chart H, Cheasty T, Coia JE, Gillespie IA, Locking ME, Reilly WJ, Smith HR, Waters A, Willshaw GA. (2005) Childhood hemolytic uremic syndrome, United Kingdom and Ireland. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(4):590–596.
- Machado J**, Grimont F, Grimont PA. (2000) Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene. *Res. Microbiol.* 2000;151(7): 535–546.
- Maidhof H**, Guerra B, Abbas S, Elsheikha HM, Whittam TS, Beutin L. (2002) A multiresistant clone of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O118:[H16] is spread in cattle and humans over different European countries. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(12):5834–5842.
- Makino KK**, Yokoyama Y, Kubota CH, Yutsudo S, Kimura K, Kurokawa K, Ishii M, Hattori I, Tatsuno H, Abe T, Iida K, Yamamoto M, Onishi T, Hayashi T, Yasunaga T, Honda C, Sasakawa C, Shinagawa H. (1999) Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from the Sakai outbreak. *Genes Gen Syst.* 1999; 74(5):227–239.
- Marejková M**, Zieg J, Dušek J, Bláhová K, Petráš P. (2009) Smrtelný případ diareapozitivního hemolyticko-uremického syndromu vyvolaného enterohemoragickou *E. coli* O26. *Zprávy EM (SZÚ, Praha)* 2009;18(6):212–214.
- Marejková M**, Roháčová H, Reisingerová M, Petráš P. (2012) An imported case of bloody diarrhea in the Czech Republic caused by a hybrid enteroaggregative hemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC) O104:H4 strain associated with the large outbreak in Germany, May 2011. *Folia Microbiol (Praha).* 2012;57(2):85–89.
- Marejková M**, Bláhová K, Janda J, Fruth A, Petráš P. (2013) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* as causes of hemolytic uremic syndrome in the Czech Republic. *PLoS One*, 2013;8(9):e73927.
- Mellmann A**, Bielaszewska M, Köck R, Friedrich AW, Fruth A, Middendorf B, Harmsen D, Schmidt MA, Karch H. (2008) Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1287–1290.
- Melton-Celsa AR**, Kokai-Kun JF, O'Brien AD. (2002) Activation of Shiga toxin type 2d (Stx2d) by elastase involves cleavage of the C-terminal two amino acids of the A<sub>2</sub> peptide in the context of the appropriate B pentamer. *Mol Microbiol.* 2002; 43(1):207–215.
- Mody RK**, Griffin PM. (2013) Fecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: What Should be Done to Prevent Secondary Cases? *Clin Infect Dis.* 2013;56(8):1141–1144.
- Mora A**, López C, Dhabí G, López-Beceiro AM, Fidalgo LE, Díaz EA, Martínez-Carrasco C, Mamani R, Herrera A, Blanco JE, Blanco M, Blanco J. (2012)

Seropathotypes, Phylogroups, Stx subtypes, and intimin types of wildlife-carried, shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains with the same characteristics as human-pathogenic isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(8):2578–2585.

**Nataro JP, Kaper JB. (1998)** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(1):142–201.

**Orth D, Grif K, Dierich MP, Würzner R. (2007)** Variability in tellurite resistance and the *ter* gene cluster among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans, animals and food. *Res in Microbiol.* 2007;158(2):105–111.

**Orth D, Grif K, Zimmerhackl LB, Würzner R. (2009)** Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in Austria. *Wien Klin Wochenschr.* 2009;121(3-4): 108–112.

**Orth D, Würzner R. (2010)** Complement in typical hemolytic uremic syndrome. *Semin Thromb Hemost* 2010;36(6):620–624.

**Paton AW, Paton JC. (1998)** Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*<sub>O111</sub>, and *rfb*<sub>O157</sub>. *J Clin Microbiol.* 1998;36(2):598–602.

**Paton AW, Woodrow MC, Doyle RM, Lanser JA, Paton JC. (1999)** Molecular characterization of a Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 1999; 37(10):3357–3361.

**Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC. (2001)** Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun.* 2001;69(11):6999–7009.

**Paton AW, Srimanote P, Talbot UM et al. (2004)** A new family of potent AB5 cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J Exp Med.* 2004; 200(1): 35–46.

**Perelle S, Dilasser F, Grout J, Fach P. (2004)** Detection by 5′-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the worlds most frequent clinical cases. *Mol Cell Probes.* 2004;18(3):185–192.

**Persson S, Olsen KEP, Ethelberg S, Scheutz F. (2007)** Subtyping method for *Escherichia coli* Shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *J Clin Microbiol.* 2007;45(6):2020–2024.

**Prager R, Fruth A, Siewert U, Strutz U, Tschäpe H. (2009)** *Escherichia coli* encoding Shiga toxin 2f as an emerging human pathogen. *Int J Med Microbiol.* 2009;299(5):343–353.

- Prager R**, Fruth A, Busch U, Tietze E. (2011) Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of Shiga toxin 2g and heat-stable enterotoxin ST1a encoding *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and environmental sources. *Int J Med Microbiol*. 2011;301(3):181–191.
- Rangel JM**, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. (2005) Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(4):603–609.
- Ribot EM**, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. (2006) Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, Salmonella, and Shigella for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis*. 2006; 3(1):59–67.
- Riley LW**, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med*. 1983;308(12): 681–685.
- Rivas M**, Miliwebsky E, Chinen I, Roldán CD, Balbi L, García B, Fiorilli G, Sosa-Estani S, Kincaid J, Rangel J, Griffin PM; Case-Control Study Group. (2006) Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathog Dis*. 2006;3(1):88–96.
- Rosales A**, Hofer J, Zimmerhackl LB, Jungraithmayr TC, Riedl M, Giner T, Strasak A, Orth-Höller D, Würzner R, Karch H: German-Austrian HUS Study Group. (2012) Need for long-term follow-up in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-associated hemolytic uremic syndrome due to late-emerging sequelae. *Clin Infect Dis*. 2012;54(10):1413–1421.
- Rosser T**, Dransfield T, Allison L, Hanson M, Holden N, Evans J, Naylor S, La Ragione R, Low JC, Gally DL. (2008) Pathogenic potential of emergent sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:NM. *Infect Immun*. 2008;76(12):5598–5607.
- Scheutz F**, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton-Celsa AR, Sanchez M, Persson S, O'Brien AD. (2012) Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol*. 2012;50(9):2951–2963.
- Scheiring J**, Andreoli SP, Zimmerhackl LB. (2008) Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic-uremic syndrome (HUS). *Pediatr Nephrol*. 2008;23(10): 1749–1760.
- Schmidt H**, Plaschke B, Franke S, Rüssmann H, Schwarzkopf A, Heesemann J, Karch H. (1994). Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing *eae* genes. *Med Microbiol Immunol Berl*. 1994;183(1):23–31.

- Schmidt H**, Beutin L, Karch H. (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun.* 1995;63(3): 1055–1061.
- Schmidt H**, Henkel B, Karch H. (1997) A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *FEMS Microbiol Lett.* 1997;148(2): 265–272.
- Schmidt MA.** (2010) LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cell Microbiol*, 2010; 12(11):1544–1552.
- Scotland SM**, Smith HR, Rowe B. (1985) Two distinct toxins active on Vero cells from *Escherichia coli* O157. *Lancet.* 1985;2(8460):885–886.
- Skočková A**, Karpíšková R, Koláčková I. (2013a) Resistance and virulence factors in *Escherichia coli* from meat and milk. *Maso-international Brno.* 2013;3(1):17–21.
- Skočková A**, Karpíšková R, Koláčková I, Cupáková Š. (2013b) Characteristics of *Escherichia coli* from raw vegetables at a retail market in the Czech republic. *Int J Food Microbiol.* 2013;167(2):196–201.
- Söderlund R**, Hedenström I, Nilsson A, Eriksson E, Aspán A. (2012) Genetically similar strains of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from sheep, cattle and human patients. *BMC Vet Res.* 2012;8:200. doi: 10.1186/1746-6148-8-200.
- Sonntag AK**, Bielaszewska M, Mellmann A, Dierksen N, Schierack P, Wieler LH, Schmidt MA, Karch H. (2005a) Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(12):8855–8863.
- Sonntag AK**, Zenner E, Karch H, Bielaszewska M. (2005b) Pigeons as a possible reservoir of Shiga toxin 2f-producing *Escherichia coli* pathogenic to humans. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2005;118(11-12):464–470.
- Steyert SR**, Kaper JB. (2012) Contribution of urease to colonization by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2012;80(8):2589–2600.
- Stritt A**, Tschumi S, Kottanattu L, Bucher BS, Steinmann M, von Steiger N, Stephan R, Hächler H, Simonetti GD. (2013) Neonatal hemolytic uremic syndrome after mother-to-child transmission of a low-pathogenic stx2b harboring shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis.* 2013;56(1):114–116.
- Tarr CL**, Large TM, Moeller CL, Lacher DW, Tarr PI, Acheson DW, Whittam TS. (2002) Molecular characterization of a serotype O121:H19 clone, a distinct Shiga toxin-producing clone of pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2002;70(12):6853–6859.
- Tarr PI**, Neill MA, Clausen CR, Watkins SL, Christie DL, Hickman RO. (1990) *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology. *J Infect Dis.* 1990;162(2):553–556.



- Tarr PI**, Bilge SS, Vary JCJ, Jelacic S, Habeeb RL, Ward TR, Baylor MR, Besser TE. (2000) Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun.* 2000;68(3):1400–1407.
- Tarr PI**, Gordon CA, Chandler WL. (2005) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet.* 2005;365(9464):1073–1086.
- Tatsuno I**, Horie M, Abe H, Miki T, Makino K, Shinagawa H, Taguchi H, Kamiya S, Hayashi T, Sasakawa C. (2001) *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun.* 2001; 69(11):6660–6669.
- Taylor D**, Rooker M, Keelen M, Ng LK, Martin I, Perna NT, Burland NT, Blattner FR. (2002) Genome variability of O islands encoding tellurite resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *J Bacteriol.* 2002; 184(17): 4690–4698.
- Taylor EV**, Nguyen TA, Machesky KD, Koch E, Sotir MJ, Bohm SR, Folster JP, Bokanyi R, Kupper A, Bidol SA, Emanuel A, Arends KD, Johnson SA, Dunn J, Stroika S, Patel MK, Williams I. (2013) Multistate outbreak of *Escherichia coli* O145 infections associated with romaine lettuce consumption, 2010. *J Food Prot.* 2013; 76(6):939–944.
- Tilden J Jr**, Young W, McNamara AM, Custer C, Boesel B, Lambert-Fair MA, Majkowski J, Vugia D, Werner SB, Hollingsworth J, Morris JG Jr. (1996) A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health.* 1996;86(6):1142–1145.
- Toma C**, Espinosa EM, Song T, Miliwebsky E, Chinen I, Iyoda S, Iwanaga M, Rivas M. (2004) Distribution of Putative Adhesins in Different Seropathotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2004;42(11):4937–4946.
- Torres AG**, Zhou X, Kaper JB. (2005) Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun.* 2005;73(1):18–29.
- Tozzi E**, Caprioli A, Minelli F, Gianviti A, De Petris L, Edefonti A, Montini G, Ferretti A, De Palo T, Gaido M, Rizzoni G; HUS Study Group. (2003) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988–2000. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(1):106–108.
- Trevena WB**, Hooper RS, Wray C, Willshaw GA, Cheasty T, Domingue G. (1996) Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with companion animals. *Vet Rec.* 1996;138(16):400.
- Wallace JS**, Cheasty T, Rowe B. (1997) Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. *J Appl Microbiol.* 1997;82(3):399–404.

- Weiss A, Brockmeyer J. (2012)** Prevalence, Biogenesis, and Functionality of the Serine Protease Autotransporter EspP. *Toxins(Basel)*. 2012;5(1):25–48.
- Wendel AM, Johnson DH, Sharapov U, Grant J, Archer JR, Monson T, Koschmann C, Davis JP. (2009)** Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with consumption of packaged spinach, August-September 2006: the Wisconsin investigation. *Clin Infect Dis*. 2009;48(8):1079–1086.
- Werber D, Behnke SC, Fruth A, Merle R, Menzler S, Glaser S, Kreienbrock L, Prager R, Tschäpe H, Roggentin P, Bockemühl J, Ammon A. (2007)** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in Germany: different risk factors for different age groups. *Am J Epidemiol*. 2007;165(4):425–434.
- Wickham ME, Lupp C, Mascarenhas M, Vazquez A, Coombes BK, Brown NF, Coburn BA, Deng W, Puente JL, Karmali MA, Finlay BB. (2006)** Bacterial genetic determinants of non-O157 STEC outbreaks and hemolytic-uremic syndrome after infection. *J Infect Dis*. 2006;194(6):819–827.
- Yin X, Wheatcroft R, Chambers JR, Liu B, Zhu J, Gyles CL. (2009)** Contributions of O island 48 to adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to epithelial cells in vitro and in ligated pig ileal loops. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(19):5779–5786.
- Yokoyama K, Makino K, Kubota Y, Watanabe M, Kimura S, Yutsudo CH, Kurokawa K, Ishii K, Hattori M, Tatsuno I, Abe H, Yoh M, Iida T, Ohnishi M, Hayashi T, Yasunaga T, Honda T, Sasakawa C, Shinagawa H. (2000)** Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain derived from the Sakai outbreak. *Gene*. 2000;258(1-2):127–139.
- Zhang WL, Bielaszewska M, Liesegang A, Tschäpe H, Schmidt H, Bitzan M, Karch H. (2000)** Molecular characteristics and epidemiological significance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains. *J Clin Microbiol*. 2000;38(6):2134–2140.
- Zhang WL, Köhler B, Oswald E, Beutin L, Karch H, Morabito S, Caprioli A, Suerbaum S, Schmidt H. (2002)** Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *Clin Microbiol*. 2002;40(12):4486–4492.
- Zhang WL, Nadirk J, Kossow A, Bielaszewska M, Leopold SR, Witten A, Fruth A, Karch H, Ammon A, Mellmann A. (2014)** Phylogeny and phenotypes of clinical and environmental Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O174. *Environ Microbiol*. 2014;16(4):963–976.
- Zieg J, Dusek J, Marejkova M, Limrova P, Blazek D, Pavlicek P, Grega M, Janda J, Blahova K. (2012)** Fatal case of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome with severe neurologic involvement. *Pediatr Int*. 2012;54(1):166–167.
- Zoja C, Buelli S, Morigi M. (2010)** Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: pathophysiology of endothelial dysfunction. *Pediatr Nephrol*. 2010;25(11):2231–2240.

## 10. PŘÍLOHY

### seznam příloh *in extenso*

**10.1 Marejková M**, Bláhová K, Janda J, Fruth A, Petráš P. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* as causes of hemolytic uremic syndrome in the Czech Republic. *PLoS One*, 2013;8(9):e73927. IF<sub>2012</sub>=3.730

**10.2 Marejková M**, Petráš P. Enterohemoragické *Escherichia coli* jako původci průjmu v České republice, 1965–2013. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 2014;63(3): v tisku. IF<sub>2012</sub>= 0.306

**10.3 Marejková M**, Roháčová H, Reisingerová M, Petráš P. An imported case of bloody diarrhea in the Czech Republic caused by a hybrid enteroaggregative hemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC) O104:H4 strain associated with the large outbreak in Germany, May 2011. *Folia Microbiol (Praha)*, 2012;57(2):85-89. IF<sub>2012</sub>=0.791

**10.4 Bielaszewska M**, Mellmann A, Bletz S, Zhang W, Köck R, Kossow A, Prager R, Fruth A, Orth-Höller D, **Marejková M**, Morabito S, Caprioli A, Piérard D, Smith G, Jenkins C, Curová K, Karch H. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H- : A new virulent clone emerges in Europe. *Clin Infect Dis*, 2013;56:1373-1381. IF<sub>2012</sub>= 9.374

Potvrzení o přijetí  
přílohy **10.2** do tisku


Redakční rada časopisu  
**Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie**  
Státní zdravotní ústav, Centrum epidemiologie a mikrobiologie, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10  
e-mail: [emi@szu.cz](mailto:emi@szu.cz), tel: 267 082 259

Ing. Monika Marejková  
Státní zdravotní ústav  
Šrobárova 48  
Praha 10

Praze dne 24.4. 2014

#### POTVRZENÍ

Redakční rada časopisu *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie* obdržela článek autorů Marejková M., Petráš P. "Enterohemoragické *Escherichia coli* jako původci průjmu v České republice, 1965-2013" upravený dle připomínek recenzentů a zařadila jej do připravovaného čísla 3/2014.

  
MUDr. Pavla Křížová, CSc.  
vedoucí redaktorka časopisu EMI

# Enterohemorrhagic *Escherichia coli* as Causes of Hemolytic Uremic Syndrome in the Czech Republic

Monika Marejková<sup>1,2\*</sup>, Květa Bláhová<sup>3</sup>, Jan Janda<sup>3</sup>, Angelika Fruth<sup>4</sup>, Petr Petráš<sup>1</sup>

**1** National Reference Laboratory for *E. coli* and Shigella, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic, **2** The 3<sup>rd</sup> Medical Faculty, Charles University Prague, Prague, Czech Republic, **3** Department of Pediatrics, 2<sup>nd</sup> Medical Faculty, Charles University Prague and the University Hospital Motol, Prague, Czech Republic, **4** National Reference Center for Salmonella and Other Enteric Pathogens, Robert Koch Institute, Wernigerode, Germany

## Abstract

**Background:** Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) cause diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome (D+ HUS) worldwide, but no systematic study of EHEC as the causative agents of HUS was performed in the Czech Republic. We analyzed stools of all patients with D+ HUS in the Czech Republic between 1998 and 2012 for evidence of EHEC infection. We determined virulence profiles, phenotypes, antimicrobial susceptibilities and phylogeny of the EHEC isolates.

**Methodology/Principal Findings:** Virulence loci were identified using PCR, phenotypes and antimicrobial susceptibilities were determined using standard procedures, and phylogeny was assessed using multilocus sequence typing. During the 15-year period, EHEC were isolated from stools of 39 (69.4%) of 56 patients. The strains belonged to serotypes [*fliC* types] O157:H7/NM[*fliC*<sub>H7</sub>] (50% of which were sorbitol-fermenting; SF), O26:H11/NM[*fliC*<sub>H11</sub>], O55:NM[*fliC*<sub>H7</sub>], O111:NM[*fliC*<sub>H8</sub>], O145:H28[*fliC*<sub>H28</sub>], O172:NM[*fliC*<sub>H25</sub>], and Orough:NM[*fliC*<sub>H25</sub>]. O26:H11/NM[*fliC*<sub>H11</sub>] was the most common serotype associated with HUS (41% isolates). Five *stx* genotypes were identified, the most frequent being *stx*<sub>2a</sub> (71.1% isolates). Most strains contained EHEC-*hlyA* encoding EHEC hemolysin, and a subset (all SF O157:NM and one O157:H7) harbored *cdt-V* encoding cytolethal distending toxin. *espPα* encoding serine protease EspPα was found in EHEC O157:H7, O26:H11/NM, and O145:H28, whereas O172:NM and Orough:NM strains contained *espPγ*. All isolates contained *eae* encoding adhesin intimin, which belonged to subtypes β (O26), γ (O55, O145, O157), γ2/θ (O111), and ε (O172, Orough). Loci encoding other adhesins (*efa1*, *lpfA*<sub>O26</sub>, *lpfA*<sub>O157O1-141</sub>, *lpfA*<sub>O157O1-154</sub>, *iha*) were usually associated with particular serotypes. Phylogenetic analysis demonstrated nine sequence types (STs) which correlated with serotypes. Of these, two STs (ST660 and ST1595) were not found in HUS-associated EHEC before.

**Conclusions/Significance:** EHEC strains, including O157:H7 and non-O157:H7, are frequent causes of D+ HUS in the Czech Republic. Identification of unusual EHEC serotypes/STs causing HUS calls for establishment of an European collection of HUS-associated EHEC, enabling to study properties and evolution of these important pathogens.

**Citation:** Marejková M, Bláhová K, Janda J, Fruth A, Petráš P (2013) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* as Causes of Hemolytic Uremic Syndrome in the Czech Republic. PLoS ONE 8(9): e73927. doi:10.1371/journal.pone.0073927

**Editor:** Wing-Cheong Yam, The University of Hong Kong, China

**Received:** March 26, 2013; **Accepted:** July 26, 2013; **Published:** September 6, 2013

**Copyright:** © 2013 Marejková et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The authors have no support or funding to report.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: monmarej@szu.cz

## Introduction

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are the pathogenic subgroup of Shiga toxin (Stx)-producing *E. coli* strains that cause human diseases including diarrhea, bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome (HUS). HUS is a severe, potentially life-threatening condition characterized by non-immune hemolytic anemia, thrombocytopenia, and acute renal failure [1]. HUS caused by EHEC strains is typically preceded with diarrhea (and therefore designated D+ HUS), that usually begins as non-bloody and progresses to bloody after several days [1]. D+ HUS usually affects children under 5 years [1] and is the most common cause of acute renal insufficiency in children. It develops in 10–15% children infected with EHEC O157:H7 [1] and also complicates infections with other EHEC serotypes [2–9]. In addition to the kidneys, other organs can be affected during HUS including the central nervous system, the pancreas, the heart, the liver and the lungs [1]. The involvement of the central nervous system is the

most severe and is associated with higher mortality [6]. The mortality of D+ HUS during the acute phase is <5%, and there is a high frequency of late renal or non-renal sequelae in survivors [10,11].

Microvascular endothelial damage is the major pathological change underlying HUS [1,12]. Stxs are presently the best characterised EHEC virulence factors that cause the microvascular endothelial injury [12]. Stxs are released by EHEC in the intestine, absorbed across the intestinal epithelium into the circulation, and transported to microcapillaries of the target organs, mainly the kidneys and the brain. Here Stxs bind to glycosphingolipids of the globo-series, which are abundantly expressed on both glomerular and brain microvascular endothelial cells [13,14]. This triggers a complex cascade of events resulting in a multi-organ thrombotic process [12]. Although the Stx family is highly heterogeneous, not all Stx types have been associated with HUS [15,16]. Stx2 is the most common Stx type found in EHEC

isolated from HUS patients [3,15–17], but Stx2c, Stx2d and Stx1 also occur in HUS-associated EHEC [3,15]. In contrast, Stx2b, Stx2e, Stx2f and Stx2g have not been found at all or are found very rarely among HUS isolates [15,16,18–20]. A possible explanation for the epidemiological association of Stx2 with severe outcome of EHEC infections is the *in vitro* observation that Stx2 is significantly more cytotoxic towards human renal [21] and human brain [22] microvascular endothelial cells than Stx1.

The classical non-sorbitol-fermenting (NSF) EHEC O157:H7 is the predominant cause of HUS worldwide [1,23,24]. In addition, several other EHEC serotypes, the most frequent of which are O26:H11/NM (non-motile), O91:H21, O103:H2/NM, O111:H8/NM, O113:H21, and O145:H25/H28/NM, have been increasingly recognized as causes of HUS in Europe [3–5,7,17,25–27], North America [8], South America [20], and Australia [28]. EHEC strains that have the capability of causing HUS have been designated HUSEC (HUS-associated *E. coli*) [3].

The role of EHEC as causes of HUS in the Czech Republic has not yet been systematically studied. Here, we investigated stool samples from all patients with D+ HUS hospitalized in pediatric centers in the Czech Republic between 1998 and 2012 for EHEC infection. We determined serotypes of the EHEC isolates, a subset of molecular and phenotypic characteristics, and their phylogenetic relationships. Moreover, we determined susceptibilities of the strains to a spectrum of antimicrobials.

## Materials and Methods

### Ethics Statement

This study was approved by the Ethical Committee of the University Hospital Motol, Prague, Czech Republic. Written informed consent for enrollment in the study and publication of patients data was obtained from parents of all patients.

### Patients and Stool Samples

During January 1998 to December 2012, stool samples from 56 patients with HUS were investigated for EHEC infection in the Reference Laboratory for *E. coli* and *Shigella* of the National Institute of Public Health in Prague, Czech Republic. This laboratory is specialized for diagnosis of EHEC infections and receives stools from all patients with HUS from this country. The patients originated from different regions of the Czech Republic and there were no apparent temporal or geographical linkages between them. Thirty-four of 56 patients (60.7%) were boys and 22 (39.3%) were girls. All patients were children (median age, 27.5 months; range, 10 to 85 months). Stool samples were collected between 2 and 15 days (median, 6 days) after the onset of prodromal diarrhea.

### Case Definition

HUS was defined as a case of microangiopathic hemolytic anemia (hematocrit <30% with peripheral evidence of intravascular hemolysis), thrombocytopenia (platelet count <150,000 platelets/mm<sup>3</sup>), and renal insufficiency (serum creatinine concentration higher than the upper limit of the normal range for age) [1].

### Detection of EHEC in and Isolation from Patients Stools

The stool samples were enriched in G.N. Enrichment Broth (Hajna) (Laboratorios Conda, Madrid, Spain) with novobiocin supplement (Oxoid, Hampshire, UK) for 5–7 hours (37°C, 180 rpm) and the enriched cultures were inoculated on Columbia blood agar, sorbitol MacConkey agar (SMAC), cefixime-tellurite (CT)-SMAC agar and enterohemolysin agar (all from Oxoid).

Since 2008, the enrichment cultures were additionally examined for the presence of *E. coli* O157, O26, O103, O111, and O145 using an immunomagnetic separation (Dynabeads anti-*E. coli* O157, Dynabeads EPEC/VTEC O26, Dynabeads EPEC/VTEC O103, Dynabeads EPEC/VTEC O111, Dynabeads EPEC/VTEC O145) according to the manufacturers (Dynal, Oslo, Norway) protocol and subsequently plated on the above media. After overnight incubation at 37°C, bacterial growth from all four plates was collected in a tube containing 1 ml of 0.85% NaCl; 100 µl of this suspension was diluted 1:10 in sterile distilled water, heated for 10 min at 100°C and centrifuged (12000 rpm, 10 min). Supernatant was used as a template for PCR with primers KS7-KS8, LP43-LP44, and SK1-SK2 which target *stx*<sub>1a</sub>, *stx*<sub>2a</sub> and *aeae*, respectively [3,15]. All *stx*-positive samples were further PCR tested for genes of O antigen biosynthetic clusters of *E. coli* O157, O26, O55, O111, O103, O145, O91 and O113 [29–31]. To isolate strains from samples with positive *stx* PCR results, bacterial suspensions were restreaked on SMAC, CT-SMAC and enterohemolysin agar plates. *E. coli* O157:H7 was isolated from SMAC and/or CT-SMAC using agglutination of sorbitol-negative colonies in O157 antiserum (Denka Seiken Ltd., Tokyo, Japan). EHEC of the major non-O157 serogroups (O26, O111, O145) were isolated from enterohemolysin agar based on their typical enterohemolytic phenotype combined with agglutination in antisera against the respective *E. coli* O antigens (Sifin, Berlin, Germany; Denka Seiken). If no sorbitol-negative or enterohemolytic colonies were present on SMAC/CT-SMAC or enterohemolysin agar, respectively, multiple colonies from these plates (altogether up to 50) were tested for *stx*<sub>1a</sub> and *stx*<sub>2a</sub> genes using PCRs described above. The isolates were confirmed as *E. coli* biochemically (API 20E; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and using a MALDI-TOF mass spectrometer (Microflex LT, Bruker Daltonics, Germany). Mass spectra were processed using the BioTyper software with the version 3.2.1.0. database. Motility of the isolates was determined directly after isolation as follows: The strains were inoculated into the middle of tubes containing soft (0.5%) agar, incubated at 37°C and observed for growth daily. An isolate was considered motile if it spread out of the original inoculation site during 10 days. If there was no growth from the inoculation site during this time, the isolate was considered nonmotile (NM).

### Detection of other Enteric Bacterial Pathogens in Stools

The presence of *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, and *Campylobacter jejuni* in stools was sought using standard microbiological procedures.

### Serotyping

*stx* positive colonies were serotyped using agglutination in polyvalent and monovalent *E. coli* O antisera (Denka Seiken Co., Ltd., Tokyo, Japan; Sifin, Berlin, Germany; Robert Koch Institute, Wernigerode, Germany) and H antisera (Denka Seiken). The presence of the O26, O55, O111, O145, O157, and O172 antigens was confirmed using PCRs targeting genes of the respective O antigen biosynthetic clusters [29–32]. The flagellin subunit-encoding *fliC* gene was subtyped using HhaI restriction fragment length polymorphism as described previously [7].

### Genotypic Characteristics

PCRs were performed in a MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, München, Germany) using reagents from Top-Bio (Prague, Czech Republic) and primers from Generi Biotech (Hradec Kralove, Czech Republic). All isolates were tested for *stx*<sub>1a</sub>, *stx*<sub>2a</sub>, and their subtypes (*stx*<sub>1c</sub>, *stx*<sub>2b</sub>, *stx*<sub>2c</sub>, *stx*<sub>2d</sub>, *stx*<sub>2e</sub>, *stx*<sub>2f</sub>) using published

PCR protocols [15,16]. Genes encoding other toxins (*cdt-V*, EHEC-*hlyA*,  $\alpha$ -*hlyA*), the EHEC serine protease EspP (*espP*), and adhesins (*eae*, *efa1*, *lpfA*<sub>O26</sub>, *lpfA*<sub>O157OI-141</sub>, *lpfA*<sub>O157OI-154</sub>, *iha*) were PCR detected as described previously [15,33–38]. *eae* genes were subtyped according to Zhang et al. [39] (*eae*  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ) and Blanco et al. [40] (*eae*  $\gamma$ 2/ $\theta$ ). *espP* genes were subtyped according to Brockmeyer et al. [36]. *terE* and *wreD* used as markers for the *ter* and *wre* gene clusters, which encode tellurite resistance urease production, respectively, were amplified as described previously [41,42]. Genes within the O island (OI) 122 of EHEC O157:H7 strain EDL933 (*efa1*, *sen*, *nleE*, *nleB*, *pagC*) were detected using published PCR protocols [25,43].

### Phenotypic Characteristics

Utilization of sorbitol was tested on SMAC. Moreover, utilization of sorbitol, rhamnose and production of lysine decarboxylase (LDC) was evaluated according to the API 20E test kit (bioMérieux). Production of  $\beta$ -D-glucuronidase was investigated using COLItest (Erba Lachema, Brno, Czech Republic). Production of EHEC hemolysin and  $\alpha$  hemolysin was sought using enterohemolysin agar and Columbia blood agar (Oxoid), respectively. Production of Stx was tested using a Vero cell cytotoxicity assay [2]. The Stx titer was defined as the highest dilution of culture supernatant that caused cytotoxicity in 50% cells after 3 days of incubation. The Stx types (Stx1, Stx2) were identified using VTEC-RPLA assay (Denka Seiken) according to the manufacturer's instructions. Resistance to tellurite was determined based on the ability of the strains to grow on CT-SMAC. Urease production was determined using the API 20E test.

### Antimicrobial Susceptibility Testing

Susceptibility to ampicillin, cefotaxime, ceftazidime, gentamicin, trimethoprim/sulfamethoxazole, ciprofloxacin, amikacin, meropenem, piperacillin/tazobactam, tigecycline, chloramphenicol, and nitrofurantoin was tested using the disk diffusion method according to EUCAST breakpoints [44] and standard recommendations [45].

### Multilocus Sequence Typing (MLST)

MLST was performed by sequencing internal fragments of seven housekeeping genes (*adhk*, *fimC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, and *recA*) as described previously [3]. Sequences were analyzed and the minimum-spanning tree was constructed using the SeqSphere software version 0.9 beta.1 (Ridom GmbH, Münster, Germany). All alleles and sequence types (ST) were assigned in accordance with the MLST website (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>).

## Results

### Clinical Features

Among the 56 patients investigated, 52 (92.9%) had prodromal diarrhea, which was bloody in 31 (59.6%). HUS was diagnosed between 2 and 15 days (median, 6 days) after the onset of diarrhea. The median length of hospitalization was 17 days (range, 4 to 55 days). Three patients (5.4%) died during acute phase of HUS. The causes of the deaths were neurological complications (cerebral edema) in two patients (girls, 18 and 25 months old, both infected with EHEC O26:H11), one of whom also developed lung edema; one patient (boy, 30 months old, infected with sorbitol-fermenting (SF) EHEC O157:NM) died of acute renal failure. Deaths occurred between 3 and 6 days (median, 3 days) after HUS development.

### Serotypes and *fliC* Genotypes of EHEC Isolates

Stool samples from 39 of 56 patients (69.6%) were positive in screening for *stx*<sub>1a</sub> and/or *stx*<sub>2a</sub> genes using PCR. EHEC strains were isolated from all of these 39 *stx*-positive stool samples. Thirty-seven isolates belonged to eight different serotypes and two were non-typeable (Orough) (Table 1). The most common serotype was O26:H11/NM (non-motile), which accounted for 16 (41%) of 39 isolates (Table 1). The second most common serotype was O111:NM (six of 39 isolates; 15.4%). NSF EHEC O157:H7/NM were isolated from five (12.8%) patients and an additional five patients (12.8%) were positive for SF EHEC O157:NM strains (Table 1). One isolate belonged to serotype O172:NM, which has been rarely isolated from patients with HUS [25].

Seven of 10 O157 isolates (two NSF and all five SF), six of 16 (37.5%) O26 isolates, and all O111, O55, O172 and Orough isolates were non-motile, making conventional H typing impossible (Table 1). Subtyping of *fliC* genes encoding the flagellar subunit of the H antigens demonstrated that the non-motile O157 and O26 isolates contained *fliC*<sub>H7</sub> and *fliC*<sub>H11</sub>, respectively, which was also present in motile isolates of these serotypes. The non-motile isolates of serogroups O111, O55 and O172 contained *fliC*<sub>H8</sub>, *fliC*<sub>H7</sub>, and *fliC*<sub>H25</sub>, respectively (Table 1), allowing rapid molecular H typing. *fliC*<sub>H25</sub> was also present in both Orough:NM isolates (Table 1).

None of the 39 patients from whom EHEC strains were isolated had other intestinal bacterial pathogens (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Y. enterocolitica*, *C. jejuni*) in their stools.

### Seasonal Distribution of EHEC Serotypes

Most EHEC strains (29 of 39; 74.4%) were isolated during the warm period of the year (May to September) (Figure 1). However, no clear seasonality in occurrence of particular serotypes was observed. NSF O157:H7/NM strains were isolated from January through August and SF O157:NM from February to June. O26:H11/NM isolates were almost equally distributed throughout the year (Figure 1).

### *stx* Genotypes

*stx* genes were present in all 39 EHEC isolates upon isolation, but one strain (SF O157:NM) lost its *stx* gene during laboratory subcultures before *stx* subtyping could be performed. Three different *stx* alleles (*stx*<sub>1a</sub>, *stx*<sub>2a</sub>, *stx*<sub>2c</sub>), which through different combinations gave rise to five *stx* genotypes, were identified among the remaining 38 strains (Table 1). The *stx*<sub>2a</sub> genotype was the most frequent, being present in 27 of 38 (71.1%) strains. The *stx*<sub>2a</sub> genotype was identified in all strains of serotypes O157:NM (SF), O55:NM, O145:H28, O172:NM, Orough:NM, and in the majority (15 of 16) of O26:H11 strains (Table 1). Only one of five NSF EHEC O157 isolates contained the *stx*<sub>2a</sub> as the only *stx* gene. The other four NSF O157 strains harbored *stx*<sub>2c</sub> in combination with either *stx*<sub>1a</sub> or *stx*<sub>2a</sub> gene. *stx*<sub>2c</sub> did not occur in any other serotype (Table 1). *stx*<sub>1a</sub> as the only *stx* gene was found in three of 38 strains (7.9%) including one of 16 EHEC O26:H11 and two of six O111:NM strains (Table 1).

### Non-*stx* Virulence Genes

Strains of all but one serotype (O55:NM) contained genes encoding non-Stx toxins including cytolethal distending toxin V (Cdt-V) and/or EHEC hemolysin (Table 1). Both *cdt-V* and EHEC-*hlyA* genes were present in four of five SF O157:NM strains and in one NSF O157:H7 strain (Table 1). EHEC-*hlyA*, but not *cdt-V*, was present in all strains of serotypes O26:H11/NM, O145:H28, O172:NM, and Orough:NM, and in four NSF

**Table 1.** Serotypes and genotypic characteristics of EHEC strains isolated from patients with HUS in the Czech Republic, 1998–2012.

Virulence locus <sup>a</sup>	Serotype (number of strains) <sup>b</sup>							
	O157:H7/NM (NSF)	O157:NM (SF)	O55:NM	O26:H11/NM	O111:NM	O145:H28	O172:NM	Orough:NM
	<i>fliC<sub>H7</sub></i> (n = 5)	<i>fliC<sub>H7</sub></i> (n = 5)	<i>fliC<sub>H7</sub></i> (n = 2)	<i>fliC<sub>H11</sub></i> (n = 16)	<i>fliC<sub>H8</sub></i> (n = 6)	<i>fliC<sub>H28</sub></i> (n = 2)	<i>fliC<sub>H25</sub></i> (n = 1)	<i>fliC<sub>H25</sub></i> (n = 2)
<i>stx<sub>1a</sub></i>	– <sup>c</sup>	–	–	+ (1) <sup>c</sup>	+ (2)	–	–	–
<i>stx<sub>2a</sub></i>	+ (1)	+ (4) <sup>d</sup>	+	+ (15)	–	+	+	+
<i>stx<sub>1a</sub>+stx<sub>2a</sub></i>	–	–	–	–	+ (4)	–	–	–
<i>stx<sub>1a</sub>+stx<sub>2c</sub></i>	+ (2)	–	–	–	–	–	–	–
<i>stx<sub>2a</sub>+stx<sub>2c</sub></i>	+ (2)	–	–	–	–	–	–	–
<i>cdt-V</i>	+ (1)	+	–	–	–	–	–	–
EHEC- <i>hlyA</i>	+	+ (4)	–	+	+ (4)	+	+	+
$\alpha$ - <i>hlyA</i>	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>espP</i> <sup>e</sup>	+ ( $\alpha$ )	–	–	+ ( $\alpha$ ) (9)	–	+ ( $\alpha$ ) (1)	+ ( $\gamma$ )	+ ( $\gamma$ )
<i>eae</i> <sup>f</sup>	+ ( $\gamma$ )	+ ( $\gamma$ )	+ ( $\gamma$ )	+ ( $\beta$ )	+ ( $\gamma$ 2/ $\theta$ )	+ ( $\gamma$ )	+ ( $\epsilon$ )	+ ( $\epsilon$ )
<i>efa1</i>	+ <sup>g</sup>	+	+	+	+	+ <sup>g</sup>	+	+
<i>lpfA<sub>O26</sub></i>	–	–	–	+	+	–	–	–
<i>lpfA<sub>O157/OI-141</sub></i>	+	+	+	–	–	+	–	–
<i>lpfA<sub>O157/OI-154</sub></i>	+	+	+	–	–	–	–	–
<i>iha</i>	+	–	–	+	+ (5)	+	–	–
<i>terE</i>	+	–	–	+	+ (5)	+	–	–
<i>ureD</i>	+	–	–	+	+ (5)	+	–	–
<i>irp2</i>	–	–	–	+	–	–	–	–
<i>fyuA</i>	–	–	–	+	–	–	–	–

<sup>a</sup>The genes encode the following proteins: *fliC*, flagellar subunit of H antigen; *stx*, Shiga toxin; *cdt-V*, cytolethal distending toxin V; EHEC-*hlyA*, EHEC hemolysin;  $\alpha$ -*hlyA*,  $\alpha$  hemolysin; *espP*, serine protease EspP; *eae*, intimin; *efa1*, EHEC factor for adherence; *lpfA<sub>O26</sub>*, major subunit of long polar fimbriae of EHEC O26; *lpfA<sub>O157/OI-141</sub>* and *lpfA<sub>O157/OI-154</sub>*, major subunit of long polar fimbriae of EHEC O157 encoded on O island OI 154 and OI 141, respectively; *iha*, iron-regulated gene A homologue adhesin; *terE*, marker for tellurite resistance-encoding cluster; *ureD*, marker for *ure* cluster encoding urease production; *irp2* and *fyuA*, markers for the high pathogenicity island (HPI) encoding iron uptake system.

<sup>b</sup>Serotypes were determined using conventional and molecular serotyping; the *fliC* genes indicated were present in both motile and non-motile strains of each respective serotype; NSF, non-sorbitol-fermenting; SF, sorbitol-fermenting.

<sup>c</sup>–, the gene was absent; +, the gene was present (if the gene was not present in all strains of the respective serotype, the numbers of positive strains are indicated in parenthesis).

<sup>d</sup>one strain lost *stx* gene before subtyping.

<sup>e</sup>*espP* subtypes are indicated in parentheses.

<sup>f</sup>*eae* subtypes are indicated in parentheses.

<sup>g</sup>a truncated *efa1* gene [34] was present in EHEC O157:H7 and one O145:H28 isolate; complete *efa1* was present in all other strains.

doi:10.1371/journal.pone.0073927.t001

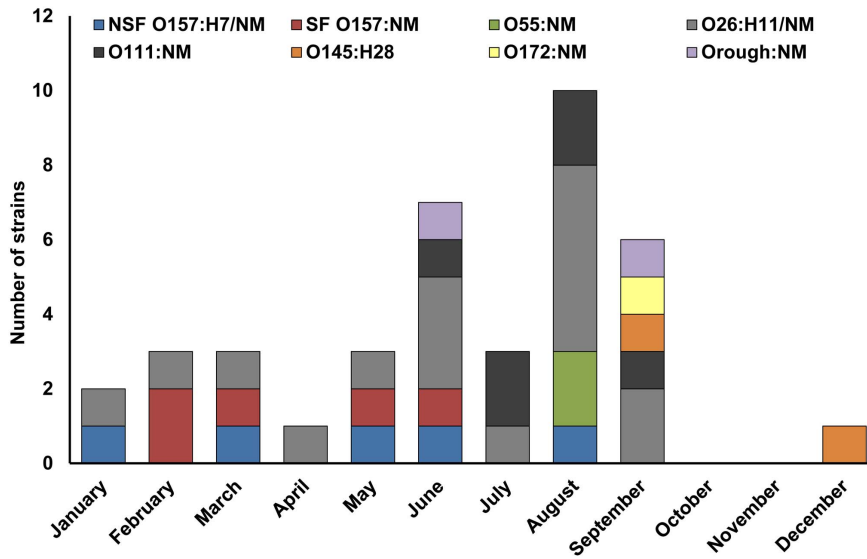
O157:H7/NM and four O111:NM isolates (Table 1). None of the 39 strains contained  $\alpha$ -*hlyA* gene encoding  $\alpha$  hemolysin (Table 1). All or most strains of serotypes O157:H7/NM (NSF), O26:H11/NM, O145:H28, O172:NM and Orough:NM contained the *espP* gene encoding the plasmid-encoded serine protease EspP [36]. Subtyping of the *espP* genes demonstrated that the O157:H7/NM, O26:H11/NM and O145:H28 strains contain *espP $\alpha$* , whereas the O172:NM and Orough:NM strains contain *espP $\gamma$* ; each of these *espP* alleles encodes proteolytically active EspP [36]. *espP* was absent from all strains of serotypes O157:NM (SF), O55:NM, and O111:NM (Table 1).

All 39 EHEC isolates contained the *eae* gene encoding intimin, the major adhesin of EHEC. Four different *eae* subtypes ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\gamma$ 2/ $\theta$ ,  $\epsilon$ ) were identified, which were associated with particular serotypes. The *eae*  $\gamma$  allele was broadly distributed (being present in all O157, O55, and O145 strains), whereas the other *eae* alleles ( $\beta$ ,  $\gamma$ 2/ $\theta$ ,  $\epsilon$ ) were usually restricted to one serotype (Table 1). In addition to *eae*, genes encoding other established or putative adhesins were found in the EHEC isolates. The *efa1* gene encoding

the EHEC factor for adherence (Efa-1) [34] was present in strains of all serotypes (Table 1), but it was truncated in NSF O157:H7/NM and in one of O145:H28 strains as reported previously for *E. coli* O157:H7 [34]. In contrast, loci encoding other adhesins (*lpfA<sub>O26</sub>*, *lpfA<sub>O157/OI-141</sub>*, *lpfA<sub>O157/OI-154</sub>*, *iha*) were restricted to only some serotypes (Table 1).

### Other Loci

All NSF O157:H7/NM, O26:H11/NM, and O145:H28 strains, and five of six O111:NM strains contained *terE* and *ureD* genes, which were used as markers for the gene clusters encoding tellurite resistance and urease production, respectively. These loci were found in none of the strains of the other serotypes (Table 1). The *irp2* and *fyuA* genes, which are components of the iron-uptake system encoded in the high pathogenicity island (HPI) identified in EHEC by Karch et al. [46] were present only in strains of serotype O26:H11/NM (Table 1).



**Figure 1. Seasonal distribution of EHEC strains of different serotypes isolated from patients with HUS in the Czech Republic, 1998–2012.**  
doi:10.1371/journal.pone.0073927.g001

**Presence of OI 122 in EHEC Isolates**

The presence of OI 122 in EHEC strains, and the gene content of this genomic island (i.e. the presence of *pagC*, *nleE*, *nleB*, *sen*, and *efa1* loci) correlate with virulence of EHEC strains [25,43]. In accordance with their origin from patients with HUS, the EHEC strains characterized in this study contained a complete OI 122 (serotypes O157:H7/NM, O55:NM, O111:NM, and one O145:H28 strain) or an incomplete OI 122 which lacked only *pagC* (serotypes O26:H11, O172:NM, Orough:NM, and one O145:H28 strain) (Table 2).

**Phenotypes**

All but one strain (SF O157 which lost *stx* gene) expressed Stx as demonstrated by cytotoxicity of their culture supernatants to Vero cells (Table 1). The Stx type produced by each strain determined using a latex agglutination assay correlated with *stx* genotype. Specifically, strains harboring *stx*<sub>1a</sub> only produced Stx1a only, those harboring *stx*<sub>2a</sub> only produced Stx2a only, and those

harboring *stx*<sub>1a</sub>+*stx*<sub>2a</sub> produced both Stx1a and Stx2a (Table 1, Table 3). Stx2c produced by O157:H7 strains with *stx* genotypes *stx*<sub>1a</sub>+*stx*<sub>2c</sub> or *stx*<sub>2a</sub>+*stx*<sub>2c</sub> was detected using the Stx2 latex reagent (Table 3). EHEC hemolysin was expressed by all EHEC-*hlyA*-harboring strains of serotypes O157:H7/NM (NSF), O111:NM, O145:H28, and by 15 of 16 EHEC-*hlyA*-containing O26:H11/NM. No EHEC hemolysin production was observed in EHEC-*hlyA*-positive SF EHEC O157:NM strains or in strains of serotypes O172:NM and Orough:NM (Table 3). In accordance with the absence of  $\alpha$ -*hlyA* gene (Table 1), none of the 39 EHEC isolates produced a hemolytic phenotype on blood agar (Table 3) Tellurite resistance was expressed in all strains of serotypes O157:H7/NM (NSF), O26:H11/NM, O111:NM, and O145:H28 which contained the *terE* gene, as demonstrated by their ability to grow on CT-SMAC. In contrast, none of the above strains, which also contained *ureD*, produced urease (Table 3). Sorbitol was utilized by all strains except for NSF O157:H7/NM, O172:NM, and Orough:NM as demonstrated by the appearance of their colonies

**Table 2. Presence of OI 122 among EHEC isolates from HUS patients.**

Locus of OI 122	Serotype (number of strains)							
	O157:H7/NM (NSF)	O157:NM (SF)	O55:NM	O26:H11/NM	O111:NM	O145:H28	O172:NM	Orough:NM
	<i>fliC<sub>H7</sub></i> (n = 5)	<i>fliC<sub>H7</sub></i> (n = 5)	<i>fliC<sub>H7</sub></i> (n = 2)	<i>fliC<sub>H11</sub></i> (n = 16)	<i>fliC<sub>H8</sub></i> (n = 6)	<i>fliC<sub>H28</sub></i> (n = 2)	<i>fliC<sub>H25</sub></i> (n = 2)	<i>fliC<sub>H25</sub></i> (n = 1)
<i>pagC</i>	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>nleE</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>nleB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>sen</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>efa1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
OI-122 <sup>b</sup>	C	C	C	I	C	C (1) I (1)	I	I

<sup>a</sup>*pagC* was present in one strain.

<sup>b</sup>C, complete OI 122 (all genes tested present); I, incomplete OI 122 (*pagC* absent).

doi:10.1371/journal.pone.0073927.t002



on SMAC and using API 20E test. Rhamnose was utilized by all NSF O157:H7/NM, O111:NM, and O145:H28 strains, but not by strains of the other serotypes (Table 3). All strains except those belonging to serotypes O111:NM, O172:NM and Orough:NM produced lysine decarboxylase (Table 3). All strains but NSF O157:H7/NM produced  $\beta$ -D-glucuronidase (Table 3).

### Antimicrobial Susceptibility

Nine of 39 EHEC isolates including five of 16 O26:H11/NM strains, and four of six O111:NM strains were resistant to ampicillin. One of these O26 isolates was also resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole. One additional isolate (O145:H28) was resistant to chloramphenicol. All the other 29 strains including all 10 O157 isolates were susceptible to all 12 antimicrobials tested (ampicillin, cefotaxime, ceftazidime, gentamicin, trimethoprim/sulfamethoxazole, ciprofloxacin, amikacin, meropenem, piperacillin/tazobactam, tigecycline, chloramphenicol, and nitrofurantoin).

### Phylogeny of EHEC Associated with HUS

MLST analysis of the 39 EHEC isolates resulted in nine different STs. Whereas eight of the nine STs clustered into three CCs (CC11, CC29, CC32), ST660 formed a separate clone not clustering into any known CC (Table 4). All EHEC O157:H7/NM (NSF) and O157:NM (SF) belonged, with a single exception (ST1595, which is a single locus variant (slv) of ST11) to ST11 (CC11). Both O55:NM strains (ST335) grouped as a slv of ST11 into the same CC (CC11) as EHEC O157:H7/NM. EHEC O26:H11/NM were equally distributed among two different STs, ST21 and ST29, which clustered together into CC29. The ST29 is composed of strains belonging to the new, highly virulent EHEC

O26 clone, which is widespread in Europe [7]. All six strains of serotype O111:NM belonged to ST16 (a slv of ST29) and grouped to CC29 together with EHEC O26 (Table 4). Both O145:H28 strains clustered into CC32 and belonged to ST32 and ST137, respectively, which are slvs. The O172:NM strain and both Orough:NM strains belonged to ST660, suggesting that they have a similar genomic background. Accordingly, a PCR analysis for the presence of the O172 biosynthetic cluster gave a positive result in all three strains demonstrating that they are all genetically O172. Phylogenetic relationships of the Czech HUS-associated strains, the distribution of strains of different serotypes into CCs and the comparison to the HUSEC collection [3] ([www.ehec.org](http://www.ehec.org)) are shown in Figure 2. Interestingly, this comparison revealed the presence of two STs that were not associated with HUS previously, namely ST660 and ST1595.

### Discussion

In this 15-year study we systematically investigated stools of patients with HUS for the evidence of EHEC infection. We demonstrate that approximately 70% of patients with D+ HUS contained EHEC strains in their stool samples. Similar to other European countries, EHEC associated with HUS in the Czech Republic involved strains of serogroup O157 and also several non-O157 serogroups. Notably, SF EHEC O157:NM, which were first identified in Germany [47] and later in other European countries [25,48–51], accounted for 50% of all EHEC O157 strains isolated from HUS patients in the Czech Republic during 1998–2012. All SF O157:NM isolates from the Czech Republic possessed *stx*<sub>2a</sub> gene, similar to such strains from Germany, but not *stx*<sub>1a</sub> which was identified in SF O157:NM isolated in Norway [50]. The most prevalent EHEC serotype associated with HUS in the Czech

**Table 3.** Phenotypes of EHEC strains isolated from patients with HUS in the Czech Republic.

Phenotype <sup>a</sup>	Serotype (number of strains)							
	O157:H7/NM (NSF)	O157:NM (SF)	O55:NM	O26:H11/NM	O111:NM	O145:H28	O172:NM	Orough:NM
	<i>fliC</i> <sub>H7</sub> (n = 5)	<i>fliC</i> <sub>H7</sub> (n = 5)	<i>fliC</i> <sub>H7</sub> (n = 2)	<i>fliC</i> <sub>H11</sub> (n = 16)	<i>fliC</i> <sub>H8</sub> (n = 6)	<i>fliC</i> <sub>H28</sub> (n = 2)	<i>fliC</i> <sub>H25</sub> (n = 1)	<i>fliC</i> <sub>H25</sub> (n = 2)
Vero cell titer <sup>b</sup>	32–128	16–512	32–64	16–128	64–2048	256–1024	128	512
Stx 1 <sup>c</sup>	– <sup>d</sup>	–	–	+ (1) <sup>d</sup>	+ (2)	–	–	–
Stx 2 <sup>c</sup>	+ (3)	+ (4)	+	+ (15)	–	+	+	+
Stx1+Stx2 <sup>c</sup>	+ (2)	–	–	–	+ (4)	–	–	–
EHEC–Hly	+	–	–	+ (15) <sup>e</sup>	+ (4)	+	– <sup>e</sup>	– <sup>e</sup>
$\alpha$ -Hly	–	–	–	–	–	–	–	–
CT–SMAC growth	+	–	–	+	+ (5)	+	–	–
Urease	–	–	–	–	–	–	–	–
SMAC	–	+	+	+	+	+	–	–
SOR	–	+	+	+	+	+	–	–
RHA	+	–	–	–	+	+	–	–
LDC	+	+	+	+	–	+	–	–
GLR	–	+	+	+	+	+	+	+

<sup>a</sup>EHEC–Hly, EHEC hemolysin production;  $\alpha$ -Hly,  $\alpha$  hemolysin production; growth on CT–SMAC, indicator of tellurite resistance; urease, urease production; SMAC, utilization of sorbitol on sorbitol MacConkey agar; SOR, utilization of sorbitol (API 20E); RHA, utilization of rhamnose (API 20E); LDC, production of lysine decarboxylase; GLR, production of  $\beta$ -D-glucuronidase.

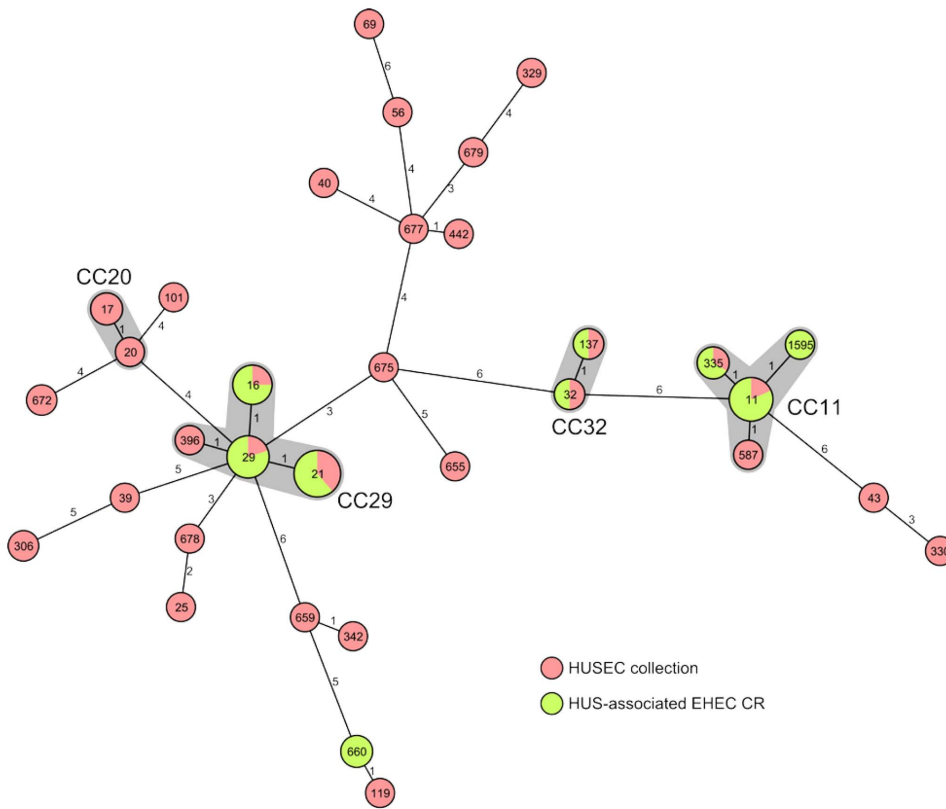
<sup>b</sup>The highest dilution of culture supernatant which caused cytotoxicity in 50% Vero cells after 3 days.

<sup>c</sup>Production of Stx1 and Stx2 tested using the VTEC - RPLA kit.

<sup>d</sup>–, the phenotype was absent; +, the phenotype was present (the numbers in parentheses indicated numbers of positive strains in the case that not all strains expressed the respective phenotype).

<sup>e</sup>one O26:H11 and O172:NM and Orough:NM strains did not express EHEC–*hlyA* gene.

doi:10.1371/journal.pone.0073927.t003



**Figure 2. Phylogeny of EHEC associated with HUS in the Czech Republic.** Minimum-spanning tree illustrating the clonal relationship between HUS-associated EHEC from the Czech Republic (green) and the HUSEC collection [3] (red) based on MLST allelic profiles. Each MLST sequence type (ST) is represented by a node named with its ST. The size of the node is proportional to the number of isolates reported in this study sharing the same ST. The number on the connecting lines indicates the number of alleles that were different between the two connected nodes. In addition, for the major serogroups (e.g. O157, O26) the STs and their corresponding clonal complexes (CC) were given and shaded in grey. doi:10.1371/journal.pone.0073927.g002

Republic is O26:H11/NM, a situation similar to that reported from Italy [26]. Our ability to isolate EHEC strains from all stool samples that tested positive for *stx* genes in the initial PCR screening demonstrates that the EHEC isolation procedure used in this study enables to identify reliably both O157 and non-O157

EHEC strains. In accordance with other studies [3,37,49], the large percentage of the Czech EHEC isolates were non-motile. This suggests that non-motility might either be an inherent characteristic of EHEC, in particular of some serogroups, or that such strains rapidly lose their motility *in vitro*, after they have left the host gastrointestinal tract. This observation underlines the importance of the *fliC* genotyping as an easy, rapid and reliable procedure for molecular H typing of EHEC isolates.

All EHEC isolated from HUS patients in the Czech Republic were *eae*-positive as are also most HUS-associated EHEC in other studies [5,8,15,17]. It has been shown in different studies that the rate of *eae*-negative strains among HUS EHEC isolates is low [3,17,28]. Mellmann et al. [3] reported that only 16 from 524 (3.1%) EHEC isolates from HUS patients were *eae*-negative. Among them was *E. coli* O104:H4 strain (HUSEC41) [3], which is closely related to the *E. coli* O104:H4 strain that caused the largest ever recorded outbreak of HUS in Germany in 2011 [52,53], with many secondary cases having occurred worldwide including the Czech Republic [54]. The O104:H4 outbreak strain isolated in 2011 from an American tourist with diarrhea who traveled to Prague from North Germany [54] is the only *eae*-negative EHEC isolated in this country from humans until now. Because *stx*-positive/*eae*-negative strains would have been detected using our PCR screening system, we assume that the absence of *eae*-negative strains among EHEC isolated from HUS patients in the Czech Republic in this study is due to low number of isolates resulting, in

**Table 4. Phylogeny of EHEC isolated from HUS patients in the Czech Republic determined by MLST.**

Serotype	Total no. of strains	ST (no. of strains)	CC
O157:H7/NM (NSF)	5	11 (4) 1595 (1)	11 11
O157:NM (SF)	5	11 (5)	11
O55:NM	2	335 (2)	11
O26:H11/NM	16	21 (8) 29 <sup>a</sup> (8)	29 29
O111:NM	6	16 (6)	29
O145:H28	2	32 (1) 137 (1)	32 32
O172:NM	1	660	n.a.
Orough:NM	2	660 (2)	n.a.

ST, sequence type; CC, clonal complex; n.a., not assigned.  
<sup>a</sup>ST29 strains belong to the new EHEC O26 clone [7].  
 doi:10.1371/journal.pone.0073927.t004

turn, from a low number of HUS cases that occur in this country (4–5 per year).

SF EHEC O157:NM caused several HUS outbreaks throughout Europe, the largest of which involved Germany [55,56], Scotland [57] and Norway [58]. Such strains differ from O157:H7 phenotypically, in particular by their ability to ferment sorbitol and produce  $\beta$ -D-glucuronidase, susceptibility to tellurite, lack of EHEC hemolysin expression and non-motility [41,47], and by expression of non-Stx toxins that may contribute to the pathogenesis of EHEC-mediated diseases. Specifically, Cdt-V, which causes irreversible injury to microvascular endothelial cells [59], the major targets affected during HUS, is produced by the majority of SF EHEC O157:NM strains [35], but only by a small subset of EHEC O157:H7, which belong to particular phage types [59]. Accordingly, all SF EHEC O157:NM and one NSF O157:H7 strain analyzed in this study harbored the loci encoding Cdt-V (Table 1). EHEC hemolysin, another toxin with a potential endothelium-injuring capacity [60], was regularly expressed by EHEC O157:H7, but not by SF O157:NM strains analyzed in this study (Table 3). Several studies suggest that infections with SF EHEC O157:NM more often progress to HUS [56–58] than those with NSF O157 [61] and that patients infected with SF O157:NM have a higher risk of death [56–58] than those infected with EHEC O157:H7 [61]. In both German large outbreaks caused by SF EHEC O157:NM strains the case-fatality ratio was 11% [55,56] compared to <1% reported for outbreaks caused by NSF EHEC O157:H7 [61]. In agreement with the high virulence of SF EHEC O157:NM strains, this strain was the cause of death in one patient in our study. The other two fatal cases were associated with infection by EHEC O26:H11, one of which belonged to the new highly virulent clone, which has emerged in Europe [7] and accounted for 50% of all O26 EHEC O26 isolated in this study.

EHEC O157:H7 have evolved from an *E. coli* O55:H7 ancestor possessing the locus of enterocyte effacement (LEE) by acquisition of Stx-encoding bacteriophages, virulence plasmid and transition of somatic antigen from O55 to O157 [62–64]. Leopold et al. [63] and others [65,66] provided evidence of limited diversity in SF O157:NM, much unlike the large biodiversity of EHEC O157:H7. We show that the NSF and SF O157 isolates described here all belong to the same clonal complex (CC11); multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) and single nucleotide polymorphism (SNP) analysis of the Czech strains is underway to more extensively compare the phylogenetic relationships of these strains and to compare them with strains from other countries [63,67,68].

Tellurite resistance is a diagnostically important feature enabling isolation of EHEC strains from CT-SMAC where normal intestinal flora are suppressed. In our study tellurite resistance occurred in all NSF EHEC O157, all O26 and both O145 isolates and in five of six O111 strains. All these strains also contained the *ure* cluster encoding urease production but none of them produced urease, in accordance with observations that *ure* genes are usually not expressed in EHEC strains [42]. The absence of both *ter* and *ure* loci in one O111:NM strain (Table 1) suggest that the strain have lost these loci, as have been previously reported for EHEC O157:H7 and attributed to deletions within OIs 43 and 48 that harbor these loci [69].

Antimicrobial susceptibility testing demonstrated resistance to one (9 isolates) or two (1 isolate) antimicrobials in 25.6% of the Czech EHEC strains studied. The resistance was associated with non-O157 EHEC serogroups. This situation is similar to that in Finland and Belgium where antimicrobial resistance was reported in 21.4% and 44.7% of EHEC patients isolates, respectively, and it was more frequent in non-O157 than in O157 strains [70,71]. As

in our study, none of the isolates from these countries was resistant to meropenem or imipenem, ciprofloxacin and amikacin. In contrast to our findings, multidrug resistance occurred in 24.1% of the Belgian [71] and in 7.1% of the Finnish EHEC isolates [70], as well as in an EHEC O145:H7 strain that caused a multistate outbreak of diarrhea and HUS in the United States [72]. The extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) phenotype, which was identified in an EHEC O26 human isolate in another Belgian study [73], and which is one of the typical features of the EHEC O104:H4 strain that caused the large 2011 outbreak in Germany [53,74] was not tested in the Czech EHEC HUS isolates in this study. Compared to EHEC, *E. coli* strains isolated from urine of patients with urinary tract infections or from blood cultures of patients with sepsis are more often multiresistant [75] or express the ESBL phenotype [76,77].

The spectrum of EHEC serotypes associated with HUS in the Czech Republic raises the question about reservoirs of these pathogens and sources of human infections in this country. Prevalence of EHEC in cattle feces in the Czech Republic was investigated by Alexa et al. [78]. EHEC shedding was observed in 70% to 100% animals in three different dairy farms. EHEC isolates belonged to serogroups O26, O103, O157, O128, and O54, the former three being isolated from HUS patients in our study. Čížek et al. [79] studied the occurrence of EHEC O157 in dairy farms in the Czech Republic. EHEC O157 strains harboring *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *ae*, and EHEC-*hlyA* genes were detected in four of 192 in-line filters examined. Several additional studies identified various animal species as sources of outbreaks or sporadic cases of EHEC infections in this country. In 1995, four cases of HUS in children caused by EHEC O157:H7 were associated with consumption of unpasteurized milk from a farm goat who shed the causative EHEC O157:H7 strain in its feces [80]. Three years later, SF EHEC O157:NM strains were isolated from two siblings (one with HUS and the other with diarrhea) and an epidemiologically associated cow, and a direct contact with the animal was implicated as a possible infection transmission route [81]. This was the first evidence that cattle can be a reservoir of SF EHEC O157 and a source of human diseases [81]. Altogether, these studies demonstrate that similar to other countries [27,40,61], cattle and other domestic animals are reservoirs of EHEC in the Czech Republic and can be sources of the infection for humans.

We conclude from our data that EHEC strains including O157:H7/NM and a spectrum of non-O157 serotypes are important causes of pediatric D+ HUS in the Czech Republic. Although the spectrum of EHEC serotypes resembles that found in other European countries, the finding of serotypes O172:NM[*fliC*<sub>H25</sub>] and Orough:NM[*fliC*<sub>H25</sub>], which are not members of the German HUSEC collection [3] ([www.ehec.org](http://www.ehec.org)) indicates the need for creating an European collection of HUS-associated EHEC. This collection would enable complex studies of virulence characteristics, mechanisms of adaptation to the human host and evolution of these pathogens, as well as development of optimized methods for their detection.

## Acknowledgments

We thank Dr. Blanka Horová (Department of Microbiology, Hospital Na Bulovce, Prague), Dr. Eliška Běbrová (Institute of Medical Microbiology, University Hospital Motol, Prague) Mgr. Tereza Škapová (Public Health Institute, Ostrava), Mgr. Eva Krejčí (Public Health Institute, Ostrava), PhD, Dr. Lenka Ryšková (Department of Microbiology, University Hospital, Hradec Kralove), Dr. Miroslava Brndiarová (University Hospital, Martin), Dr. Jana Salášková (University Hospital, Hradec Kralove), Dr. Jan Saitz (University Hospital Olomouc) and Dr. Alena Ševčíková (University Hospital Brno) for their kind support during the study.

Excellent technical assistance of Miluše Vašáková, Hana Pihávková and Jakub Mach (National Institute of Public Health, Prague) is greatly appreciated.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MM PP KB JJ. Performed the experiments: MM AF PP. Analyzed the data: MM PP AF KB PP. Contributed reagents/materials/analysis tools: AF KB JJ. Wrote the paper: MM KB PP.

## References

- Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL (2005) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and the haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 365: 1073–1086
- Schmidt H, Geitz C, Tarr PI, Frosch M, Karch H (1999) Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality. *J Infect Dis* 179: 115–123.
- Mellmann A, Bielaszewska M, Köck R, Friedrich AW, Fruth A, et al. (2008) Analysis of collection of hemolytic uraemic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 14: 1287–1290.
- Espié E, Grimont F, Mariani-Kurkdjian P, Bouvet P, Haeghebaert S, et al. (2008) Surveillance of hemolytic uraemic syndrome in children less than 15 years of age, a system to monitor O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in France, 1996–2006. *Pediatr Infect Dis J* 27: 595–601.
- Käppli U, Hächler H, Giezendanner N, Beutin L, Stephan R (2011) Human infections with non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Switzerland, 2000–2009. *Emerg Infect Dis* 17: 180–185.
- Zieg J, Dusek J, Marejkova M, Limrova P, Blazek D, et al. (2012) Fatal case of diarrhea-associated hemolytic uraemic syndrome with severe neurologic involvement. *Pediatr Int* 54: 166–167.
- Bielaszewska M, Mellmann A, Bletz S, Zhang W, Köck R, et al. (2013) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H-: A new virulent clone emerges in Europe. *Clin Infect Dis* 56: 1373–1381.
- Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, et al. (2005) Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. *J Infect Dis* 192: 1422–1429.
- Schimmer B, Nygard K, Eriksen HM, Lassen J, Lindstedt BA, et al. (2008) Outbreak of hemolytic uraemic syndrome in Norway caused by stx2-positive *Escherichia coli* O103:H25 traced to cured mutton sausages. *BMC Infect Dis* 8: 41. doi: 10.1186/1471-2334-8-41.
- Bláhová K, Janda J, Kreisinger J, Matejková E, Sedivá A (2002) Long-term follow-up of Czech children with D+ hemolytic-uraemic syndrome. *Pediatr Nephrol* 17: 400–403.
- Rosales A, Hofer J, Zimmerhackl LB, Jungraithmayr TC, Riedl M, et al. (2012) Need for long-term follow-up in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-associated hemolytic uraemic syndrome due to late-emerging sequelae. *Clin Infect Dis* 54: 1413–1421.
- Zoja C, Buelli S, Morigi M (2010) Shiga toxin-associated hemolytic uraemic syndrome: pathophysiology of endothelial dysfunction. *Pediatr Nephrol* 25: 2231–2240.
- Betz J, Bielaszewska M, Thies A, Humpf HU, Dreisewerd K, et al. (2011) Shiga toxin glycosphingolipid receptors in microvascular and macrovascular endothelial cells: differential association with membrane lipid raft microdomains. *J Lipid Res* 52: 618–634.
- Betz J, Bauwens A, Kunsmann L, Bielaszewska M, Mormann M, et al. (2012) Uncommon membrane distribution of Shiga toxin glycosphingolipid receptors in toxin-sensitive human glomerular microvascular endothelial cells. *Biol Chem* 393: 133–147.
- Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang W, Pulz M, Kuczius T, et al. (2002) *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* 185: 74–84.
- Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, et al. (2012) Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol* 50: 2951–2963.
- Ethelberg S, Olsen KE, Scheutz F, Jensen C, Schiellerup P, et al. (2004) Virulence factors for hemolytic uraemic syndrome, Denmark. *Emerg Infect Dis* 10: 842–847.
- Prager R, Fruth A, Siewert U, Strutz U, Tschäpe H (2009) *Escherichia coli* encoding Shiga toxin 2f as an emerging human pathogen. *Int J Med Microbiol* 299: 343–353.
- Prager R, Fruth A, Busch U, Tietze E (2011) Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of Shiga toxin 2g and heat-stable enterotoxin STIIa encoding *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and environmental sources. *Int J Med Microbiol* 301: 181–191.
- Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Roldán CD, Balbi L, et al. (2006) Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uraemic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathog Dis* 3: 88–96.
- Louise CB, O'Brig TG (1995) Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J Infect Dis* 172: 1397–1401.
- Bauwens A, Bielaszewska M, Kemper B, Langehanenberg P, von Bally G, et al. (2011) Differential cytotoxic actions of Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2 on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Thromb Haemost* 105: 515–528.
- Banatvala N, Griffin PM, Greene KD, Barrett TJ, Bibb WF, et al. (2001) The United States national prospective hemolytic uraemic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. *J Infect Dis* 183: 1063–1070.
- Lynn RM, O'Brien SJ, Taylor CM, Adak GK, Chart H, et al. (2005) Childhood hemolytic uraemic syndrome, United Kingdom and Ireland. *Emerg Infect Dis* 11: 590–596.
- Buvens G, Piérard D (2012) Virulence profiling and disease association of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and non-O157 isolates in Belgium. *Foodborne Pathog Dis* 9: 530–535.
- Tozzi E, Caprioli A, Minelli F, Gianviti A, De Petris L, et al. (2003) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with hemolytic uraemic syndrome, Italy, 1988–2000. *Emerg Infect Dis* 9: 106–108.
- Chase-Topping ME, Rosser T, Allison LJ, Courcier E, Evans J, et al. (2012) Pathogenic potential to humans of bovine *Escherichia coli* O26, Scotland. *Emerg Infect Dis* 18: 439–448.
- Elliott EJ, Robins-Browne RM, O'Loughlin EV, Bennett-Wood V, Bourke J, et al. (2001) Nationwide study of haemolytic uraemic syndrome: clinical, microbiological, and epidemiological features. *Arch Dis Child* 85: 125–131.
- Paton AW, Paton JC (1998) Detection and characterization of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx<sub>1</sub>, stx<sub>2</sub>, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, txf<sub>O111</sub>, and txf<sub>O157</sub>. *J Clin Microbiol* 36: 598–602.
- Perelle S, Dilasser F, Grout J, Fach P (2004) Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the worlds most frequent clinical cases. *Mol Cell Probes* 18: 185–192.
- DSouza JM, Wang L, Reeves P (2002) Sequence of the *Escherichia coli* O26 O antigen gene cluster and identification of O26 specific genes. *Gene* 297: 123–127.
- Guo H, Feng L, Tao J, Zhang C, Wang L (2004) Identification of *Escherichia coli* O172 O-antigen gene cluster and development of a serogroup-specific PCR assay. *J Appl Microbiol* 97: 181–190.
- Schmidt H, Beutin L, Karch H (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* 63: 1055–1061.
- Janka A, Bielaszewska M, Dobrindt U, Karch H (2002) Identification and distribution of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* factor for adherence (efaI) gene in sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157: H-. *Int J Med Microbiol* 292: 207–214.
- Janka A, Bielaszewska M, Dobrindt U, Greune L, Schmidt MA, et al. (2003) Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157: H7: characterization and evolutionary considerations. *Infect Immun* 71: 3634–3638.
- Brockmeyer J, Bielaszewska M, Fruth A, Bonn ML, Mellmann A, et al. (2007) Subtypes of the plasmid-encoded serine protease EspP in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: distribution, secretion, and proteolytic activity. *Appl Environ Microbiol* 73: 6351–6359.
- Bielaszewska M, Köck R, Friedrich AW, von Eiff C, Zimmerhackl LB, et al. (2007) Shiga toxin-mediated hemolytic uraemic syndrome: time to change the diagnostic paradigm? *PLoS One* 2: e1024.
- Toma C, Martínez Espinosa E, Song T, Miliwebsky E, Chinen I, et al. (2004) Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 42: 4937–4946.
- Zhang WL, Köhler B, Oswald E, Beutin L, Karch H, et al. (2002) Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 40: 4486–4492.
- Blanco M, Blanco JE, Mora A (2004) Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-ξ). *J Clin Microbiol* 42: 645–651.
- Bielaszewska M, Tarr PI, Karch H, Zhang W, Mathys W (2005) Phenotypic and molecular analysis of tellurite resistance among enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and sorbitol-fermenting O157:NM clinical isolates. *J Clin Microbiol* 43: 452–454.
- Friedrich AW, Köck R, Bielaszewska M, Zhang W, Karch H, et al. (2005) Distribution of the urease gene cluster and urease activity among enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 from humans. *J Clin Microbiol* 43: 546–550.
- Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, et al. (2003) Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol* 41: 4930–4940.
- EUCAST. EUCAST MIC and Zone diameter breakpoint tables. (2012) Available: [http://www.eucast.org/antimicrobial\\_susceptibility\\_testing/breakpoints/](http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/breakpoints/). Accessed 22 October 2012.

45. EUCAST. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. (2012) Available: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/Manual\\_v\\_2.1\\_EUCAST\\_Disk\\_Test.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Manual_v_2.1_EUCAST_Disk_Test.pdf). Accessed 22 October 2012.
46. Karch H, Schubert S, Zhang D, Zhang W, Schmidt H, et al. (1999) A genomic island, termed high-pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infect Immun* 67: 5994–6001.
47. Karch H, Wiss R, Gloning H, Emmrich P, Aleksic S, et al. (1990) Hemolytic-uremic syndrome in infants due to verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Dtsch Med Wochenschr* 115: 489–495.
48. Orth D, Grif K, Zimmerhackl LB, Würzner R (2009) Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in Austria. *Wien Klin Wochenschr* 121: 108–112.
49. Eklund M, Bielaszewska M, Nakari UM, Karch H, Siitonen A (2006) Molecular and phenotypic profiling of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H- human isolates from Finland. *Clin Microbiol Infect* 12: 634–641.
50. Brandal LT, Løbersli I, Stavnes TL, Wester AL, Lindstedt BA (2012) First report of the Shiga toxin 1 gene in sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-. *J Clin Microbiol* 50: 1825–1826.
51. Pollock KG, Locking ME, Beattie TJ, Maxwell H, Ramage I, et al. (2010) Sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157, Scotland. *Emerg Infect Dis* 16: 881–882.
52. Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, et al. (2011) Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany - Preliminary report. *N Engl J Med* 19: 1771–1780.
53. Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, et al. (2011) Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis* 11: 671–676.
54. Marejková M, Roháčová H, Reisingerová M, Petráš P (2012) An imported case of bloody diarrhoea in the Czech Republic caused by a hybrid enteroaggregative hemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC) O104:H4 strain associated with the large outbreak in Germany, May 2011. *Folia Microbiol* 57: 85–89.
55. Ammon A, Peterson LR, Karch H (1999) A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *E. coli* O157:H-. *J Infect. Dis* 179: 1274–1277.
56. Alpers K, Werber D, Frank C, Koch J, Friedrich AW, et al. (2009) Sorbitol-fermenting enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- causes another outbreak of haemolytic uraemic syndrome in children. *Epidemiol Infect* 137: 389–395.
57. Rosser T, Dransfield T, Allison L, Hanson M, Holden N, et al. (2008) Pathogenic potential of emergent sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:NM. *Infect Immun* 76: 5598–5607.
58. Haugum K, Lindstedt BA, Løbersli I, Kapperud G, Brandal LT (2012) Identification of the anti-terminator qO111:H- gene in Norwegian sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:NM. *FEMS Microbiol Lett* 329: 102–110.
59. Friedrich AW, Lu S, Bielaszewska M, Prager R, Bruns P, et al. (2006) Cytotoxicity of Shiga toxin in *Escherichia coli* O157:H7: spectrum of conservation, structure, and endothelial toxicity. *J Clin Microbiol* 44: 1844–1846.
60. Aldick T, Bielaszewska M, Zhang W, Brockmeyer J, Schmidt H, et al. (2007) Hemolysin from Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O26 strains injures microvascular endothelium. *Microbes Infect* 9: 282–290.
61. Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL (2005) Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerg Infect Dis* 11: 603–609.
62. Feng P, Lampel KA, Karch H, Whittam TS (1998) Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis* 177: 1750–1753.
63. Leopold SR, Magrini V, Holt NJ, Shaikh N, Mardis ER, et al. (2009) A precise reconstruction of the emergence and constrained radiations of *Escherichia coli* O157 portrayed by backbone concatenomic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 8713–8718.
64. Bono JL, Smith TP, Keen JE, Harhay GP, McDanel TG, et al. (2012) Phylogeny of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 isolated from cattle and clinically ill humans. *Mol Biol Evol* 29: 2047–2062.
65. Jenke C, Harmsen D, Weniger T, Rothgänger J, Hyytiä-Trees E, et al. (2010) Phylogenetic analysis of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157, Germany, 1987–2008. *Emerg Infect Dis* 16: 610–616.
66. Jenke C, Leopold SR, Weniger T, Rothgänger J, Harmsen D, et al. (2012) Identification of intermediate in evolutionary model of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Emerg Infect Dis* 18: 582–588.
67. Izumiya H, Pei Y, Terajima J, Ohnishi M, Hayashi T, et al. (2010) New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111. *Microbiol Immuno* 54: 569–577.
68. Jenke C, Lindstedt BA, Harmsen D, Karch H, Brandal LT, et al. (2011) Comparison of multilocus variable-number tandem-repeat analysis and multilocus sequence typing for differentiation of hemolytic-uremic syndrome-associated *Escherichia coli* (HUSEC) collection strains. *J Clin Microbiol* 49: 3644–3646.
69. Bielaszewska M, Middendorf B, Tarr PI, Zhang W, Prager R, et al. (2011) Chromosomal instability in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: impact on adherence, tellurite resistance and colony phenotype. *Mol Microbiol* 79: 1024–1044.
70. Eklund M, Scheutz F, Siitonen A (2001) Clinical isolates of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. *J Clin Microbiol* 39: 2829–2834.
71. Buvens G, Gheldre Y, Dediste A, Moreau AI, Mascart G, et al. (2011) Incidence and virulence determinants of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections in the Brussels-capital region, Belgium, in 2008–2010. *J Clin Microbiol* 50: 1336–1345.
72. Folster JP, Pecic G, Taylor E, Whichard J (2011) Characterization of isolates from an outbreak of multidrug-resistant, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145 in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 5955–5956.
73. Buvens G, Bogaerts P, Glupczynski Y, Lauwers S, Piérard D (2010) Antimicrobial resistance testing of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* and first description of TEM-52 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in serogroup O26. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 4907–4909.
74. Bielaszewska M, Idelevich EA, Zhang W, Bauwens A, Schaumburg F, et al. (2012) Effects of antibiotics on Shiga toxin 2 production and bacteriophage induction by epidemic *Escherichia coli* O104:H4 strain. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 3277–3282.
75. van der Donk CF, van de Bovenkamp JH, De Brauer EI, De Mol P, Feldhoff KH, et al. (2012) Antimicrobial resistance and spread of multi drug resistant *Escherichia coli* isolates collected from nine urology services in the Euregion Meuse-Rhine. *PLoS One* 7(10): e47707.
76. Hrabák J, Empel J, Bergerová T, Fajfřík K, Urbášková P, et al. (2009) International clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* with extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in a Czech hospital. *J Clin Microbiol* 47: 3353–3357.
77. Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, Trecarichi EM, Posteraro B, et al. (2007) Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 1987–1994.
78. Alexa P, Konstantinova L, Zajacova-Sramkova Z (2011) Faecal shedding of verotoxigenic *Escherichia coli* in cattle in the Czech Republic. *Veterinarni Medicina* 56: 149–155.
79. Čížek A, Dolejšká M, Novotná R, Haas D, Vyskočil M (2007) Survey of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and drug-resistant coliform bacteria from in-line milk filters on dairy farms in the Czech Republic. *J Appl Microbiol* 104: 852–860.
80. Bielaszewska M, Janda J, Bláhová K, Mínařiková H, Jilková E, et al. (1997) Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with consumption of unpasteurised goats milk. *Epidemiol Infect* 119: 299–305.
81. Bielaszewska M, Schmidt H, Liesegang A, Prager R, Rabsch W, et al. (2000) Cattle can be a reservoir of sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H- strains and a source of human diseases. *J Clin Microbiol* 38: 3470–3473.

*EPIDEMIOLOGIE, MIKROBIOLOGIE, IMUNOLOGIE 2014; 63(3):*

*v tisku*

## Enterohemoragické *Escherichia coli* jako původci průjmu v České republice, 1965–2013

Marejková M.<sup>1,2</sup>, Petráš P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Státní zdravotní ústav Praha, Národní referenční laboratoř pro *E. coli* a shigely

<sup>2</sup> Univerzita Karlova Praha, 3. Lékařská fakulta

### SOUHRN

**Cíl práce:** Enterohemoragické *Escherichia coli* (EHEC) jsou celosvětovými původci průjmu, krvavého průjmu a hemolyticko-uremického syndromu (HUS). Zatímco role EHEC v etiologii HUS v České republice byla popsána v nedávné publikaci, výskyt, vlastnosti a epidemiologie EHEC vyvolávajících průjmová onemocnění nejsou dostatečně známé. V této studii jsme proto analyzovali sérotypy, *stx* genotypy a faktory virulence kmenů EHEC izolovaných v letech 1965–2013 od pacientů s průjmem, krvavým průjmem a jejich rodinných kontaktů. Dále jsme charakterizovali diagnosticky důležité fenotypy kmenů EHEC, jejich citlivost k antimikrobiálním agens, sezónnost a distribuci dle krajů.

**Materiál a metody:** Kmeny od pacientů byly zaslány jako izoláty *E. coli* určené séroskupiny do NRL pro *E. coli* a shigely k průkazu Stx. V souvislosti s epidemiologickým šetřením byly zaslány do NRL vzorky humánního a nonhumánního původu. Sérotypy byly určeny konvenční a molekulární sérotypizací, *stx* genotypy a non-*stx* faktory virulence pomocí PCR, a fenotypy a antimikrobiální citlivost pomocí standardních metod. Epidemiologická souvislost izolátů od zvířete a pacienta byla potvrzena metodou pulzní gelové elektroforézy (PFGE).

**Výsledky:** Z 50 kmenů EHEC pocházelo 24 od pacientů s průjmem bez krve, 19 od pacientů s krvavým průjmem, 6 od rodinných kontaktů a 1 od epidemiologicky souvisejícího zvířete. Případy EHEC infekcí se vyskytovaly během celého roku, s vrcholem v květnu až říjnu a nejvíce ve Středočeském a Královéhradeckém kraji. Hromadný výskyt infekce EHEC byl zaznamenán ve 3 rodinách, a v 1 případě byl prokázán přenos EHEC infekce z ovce na pacienta. Kmeny EHEC patřily k 5 sérotypům, z nichž více než polovinu tvořily sorbitol-neokyselující (NSF) O157:H7/NM[*fliC*<sub>H7</sub>] a třetinu kmeny O26:H11/NM[*fliC*<sub>H11</sub>]; sérotypy O111:NM[*fliC*<sub>H8</sub>], O118:NM[*fliC*<sub>H25</sub>] a O104:H4, stejně jako sorbitol-okyselující (SF) kmeny O157:NM[*fliC*<sub>H7</sub>], byly vzácné. Z celkem 7 identifikovaných *stx* genotypů se všech 7 vyskytlo u NSF EHEC O157, 2 u EHEC O26 a O111, a 1 u EHEC O118, O104 a SF O157. Všechny až na 1 kmen produkovaly Stx. Geny kódující další faktory virulence včetně toxinů (EHEC-*hlyA*, *cdt-V*, *espP*) a adhezinů (*eae*, *efa1*, *iha*, *lpf*, *sfpA*) byly přítomny u všech kmenů a jejich spektrum bylo sérotyp-specifické. Nejčastější z nich byl *eae* kódující adhezin intimin a EHEC-*hlyA* kódující EHEC hemolyzin. Všechny kmeny EHEC kromě SF O157 obsahovaly *terE*, kódující rezistenci k teluritu. Všechny kmeny kromě NSF EHEC O157 a EHEC O118 okyselovaly sorbitol a produkovaly β-D-glukuronidázu. Většina (89,8 %) EHEC byla citlivá ke všem 12 sledovaným antimikrobiálním agens.

**Závěr:** EHEC se vyskytují jako původci průjmu a krvavého průjmu v ČR. Pouze systematický skrining těchto patogenů ve stolicích pacientů však umožní odhalit jejich skutečný podíl na etiologii průjmových onemocnění (a rovněž HUS) v ČR a zařadit tak tato data do evropského kontextu. Onemocnění vyvolaná EHEC jsou hlášena do Evropského centra pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC) v rámci surveillance Food and Waterborne Diseases.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** Enterohemoragická *Escherichia coli*, Shiga toxin, genotyp, průjem, Česká republika

## ÚVOD

Enterohemoragické *Escherichia coli* (EHEC), patogenní skupina Shiga toxin-produkujících *E. coli*, byly v průběhu posledních 30 let celosvětově identifikovány jako původci průjmu (krvavého či bez příměsí krve) a klasického (tj. diarrhea-associated, D+) hemolyticko-uremického syndromu (HUS) [2, 21]. D+ HUS, klinicky charakterizovaný mikroangiopatickou hemolytickou anémií, trombocytopenií a akutním renálním selháním, se vyvíjí jako systémová komplikace průjmů vyvolaných EHEC především u dětí. Postihuje většinou děti do 5 let a je nejčastější příčinou akutního selhání ledvin v dětském věku [34]. Jeho mortalita se uvádí mezi 3–5 %, a až 30 % pacientů má trvalé následky ve formě chronického renálního selhání, hypertenze, proteinurie či neurologického postižení [32]. Onemocnění vyvolaná EHEC začínají typicky za 3–4 dny po infekci jako vodnatý průjem, který během 1–2 dnů přechází v krvavý průjem; HUS se vyvíjí asi za týden po začátku průjmu u 10–15 % pacientů [21, 34].

Klinicky nejdůležitějším a celosvětově rozšířeným EHEC sérotypem je O157:H7, který je nejčastějším původcem sporadických onemocnění, především HUS [21, 34] a vyvolal řadu rozsáhlých epidemií [30]. Kromě toho byla od pacientů s průjmem či HUS izolována celá řada dalších, tzv. non-O157:H7 EHEC sérotypů, z nichž nejčastější jsou O26:H11/NM (nepohyblivé kmeny), O103:H2/NM, O111:H8/NM, O145:H28/NM a O157:NM (sorbitol-okyselující kmeny) [21, 22, 27, 29].

Hlavními faktory virulence EHEC jsou Shiga toxiny (Stx) též označované Verotoxiny (VT) [22, 33]. Existují 2 hlavní typy Stx, Stx1a a Stx2a, v jejichž rámci se rozlišuje několik subtypů (Stx1c, Stx1d, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f a Stx2g) [33]. U kmenů vyvolávajících lidská onemocnění se vyskytují nejčastěji Stx1a, Stx2a, Stx1c, Stx2b, Stx2c, a Stx2d [16, 27, 33, 38]. Stx, produkované EHEC kolonizujícími tlusté střevo, jsou absorbovány do krevního oběhu a transportovány do mikrovaskulatury ledvin, střeva a centrálního nervového systému, kde působí poškození endotelu [2, 21]. Kromě toho může Stx působit i přímé poškození střevních epitelových buněk [9]. EHEC produkují i řadu dalších toxinů, které mohou hrát roli v patogenezi onemocnění, jako jsou EHEC hemolysin (EHEC-Hly), cytoletální distendující toxin (CDT-V), cytotoxin subtiláza a serin proteáza EspP [6, 17, 21]. Střevní kolonizace je umožněna řadou fimbriálních a nefimbriálních adhezínů, z nichž nejlépe prostudovaným je intimin kódovaný *eae* genem. Další adheziny EHEC jsou Efa1 (EHEC factor for adherence), Saa (Stx-producing *E. coli* autoagglutinating adhesin), LPF (long polar fimbriae), Iha (iron-regulated gene A homologue adhesin) a Sfp fimbriae [36].

Nejdůležitějším rezervoárem EHEC je hovězí dobytek [1, 2, 13, 21]. Dále byly EHEC izolovány od ovcí, koz, koní, psů, prasat, drůbeže, vysoké zvěře, lišek, hlodavců a ptáků [2, 21]. Klasickým způsobem přenosu EHEC na člověka je konzumace kontaminovaných a tepelně nedostatečně opracovaných potravin živočišného původu, jako jsou nepropečené hamburgery nebo nepasterizované mléko či výrobky z něj [21, 30]. Stále častěji se vyskytují lidská onemocnění i po požití potravin rostlinného původu, zejména kontaminované syrové zeleniny jako např. hlávkového salátu, špenátu, výhonků (ředkviček, vřesky, pískavice řecké seno) a ovoce resp. ovocných produktů (meloun, jahody, nepasterizovaný jablečný džus) [2, 8, 21, 30]. Význam přenosu kontaminovanými klíčky byl dokumentován v zatím nejzávažnější epidemii EHEC [8], vyvolané v roce 2011 *E. coli* O104:H4, která je hybridem EHEC (produkce Stx2) a enteroagregativní *E. coli* (agregativní adherence ke střevnímu epitelu) [5]. Tato epidemie postihla přes 4000 osob v 16 zemích Evropy a USA [12] a jejími typickými rysy byla vysoká frekvence progresu do HUS (~22 %), častý výskyt neurologických komplikací a výrazná převaha žen (především mladšího a středního věku) [12, 19]. Kromě potravin, i kontaminovaná pitná voda a koupání ve vodních zdrojích kontaminovaných zvířecím trusem vedly ke vzniku epidemií a sporadických infekcí [21, 30]. Vzhledem k nízké infekční dávce EHEC (< 50 bakterií) [2] je důležitým způsobem šíření též fekálně-orální přenos z člověka na člověka nebo ze zvířat na člověka [2, 21, 30].

V České republice (ČR) byly EHEC identifikovány jako původci průjmů a HUS již od konce 80. let [3, 7, 23, 24, 25]. Zatímco aktuální data o EHEC jako původcích HUS byla Národní referenční

laboratoří (NRL) pro *E. coli* a shigely publikována v roce 2013 [27], novější informace o úloze EHEC v etiologii průjmů v ČR, vlastnostech těchto patogenů a epidemiologii EHEC infekcí chybí. V této studii jsme proto zjišťovali sérotypy, genotypové a fenotypové vlastnosti kmenů EHEC izolovaných od pacientů s průjmem a rodinných kontaktů. Dále jsme retrospektivně vyšetřili na produkci Stx izoláty *E. coli* od pacientů s průjmem zaslaných do NRL v předchozích letech (počínaje rokem 1965) a charakterizovali genotypy a fenotypy Stx-pozitivních kmenů. Všechny kmeny byly též testovány na citlivost k antibiotikům. Kromě lidských izolátů byl vyšetřen i epidemiologicky související kmen EHEC izolovaný od zvířete.

## MATERIÁL A METODY

### Definice onemocnění, pacienti a bakteriální kmeny

Průjem byl definován jako  $\geq 3$  řídké stolice za den a krvavý průjem jako průjem s viditelnou příměsí krve ve stolici. Z celkem 50 kmenů EHEC analyzovaných v této studii bylo 49 izolováno od pacientů s průjmem ( $n = 43$ ) a rodinných kontaktů ( $n = 6$ ) v letech 1965–2013 a 1 kmen pocházel od ovce, která byla identifikována jako zdroj infekce EHEC. Charakteristiky pacientů a kontaktů jsou uvedeny v tabulce 1.

Čtyřicet dva kmenů EHEC, izolovaných ze stolic pacientů v 20 klinických mikrobiologických laboratořích, bylo zasláno jako izoláty *E. coli* určené séroskupiny do NRL k průkazu Stx. U všech s výjimkou 1 kmene (*E. coli* O145, u kterého byla v NRL zjištěna séroskupina O118), byla identifikovaná séroskupina v NRL potvrzena. U těchto 42 případů se jednalo o tuzemskou infekci. Jeden další kmen byl izolován v NRL ze stolice pacientky, která přicestovala do ČR z Německa, kde se nakazila epidemickým kmenem O104:H4 [28].

**Tabulka 1. Charakteristiky 43 pacientů a 6 rodinných kontaktů s diagnostikovanou infekcí EHEC**

		Počet případů	
		Pacienti ( $n = 43$ )	Rodinné kontakty ( $n = 6$ )
Věk v rocích (medián; rozsah)		(2; 0-62)	(25; 5-62)
Pohlaví	M	26	1
	Ž	17	5
Diagnóza <sup>a</sup>	P	24	2
	KP	19	0
	A	0	4
Hospitalizováno		18	1

**legenda:**

<sup>a</sup> P, průjem bez příměsí krve; KP, průjem s viditelnou příměsí krve; A, asymptomatický průběh.

V souvislosti s epidemiologickým šetřením bylo z Krajských hygienických stanic a Zdravotních ústavů v letech 2006-2013 do NRL zasláno 68 vzorků humánního i nonhumánního původu. Z toho 33 pocházelo od rodinných kontaktů (27 stolic, 5 rektálních výtěrů a 1 izolát *E. coli* O157). Dále bylo zasláno 12 vzorků feces od zvířat (6 ovcí, 5 koní a 1 pes); 1 vzorek vody; 13 izolátů *E. coli* z vody a 9 izolátů z písku na dětském hřišti bez určené séroskupiny.

### Detekce EHEC ve vzorcích humánního a nonhumánního původu

Detekce EHEC ve stolicích osob a zvířat vyšetřených v NRL a následná izolace kmenů EHEC byla provedena pomocí metod popsanych v naší předchozí studii [27]. Tyto zahrnovaly pomožení v Hajna bujonu (Conda, Španělsko) s novobiocinem (Oxoid, Velká Británie) s následnou



imunomagnetickou separací pomocí Dynabeads EPEC/VTEC O157, O26 a O111 (Invitrogen, Norsko) a izolací kmenů na sorbitol MacConkey agaru (SMAC) (Oxoid, Velká Británie), cefixim-teluritovém SMAC (CT-SMAC) (Oxoid) a enterohemolyzinovém (EHLy) agaru (Oxoid) [27]. Vzorek vody o objemu 5 litrů byl přefiltrován membránovým filtrem (velikost pórů 0.45 μm) a filtr byl dále zpracován stejným způsobem jako stolice.

Kmeny byly potvrzeny jako *E. coli* biochemicky (API 20E; bioMérieux, Francie) a pomocí MALDI-TOF analýzy (Microflex LT, Bruker Daltonics, Německo). Výsledky biochemických testů byly odečítány za 24 hodin. Pohyblivost byla zjišťována zkumavkovou metodou a sledována po dobu 10 dnů.

### Sérotypizace EHEC izolátů

Fenotypový průkaz somatického (O) a bičíkového (H) antigenu byl prováděn sklíčkovou aglutinací s komerčními antiséry (Denka Seiken, Japonsko; Sifin, Německo; SSI, Dánsko). Přítomnost O antigenů detekovaných konvenční sérotypizací (O26, O111, O157, O118) byla ověřena pomocí PCR [26, 27]. *fliC* geny kódující hlavní podjednotku H antigenu byly subtypovány metodou RFLP (restriction fragment length polymorphism) pomocí endonukleázy *HhaI* (New England Biolabs, USA), jak bylo popsáno v naší předchozí studii [27]. Kmeny *E. coli*, použité jako kontroly v molekulární typizaci O a H antigenů, pocházely z České národní sbírky typových kultur (CNCTC) SZÚ, Praha.

### stx genotypizace a průkaz genů kódujících faktory virulence

Všechny kmeny byly testovány na přítomnost *stx*<sub>1a</sub> a *stx*<sub>2a</sub> genů a jejich subtypů (*stx*<sub>1c</sub>, *stx*<sub>2b</sub>, *stx*<sub>2c</sub>, *stx*<sub>2d</sub>, *stx*<sub>2e</sub>, *stx*<sub>2f</sub>) pomocí publikovaných protokolů založených na PCR (cyklyer MyCycler Thermal Cycler, Bio-Rad, USA) nebo PCR-RFLP [16, 33]. K průkazu genů kódujících další EHEC toxiny (*cdt-V*, EHEC-*hlyA*), serin proteázu EspP (*espP*), adheziny (*eae*, *efal*, *lpfA*<sub>O26</sub>, *lpfA*<sub>O157O1-141</sub>, *lpfA*<sub>O157O1-154</sub>, *iha*, *sfpA*), sekreční systém typu II (*etpD*), rezistenci k teluritu (*terE*), produkci ureázy (*ureD*) a příjem železa (*irp2*, *fyuA*) byly užity PCR protokoly popsané v předchozích publikacích [7, 20, 27, 38]. Subtypizace *eae* a *espP* byla provedena jako v naší předchozí studii [27].

### Fenotypizace

Schopnost kmenů okyselovat sorbitol byla testována na médiu SMAC a rezistence k teluritu na CT-SMAC. Okyselení sorbitolu bylo ověřeno pomocí API 20E testu, který byl též použit k průkazu okyselení ramnózy, produkce lyzin dekarboxylázy a ureázy. Produkce β-D-glukuronidázy byla detekována pomocí COLItestu (Erba Lachema, ČR). Produkce EHEC-Hly byla testována na EHLy agaru a schopnost hemolýzy na běžném krevním agaru Columbia (Oxoid) po inkubaci přes noc. Produkce Stx1a a Stx2a byla detekována reverzní pasivní aglutinací s latexovými částicemi senzibilizovanými anti-Stx1a nebo anti-Stx2a protilátkou pomocí kitu VTEC-RPLA Seiken (Denka Seiken). Biologická aktivita Stx byla ověřena testem cytotoxicity na buněčné kultuře Vero [22].

### Citlivost k antibiotikům

Citlivost k ampicilinu, cefotaximu, ceftazidimu, gentamicinu, trimethoprim/sulfamethoxazolu, ciprofloxacinu, amikacinu, meropenemu, piperacilin/tazobactamu, tigecyclinu, chloramfenikolu a nitrofurantoinu (disky Oxoid) byla testována pomocí diskové difuzní metody s použitím standardních postupů [15].

### Pulzní gelová elektroforéza (PFGE)

PFGE bakteriální DNA štěpené makrorestrikčním enzymem *XbaI* (Promega, USA) byla provedena podle protokolu PulseNet [31]. Pulzní profily byly vyhodnoceny pomocí softwaru BioNumerics (verze 5.1)

## VÝSLEDKY

### Sérotypy a *fliC* genotypy kmenů EHEC

Čtyřicet devět kmenů EHEC izolovaných od pacientů s průjmem a jejich kontaktů patřilo k 5 sérotypům. Více než polovinu (55,1 %) tvořily NSF EHEC O157:H7/NM a téměř jednu třetinu (32,7

%) EHEC O26:H11/NM. Kmeny dalších 3 sérotypů a SF EHEC O157:NM se vyskytovaly vzácně (Tab. 2). U všech kmenů byla přítomnost určeného O antigenu ověřena pomocí PCR. Ze 49 kmenů bylo 31 (63,3 %) nepohyblivých (Tab. 3). *fliC*-RFLP analýza prokázala, že v séroskupinách O157 a O26 sdílely pohyblivé i nepohyblivé kmeny vždy stejný *fliC* gen (*fliC* kódující H7 u O157 a *fliC* kódující H11 u O26). Nepohyblivé kmeny séroskupiny O111 obsahovaly *fliC* kódující H8 a kmen O118:NM *fliC* kódující H25 (Tab. 2; Obr.1). Vzhledem k tomu, že každá z identifikovaných O séroskupin obsahovala vždy pouze jeden H antigenní typ, budeme dále používat pouze označení O skupin.

**Tabulka 2. Sérotypy a geny kódující faktory virulence u 49 kmenů EHEC izolovaných od pacientů s průjmem, krvavým průjmem a jejich kontaktů v ČR**

Gen kódující faktor virulence	Sérotyp (počet kmenů)					
	O157:H7/NM	O157:NM	O26:H11/NM	O111:NM	O118:NM	O104:H4
	(NSF)	(SF)				
	<i>fliC</i> <sub>H7</sub>	<i>fliC</i> <sub>H7</sub>	<i>fliC</i> <sub>H11</sub>	<i>fliC</i> <sub>H8</sub>	<i>fliC</i> <sub>H25</sub>	<i>fliC</i> <sub>H4</sub>
	(n = 27)	(n = 1)	(n = 16)	(n = 3)	(n = 1)	(n = 1)
<i>stx</i> <sub>1a</sub>	+ (2) <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	+ (10)	+ (1)	-	-
<i>stx</i> <sub>2a</sub>	+ (1)	+	+ (6)	-	-	+
<i>stx</i> <sub>2c</sub>	+ (3)	-	-	-	-	-
<i>stx</i> <sub>1a</sub> + <i>stx</i> <sub>2a</sub>	+ (3)	-	-	+ (2)	-	-
<i>stx</i> <sub>1a</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub>	+ (12)	-	-	-	-	-
<i>stx</i> <sub>2a</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub>	+ (1)	-	-	-	+	-
<i>stx</i> <sub>1a</sub> + <i>stx</i> <sub>2a</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub>	+ (5)	-	-	-	-	-
EHEC- <i>hlyA</i>	+	-	+ (13)	+	+	-
<i>cdt-V</i>	+ (2)	+	-	-	-	-
<i>espP</i> <sup>b</sup>	+ (α)	-	+ (α) (12)	-	+ (α)	-
<i>etpD</i>	+	-	+ (1)	-	-	-
<i>eae</i> <sup>c</sup>	+ (γ)	+ (γ)	+ (β)	+ (θ)	+ (β)	-
<i>efa1</i>	+	+	+	+	-	-
<i>iha</i>	+	-	+	+	+	+
<i>sfpA</i>	-	+	-	-	-	-
<i>lpfA</i> <sub>O26</sub>	-	-	+	+	-	-
<i>lpfA</i> <sub>O157/O1-141</sub>	+	+	-	-	-	-
<i>lpfA</i> <sub>O157/O1-154</sub>	+	+	-	-	-	-
<i>terE</i>	+	-	+ (14)	+	+	+
<i>ureD</i>	+	-	+ (14)	+	+	-
<i>irp2</i>	-	-	+	-	-	+
<i>fyuA</i>	-	-	+	-	-	+

**legenda:**

<sup>a</sup> +, gen byl přítomen (pokud gen nebyl přítomen u všech kmenů, číslo v závorce udává počet pozitivních kmenů);

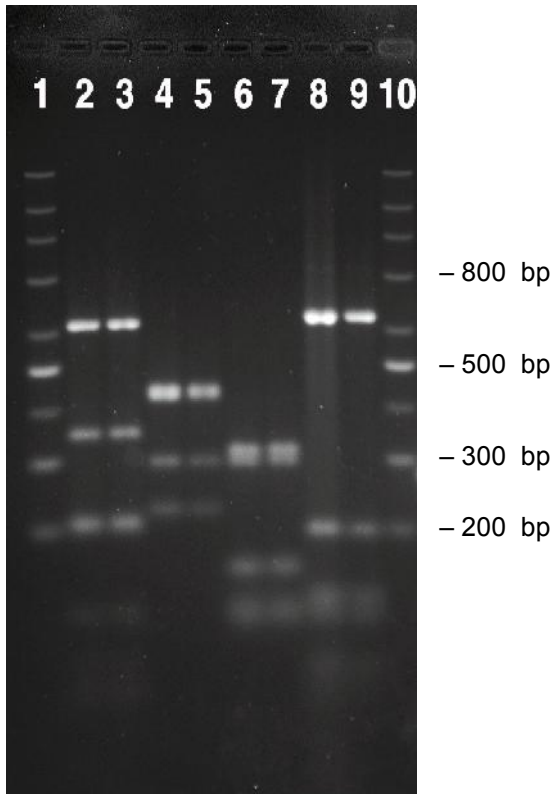
-, gen nebyl přítomen.

<sup>b</sup> *espP* subtypy jsou uvedeny v závorce.

<sup>c</sup> *eae* subtypy jsou uvedeny v závorce.

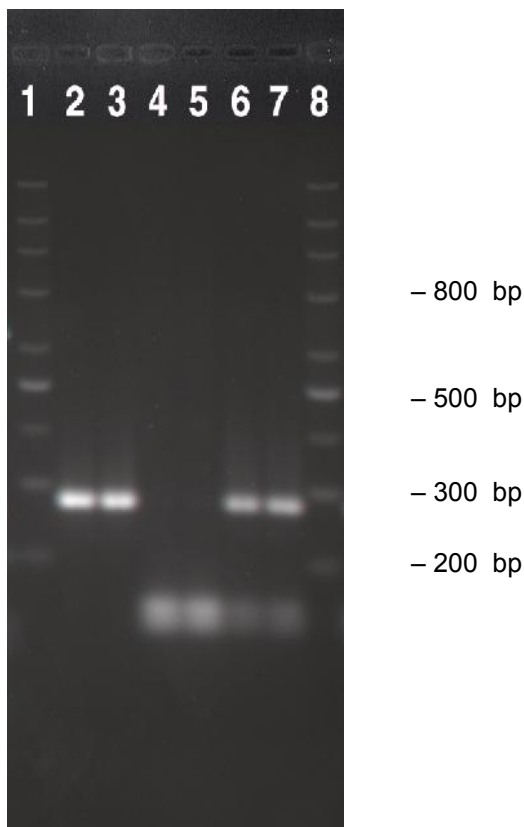
**Geny kódující faktory virulence EHEC**

Čtyřicet devět EHEC izolátů patřilo celkem k 7 *stx* genotypům. Všech 7 genotypů bylo identifikováno u NSF EHEC O157, a 2 různé *stx* genotypy u EHEC O26 a O111. SF EHEC O157 a EHEC O104 obsahovaly pouze *stx*<sub>2a</sub> a EHEC O118 *stx*<sub>2a</sub>+*stx*<sub>2c</sub> (Tab. 2; Obr. 2).



**Obr. 1. Srovnání *HhaI fliC*-RFLP profilů nepohyblivých (NM) kmenů EHEC séroskupin identifikovaných v této studii s kontrolními kmeny odpovídajícího H antigenu**

V drahách 2-9 jsou *fliC*-RFLP profily těchto kmenů: 2, O157:NM [*fliC*<sub>H7</sub>]; 3, U 5/41 (*E.coli* O1:K1:H7); 4, O26:NM [*fliC*<sub>H11</sub>]; 5, Su 4321/41 (*E.coli* O13:11L:H11); 6, O111:NM [*fliC*<sub>H8</sub>]; 7, Ap. 320c (*E.coli* O2:-:H8); 8, O118:NM [*fliC*<sub>H25</sub>]; 9, N 234 (*E.coli* O13:-:H25). Dráhy 1 a 10 obsahují marker (DNA marker 200-1500; Top-Bio, Česká republika).



**Obr. 2. Příklady subtypizace *stx*<sub>2a</sub> a *stx*<sub>2c</sub> pomocí RFLP s použitím restriční endonukleázy *HaeIII* u studovaných kmenů EHEC**

V drahách 2-7 jsou *stx*-RFLP profily těchto kmenů: 2, SF O157:NM (*stx*<sub>2a</sub>); 3, O104:H4 (*stx*<sub>2a</sub>); 4, NSF O157:H7 (*stx*<sub>2c</sub>); 5, NSF O157:NM (*stx*<sub>2c</sub>); 6, NSF O157: NM (*stx*<sub>2a</sub>+*stx*<sub>2c</sub>); 7, O118:NM (*stx*<sub>2a</sub>+*stx*<sub>2c</sub>). Dráhy 1 a 8

Všechny EHEC NSF O157, O111 a O118 a většina (81,3 %) EHEC O26 obsahovala gen kódující EHEC-Hly, který nebyl přítomen u SF EHEC O157 a EHEC O104. *cdt-V* kódující CDT-V byl nalezen u 2 NSF a u SF O157 kmene. Všechny NSF EHEC O157, 75 % EHEC O26 a EHEC O118 obsahovaly gen kódující EspP $\alpha$ , silně proteolytickou formu serin proteázy EspP. *etpD*, kódující sekreční systém typu II u *E. coli*, byl přítomen u všech NSF EHEC O157 a u 1 ze 16 EHEC O26. Tento *etpD*-pozitivní EHEC O26 též obsahoval EHEC-*hlyA*, ale nikoliv *espP* a *katP* (gen kódující katalázu-peroxidázu) [Marejková, nepublikovaná data], a patřil tak na základě této typické kombinace plazmidových genů k novému, vysoce virulentnímu klonu EHEC O26, který je rozšířen jako původce HUS v Evropě [4] včetně České republiky [27, 29, 39] (Tab. 2).

Všechny kmeny EHEC, kromě O104, obsahovaly *eae* gen kódující intimin; subtyp *eae* byl sérotyp-specifický. Všechny *eae*-pozitivní kmeny, s výjimkou O118, též obsahovaly gen kódující adhezín Efa1. Gen *iha*, kódující adhezín Iha, byl přítomen u všech kmenů kromě SF O157, který naopak jako jediný obsahoval *sfpA* kódující Sfp fimbrie. Geny kódující různé typy LPF byly nalezeny pouze u kmenů určitých sérotypů. Všechny kmeny, s výjimkou SF O157 a dvou EHEC O26, obsahovaly *terE* gen, kódující rezistenci k teluritu. Všechny *terE*-pozitivní kmeny, kromě O104, obsahovaly *ureD* gen kódující produkci ureázy. Geny *irp2* a *fyuA*, které jsou součástí systému kódujícího příjem železa [20], byly nalezeny pouze u EHEC O26 a O104 (Tab. 2).

**Tabulka 3. Diagnosticky důležité fenotypy kmenů EHEC izolovaných od 49 pacientů s průjmem, krvavým průjmem a jejich kontaktů v ČR**

Fenotyp <sup>a</sup>	Sérotyp (počet kmenů)					
	O157:H7/NM (NSF)	O157:NM (SF)	O26:H11/NM	O111:NM	O118:NM	O104:H4
	<i>fliC<sub>H7</sub></i> (n = 27)	<i>fliC<sub>H7</sub></i> (n = 1)	<i>fliC<sub>H11</sub></i> (n = 16)	<i>fliC<sub>H8</sub></i> (n = 3)	<i>fliC<sub>H25</sub></i> (n = 1)	<i>fliC<sub>H4</sub></i> (n = 1)
Stx titr (Vero) <sup>a</sup>	64-512	128	16-256	128-512	128	1-64
Stx1a <sup>b</sup>	+ <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	+	+	-	-
Stx2a/2c <sup>b</sup>	+ (4) <sup>d</sup>	+	+	-	+	+
Stx1a+Stx2a/2c <sup>b</sup>	+	-	-	+	-	-
EHEC-Hly	+ (23)	-	+ (13)	+	nh. <sup>e</sup>	-
Hemolýza (KA) <sup>c</sup>	-	-	-	-	+	-
CT-SMAC	+	-	+	+	+	+
Ureáza	-	-	-	-	-	-
SMAC	-	+	+	+	-	+
Sorbitol (API20E)	-	+	+	+	-	+
Ramnóza	+ (18)	-	-	+	+	+
Lyzin dekarboxyláza	+	+	+	-	+	+
$\beta$ -D- glukuronidáza	-	+	+	+	-	+
Pohyblivost	+ (8)	-	+ (9)	-	-	+

**legenda:**

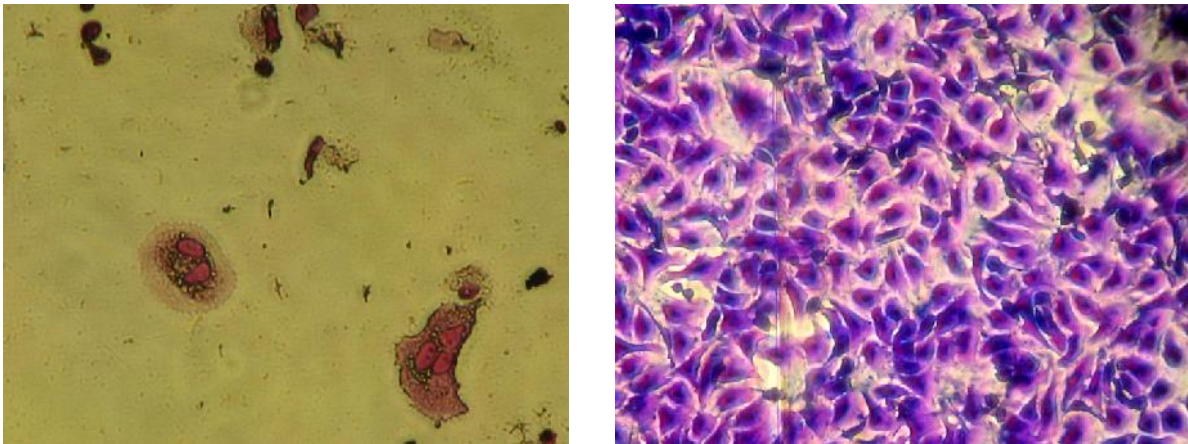
<sup>a</sup> Nejvyšší ředění supernatantu, které vyvolalo po 3 dnech cytotoxický efekt u 50 % Vero buněk.

<sup>b</sup> Produkce Stx s použitím VTEC-RPLA kitu;

<sup>c</sup> KA, běžný krevní agar Columbia

<sup>d</sup> +, fenotyp prokázán (číslo v závorce udává počet pozitivních kmenů v případě, že fenotyp nebyl přítomen u všech kmenů); -, fenotyp neprokázán

<sup>e</sup> nh., nehodnotitelné

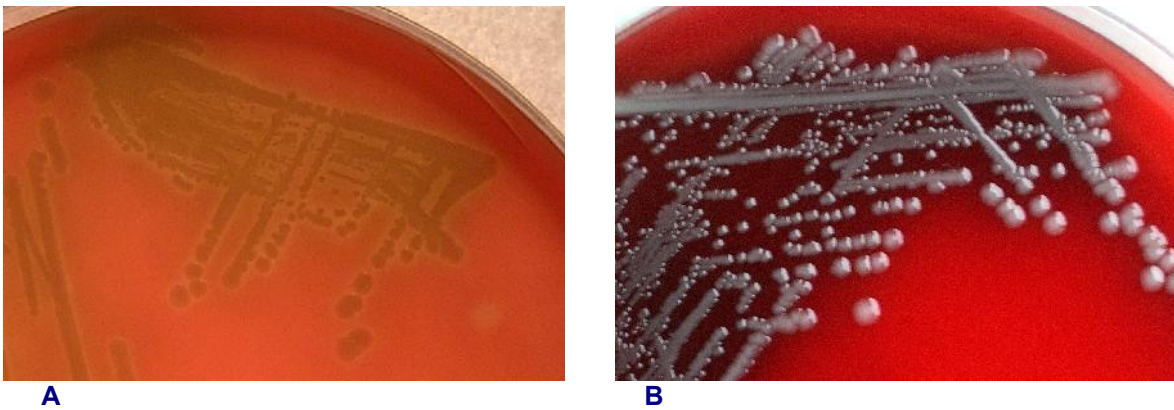


A

B

**Obr. 3. Cytotoxický účinek Stx na buňky linie Vero**

A. Kultura Vero buněk po 3 dnech inkubace se supernatantem kmene EHEC (> 90 % cytotoxicita). B. Kontrolní buňky kultivované po stejnou dobu v buněčném mediu. Buňky jsou barveny 0,1% krystalovou violetí. Zvětšení = 50 x



A

B

**Obr. 4. EHEC-Hly fenotyp kmene EHEC na EHLy agaru (A) ve srovnání s absencí hemolýzy u stejného kmene na běžném krevním agaru (B)**

#### Diagnosticky důležité fenotypy EHEC

Čtyřicet osm ze 49 EHEC izolátů produkovalo Stx, který vyvolal cytotoxický efekt na kultuře Vero buněk (Tab. 3, Obr. 3). U 1 kmene (NSF O157 od pacienta s nekrvavým průjmem) nebyl *stx<sub>2a</sub>* gen exprimován. Produkce Stx1a a Stx2a byla ověřena metodou RPLA, kterou byl rovněž detekován i Stx2c. EHEC-Hly byl produkován všemi kmeny, které obsahovaly gen EHEC-*hlyA* s výjimkou 4 NSF EHEC O157. Kmeny produkující EHEC-Hly vyvolaly po inkubaci přes noc úzkou zónu neúplné hemolýzy na EHLy agaru, ale netvořily hemolýzu na běžném krevním agaru (Obr. 4). Na krevním agaru hemolyzoval pouze jediný kmen, EHEC O118, u kterého nebylo možné rozlišit, zda hemolýza pozorovaná na EHLy agaru byla způsobena EHEC-Hly nebo hemolyzinem hemolyzujícím na krevním agaru. Všechny *terE*-pozitivní kmeny rostly na mediu CT-SMAC, ale žádný z *ureD*-pozitivních kmenů neprodukoval ureázu. Kmeny všech séroskupin, kromě NSF O157 a O118, produkovaly  $\beta$ -D-glukuronidázu a tato vlastnost korelovala se schopností okyselovat sorbitol. Kmeny séroskupin O26, SF O157 a třetina NSF O157 kmenů neokyselovaly ramnózu. Všechny EHEC kromě O111 produkovaly lyzin dekarboxylázu (Tab. 3)

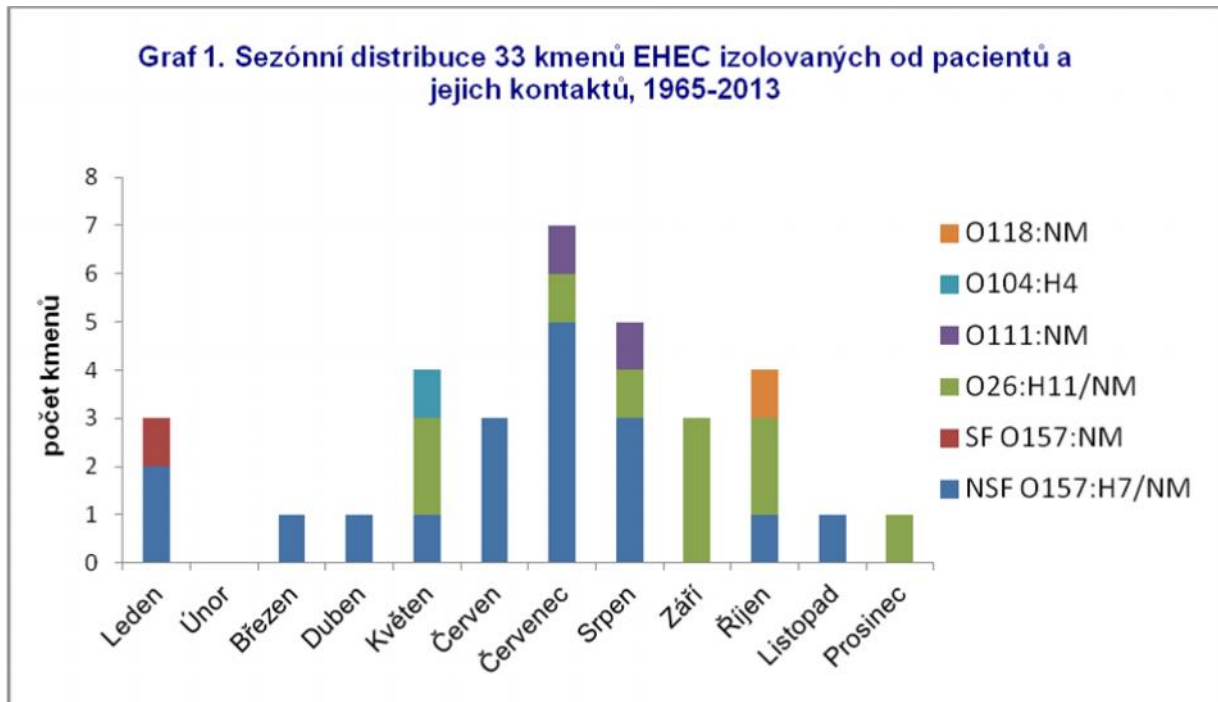
#### Citlivost EHEC izolátů k antibiotikům

Všechny EHEC O157 (NSF i SF), O118, O111 a 12 ze 16 EHEC O26 byly citlivé ke všem 12 testovaným antimikrobiálním agens. Zbylé 4 EHEC O26 byly rezistentní k ampicilinu a 1 z nich též k chloramfenikolu. Kmen O104 produkoval shodně s německým epidemickým kmenem [5],

širokospektrou  $\beta$ -laktamázu (byl rezistentní k ampicilinu, cefotaximu, ceftazidimu, piperacilin/tazobaktamu a citlivý k meropenemu) a byl též rezistentní k trimetoprim-sulfometoxazolu.

### Sezónnost a distribuce EHEC dle krajů

Průjmová onemocnění vyvolaná EHEC se vyskytovala v průběhu celého roku s nejvyšším záchytem v květnu až říjnu. I když kmeny některých sérotypů byly izolovány pouze v létě (O111) nebo pouze v zimě (SF O157), tyto výsledky mohou být zkreslené malým počtem izolátů. Sezónnost nebyla pozorována u NSF EHEC O157, které tvořily více než polovinu takto analyzovaných kmenů a u EHEC O26 (Graf 1).



#### Legenda:

Sezónnost byla vypočtena z data prvních příznaků. Starší případy, u kterých tato informace nebyla dohledána, a asymptomatické rodinné kontakty zařazeny nejsou



### Kartogram 1A. Distribuce 38 kmenů EHEC izolovaných od pacientů s průjmem, krvavým průjmem a rodinných kontaktů dle krajů, 1965-2013

#### Legenda:

Starší případy, u kterých informace o bydlišti pacientů nebyla dohledána, zařazeny nejsou.

Nejvíce případů bylo zaznamenáno ve Středočeském a Královéhradeckém kraji, a dále v kraji v Libereckém, Moravskoslezském a v Praze (Kartogram 1A). Pro srovnání uvádíme distribuci kmenů EHEC, včetně případů HUS, za období 1965-2013 (Kartogram 1B).

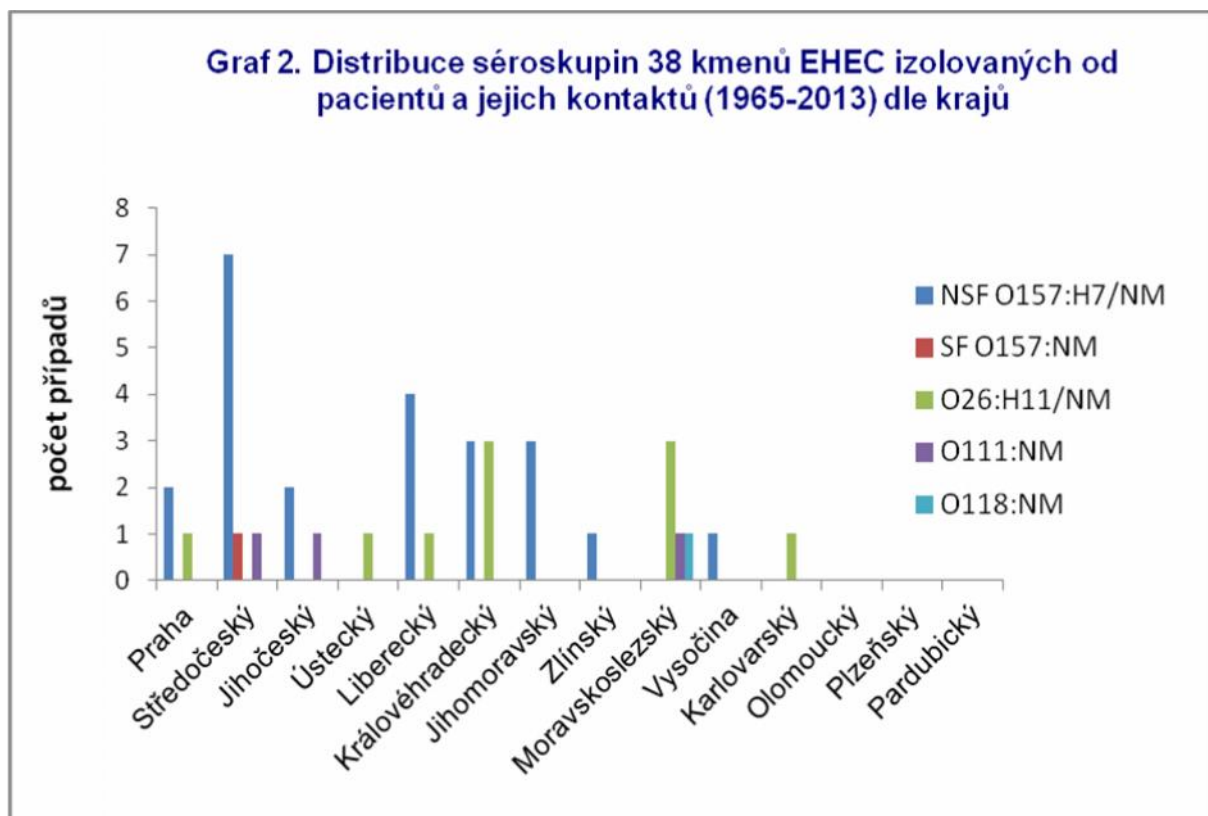


**Kartogram 1B. Distribuce 75 kmenů EHEC izolovaných od pacientů s průjemem, krvavým průjemem a HUS včetně rodinných kontaktů dle krajů, 1965-2013**

**Legenda:**

Vlastnosti kmenů EHEC izolovaných od pacientů s HUS byly publikovány v předchozí studii [27], avšak bez dokumentace jejich krajové distribuce. Starší případy, u kterých informace o bydlišti pacientů nebyla dohledána, zařazeny nejsou

Vlastnosti kmenů EHEC izolovaných od pacientů s HUS byly publikovány v předchozí studii [27], avšak bez dokumentace rozdělení případů podle krajů. Z grafu distribuce séro skupin EHEC lze konstatovat, že pouze séro skupina O157 se vyskytovala ve většině krajů; EHEC O26 byly zaslány ze 6 ze 14 krajů a ostatní séro skupiny se vyskytovaly ojediněle v různých krajích (Graf 2).



**Rodinné výskyty EHEC**

Od roku 2006 jsme v NRL pro *E. coli* a shigely sledovali nosičství EHEC v rodinách pacientů. V letech 2006–2013 NRL identifikovala 26 kmenů EHEC izolovaných od pacientů s průjmem nebo krvavým průjmem a u 9 z těchto 26 případů byly provedeny odběry stolic rodinných kontaktů (celkem 33 osob). Rodinný výskyt EHEC byl prokázán ve 3 případech. V těchto 3 rodinách byla přítomnost kmene EHEC stejného sérotypu, *stx* genotypu a virulenčního profilu, jaký byl izolován od pacienta, prokázána též u sourozenců, rodičů nebo prarodičů. Z toho dvě osoby měly průjem bez příměsí krve a u čtyř se jednalo o bezpříznakové nosičství. U 2 kontaktů s průjmem onemocnění začalo za 9 a 11 dnů po začátku onemocnění u primárního případu, což svědčí spíše pro mezilidský přenos infekce v rodinách než pro společný zdroj infekce (Tab. 4). Epidemiologická souvislost izolátů v jednotlivých rodinných výskytech byla potvrzena metodou PFGE (data nejsou prezentována).

**Tabulka 4. Případy rodinných výskytů infekce EHEC identifikované v letech 2006-2013**

Výskyt č.	Rok	Lokalita (kraj) <sup>a</sup>	Sérotyp	<i>stx</i> /Stx genotyp/fenotyp	Primární případ/Kontakt				
					Pohlaví	Věk	Diagnóza <sup>b</sup>	Datum odběru	Datum PP <sup>c</sup>
1	2008	Stč	O157:NM (NSF)	1a+2c	M <sup>d</sup>	2 r.	P	1.7.	29.6.
					Ž	9 r.	A	12.7.	
					Ž	15 r.	A	12.7.	
2	2012	HK	O26:NM	2a	M <sup>d</sup>	22 m.	KP	24.8	22.8.
					Ž	5 r.	P	4.9	2.9.
3	2013	Stč	O157:NM (NSF)	1a+2a+2c	M <sup>d</sup>	13 m.	P	30.4	30.4.
					Ž	35 r.	A	10.5	
					M	40 r.	A	10.5	
					Ž	62 r.	P	9.5.	8.5.

**Legenda:**

<sup>a</sup> Kraj: Stč, Středočeský; HK, Královéhradecký.

<sup>b</sup> P, průjem bez příměsí krve; A, asymptomatický průběh; KP, průjem s viditelnou příměsí krve.

<sup>c</sup> Datum prvních příznaků (průjem).

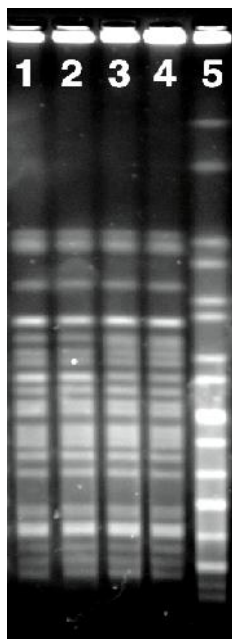
<sup>d</sup> Primární případy onemocnění („index cases“) v jednotlivých rodinách.

**Přenos EHEC infekce ze zvířat na člověka**

Z 35 vzorků nonhumánního původu, zaslaných do NRL v letech 2006-2013 v rámci epidemiologického šetření u 6 případů infekce EHEC, se v jednom případě podařilo prokázat přenos EHEC, a to z domácího zvířete na člověka v roce 2011. Kmeny NSF EHEC O157:NM byly izolovány ze stolice 13měsíčního chlapce s krvavým průjmem a jedné ze 6 ovcí, které chovali rodiče dítěte na rodinné farmě v Libereckém kraji. Tyto kmeny vykazovaly stejné *stx* genotypy, faktory virulence a fenotypy; jejich epidemiologická souvislost byla potvrzena metodou PFGE (Obr. 5). Dítě se mohlo nakazit přímým kontaktem s ovcemi, konzumací mléčných produktů nebo předměty kontaminovanými ovčím trusem.

V roce 1998 byl v ČR popsán přenos infekce SF EHEC O157:NM z krávy na dvě děti (sourozenci) [7]. Součástí studovaného souboru je kmen izolovaný od jednoho z nich, 6letého chlapce s průjmem.





**Obr. 5. PFGE kmenů NSF EHEC O157 izolovaných ze stolice dítěte s krvavým průjmem a trusu ovce z rodinné farmy**

V dráhách 1-4 jsou PFGE profily těchto kmenů: 1-2, kmen od pacienta; 3-4, kmen od ovce. Dráha 5 obsahuje referenční kmen *Salmonella* Braenderup H9812.

### Doba nosičství EHEC

Od 9 ze 49 osob s prokázanou infekcí EHEC (18,4 %; 4 “index cases“ a 5 kontaktů) byly do NRL zaslány stolice z kontrolních odběrů. S výjimkou 1 pacienta (první kontrolní odběr s negativním nálezem zaslán teprve po 21 dnech) byly první kontrolní odběry provedeny do 15 dnů od prvního odběru. V 6 případech, kde byl první kontrolní odběr pozitivní, byly do NRL zaslány i další kontrolní odběry stolic (2 - 8 u jednotlivých osob). To umožnilo určit dobu nosičství EHEC a tato se pohybovala v rozmezí od 9 do 68 dnů (medián 22 dnů) (Tab. 5). V dalších 2 případech byl první kontrolní odběr negativní.

**Tabulka 5. Doba nosičství EHEC u 6 sledovaných případů**

Případ č.	Séroskopina	Pohlaví	Věk	Diagnóza <sup>a</sup>	Doba nosičství (dny) <sup>b</sup>
1	O157	M	2 r.	P	29
2		Ž	9 r.	A	9
3		Ž	15 r.	A	32
4		M	9 m.	KP	14
5		Ž	62 r.	P	68
6	O26	M	18 m.	P	15
Medián doby nosičství:					22 dnů

#### legenda

<sup>a</sup> P, průjem bez příměsí krve; A, asymptomatický průběh; KP, průjem s viditelnou příměsí krve.

<sup>b</sup> Doba mezi prvním odběrem a posledním kontrolním odběrem s pozitivním nálezem EHEC.

Za zmínku stojí zjištění, že v případě, kde byl jako první kontrolní odběr místo vzorku stolice omylem zaslán pouze rektální výtěr, byl tento negativní, avšak vzorek stolice zaslán o 3 dny později, stejně jako další 2 vzorky stolice zasláné v rozmezí následujících 14 dnů, byly pozitivní. Toto pozorování ukazuje na důležitost zaslání vzorku celé stolice (velikosti asi 3 lískových oříšků) ne pouze rektálního výtěru, na průkaz EHEC. Důvodem je skutečnost, že množství EHEC ve stolici po začátku klinických příznaků rychle klesá [35], a proto pravděpodobnost úspěšné izolace EHEC ze vzorku celé stolice je větší, zvláště u pozdních (včetně kontrolních) odběrů.

## DISKUSE

Tato studie ukazuje, že stejně jako je tomu v jiných zemích [4, 11, 14, 21, 38], EHEC se vyskytují jako původci průjmu a krvavého průjmu i v ČR. Naše studie měla však určitá omezení vyplývající ze současného přístupu ke sledování EHEC infekcí v ČR. Mikrobiologické laboratoře zde jsou povinny dle vyhlášky 473/2008 Sb. „O systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce“ ve znění novely 275/2010 Sb. zasílat do NRL pro *E. coli* a shigely na průkaz Stx suspektní izoláty EHEC, zejména séroskupin O157, O26, O103, O111 a O145, které jsou sice nejčastější, ale zdaleka ne všechny popsané v souvislosti s výskytem průjmového onemocnění [11, 14, 21, 38]. Tato skutečnost se odráží na spektru identifikovaných séroskupin EHEC, kde 47 ze 49 lidských izolátů (95,9 %) patřilo k séroskupinám O157, O26 a O111 (Tab. 2). Jediné 2 výjimky byly kmeny séroskupin O118 a O104, které byly rozpoznány jako EHEC díky tomu, že první z nich byl zaslán do NRL jako suspektní *E. coli* O145 a druhý byl izolován od pacientky s podezřením na infekci německým epidemickým kmenem [28]. EHEC séroskupin O103 a O145 nebyly v ČR jako původci průjmu (bez progresu do HUS) identifikovány. To může být ovlivněno i tím, že testování těchto séroskupin nebylo součástí rutinní diagnostiky většiny laboratoří, a tudíž jsou tyto kmeny do NRL k průkazu Stx zasílány v nižší frekvenci než je to u O157 a O26. Skutečnost, že nejvyšší počet případů pochází ze Středočeského kraje (Kartogram 1A), může být ovlivněna lepší dostupností do NRL a navýšením počtu případů o rodinné kontakty (dva z rodinných výskytů byly ve Středočeském kraji). Dále se nabízí otázka, do jaké míry jsou mezikrajové rozdíly v četnosti případů EHEC, jak se jeví v naší studii, způsobeny nedůsledným zasíláním suspektních kmenů EHEC. V této souvislosti bychom chtěli apelovat na všechny mikrobiologické laboratoře, aby v souladu s Vyhláškou 473/2008 Sb. ve znění novely 275/2010 Sb. důsledně zasílaly do NRL k průkazu Stx všechny suspektní izoláty EHEC.

Z hlediska laboratorní diagnostiky EHEC bychom chtěli zdůraznit několik důležitých aspektů. Za prvé, molekulární sérotypizace, obzvláště *fliC*-RFLP, přináší spolehlivý a rychlý způsob, jak detekovat H antigenu zejména u nepohyblivých kmenů. Toto je zvláště důležité při epidemiologických šetřeních, kdy rychlá předběžná informace o stejných *fliC*-RFLP profilech nepohyblivých kmenů EHEC izolovaných z různých zdrojů je východiskem pro jejich další, podrobné srovnání pomocí molekulárních metod včetně PFGE. Za druhé, fenotypy EHEC, které jsou důležité z diagnostického hlediska, zahrnují: a) okyselování sorbitolu a produkci  $\beta$ -D-glukuronidázy, b) okyselování ramnózy, c) produkci EHEC-Hly a d) rezistenci k teluritu. Neschopnost „klasických“ (t.j. NSF) EHEC O157:H7/NM okyselovat sorbitol umožňuje snadnou detekci těchto kmenů na SMAC, kde rostou v bezbarvých koloniích, na rozdíl od naprosté většiny kmenů *E. coli* běžné střevní flóry, které okyselují sorbitol a rostou v růžových koloniích. Zajímavé je, že neschopnost okyselovat sorbitol jsme pozorovali i u kmene sérotypu O118:NM, který s NSF EHEC O157 sdílel též jejich druhou typickou vlastnost, tj. neschopnost produkovat  $\beta$ -D-glukuronidázu (Tab. 3). Na základě tohoto pozorování bychom chtěli zdůraznit, že sorbitol-negativní a  $\beta$ -D-glukuronidáza-negativní kmeny EHEC nelze automaticky považovat za *E. coli* O157:H7, nýbrž v každém jednotlivém případě je nutné provést určení O antigenu. Podobně jako neschopnost NSF EHEC O157 okyselovat sorbitol, byla typickým znakem všech EHEC O26 neschopnost okyselovat ramnózu (Tab. 3). Na základě této vlastnosti, pozorované i v jiných studiích, byla vyvinuta selektivně-diagnostická půda pro předběžnou detekci EHEC O26:H11 [18].

Produkce EHEC-Hly, který vyvolává neúplnou hemolýzu na EHLy agaru (agar s promytými erytrocyty a obsahem  $\text{CaCl}_2$ ), ale ne na běžném krevním agaru, je charakteristickým fenotypem nejčastějších EHEC vyvolávajících lidská onemocnění [21, 27]. Tento fenotyp se nevyskytuje u běžné střevní flóry, a proto umožňuje snadnou izolaci EHEC z primokultur stolic. Výjimku tvoří SF EHEC O157, které přesto, že EHEC-*hlyA* obvykle obsahují [27], tento gen většinou neexprimují. Na rozdíl od kmenů *E. coli*, vyvolávajících mimostřevní onemocnění, které často hemolyzují na běžném krevním agaru, je tento jev u EHEC naprosto vzácný (Tab. 3). V praxi toto znamená, že kmeny *E. coli*, které vyvolávají hemolýzu na běžném krevním agaru nejsou, až na vzácné výjimky, suspektní EHEC. Rezistence k teluritu, která se projevuje schopností růst na CT-SMAC, byla pozorována u všech kmenů EHEC s výjimkou dvou O26 a SF O157 (Tab. 3). Schopnost většiny EHEC patřících

k „top five“ sérotypům růst na CT-SMAC, kde je růst normální střevní flóry výrazně omezen, usnadňuje izolaci těchto kmenů z primokultur stolic.

Podobně jako jsme pozorovali v předchozí studii u kmenů EHEC izolovaných od pacientů s HUS [27], byla i zde naprostá většina EHEC izolátů (44 ze 49, t.j. 89,8 %) citlivá ke všem 12 testovaným antimikrobiálním agens. Tyto výsledky jsou v souladu se studiemi z jiných zemí [10, 14, 38]. Širokospektrá  $\beta$ -laktamáza, která byla zjištěna u EHEC O26 v Belgii [10], byla v našem souboru identifikována pouze u EHEC O104:H4. I přes dobrou citlivost většiny kmenů EHEC k antimikrobiálním látkám není jejich užívání k léčbě pacientů se suspektní či prokázanou infekcí EHEC doporučeno, protože zvláště některá antibiotika indukují produkci Stx a/nebo jeho uvolňování ve střevě pacientů a zvyšují tak riziko progresu do stádia HUS [37].

Za zmínku stojí zjištění dlouhodobého nosičství EHEC některými pacienty a kontakty. Vylučování EHEC O157:H7 se uvádí u nekomplikovaného průjmu průměrně 13 dnů, u HUS až 21 dnů [2]. Ve srovnání s tímto jsme v našem souboru prokázali podstatně delší dobu vylučování (od 1 do > 2 měsíců) u poloviny sledovaných osob. I když toto pozorování je omezené malým souborem, které jsme takto měli možnost sledovat, je z něj zřejmé, že dlouhodobé vylučování EHEC se vyskytuje u dětí i dospělých, a to jak u pacientů s manifestním onemocněním, tak i u osob bezpříznakových (Tab. 5). Vzhledem k velmi nízké infekční dávce EHEC [2, 21] jsou tyto nosiči závažnými potencionálními zdroji infekce pro své okolí. Prakticky to znamená nutnost důsledného sledování vylučování kmene EHEC a vyloučení osob s pozitivním nálezem z návštěvy dětských kolektivů a styku s potravinami až do vymizení patogena ze stolice.

## ZÁVĚR

EHEC se vyskytují jako původci průjmu a krvavého průjmu v ČR. Pouze systematický skrínig těchto patogenů ve stolicích pacientů však umožní odhalit jejich skutečný podíl na etiologii průjmových onemocnění (a rovněž HUS) v ČR a zařadit tak tato data do evropského kontextu. Onemocnění vyvolaná EHEC jsou hlášena do Evropského centra pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC) v rámci surveillance Food and Waterborne Diseases.

## PODĚKOVÁNÍ

Obrovské poděkování patří paní doc. Dr. Martině Bielaszewske z Ústavu Hygieny Univerzity v Münsteru za intenzivní, dlouhodobou a nezištnou pomoc NRL pro *E. coli* a shigely, za cenné rady při přípravě tohoto rukopisu a též za provedení pokusů na Vero buňkách. Prof. Dr. Dr. h.c. Helge Karchovi, řediteli Ústavu Hygieny Univerzity v Münsteru a vedoucímu německé Konziliární laboratoře pro HUS děkujeme za opakované umožnění stáže Monice Marejkové.

Autoři děkují dr. Čestmíru Benešovi a dr. Marku Malému za poskytnutí dat z EPIDATu a za zhotovení kartogramů. Dr. Jaroslavu Šaškovi děkujeme za primární zpracování vzorků vody.

Poděkování patří i všem kolegům z mikrobiologických laboratoří v celé České republice za zaslání vzorků i epidemiologům na všech úrovních a všem pracovníkům hygienické služby za epidemiologická šetření jednotlivých případů, včetně zajišťování kontaktů. V neposlední řadě děkujeme všem spolupracovníkům z CEM, především paní Miluši Vašákové, za technickou asistenci.

## LITERATURA

1. Alexa P, Konstantinova L, Zajacova-Sramkova Z. Faecal shedding of verotoxigenic *Escherichia coli* in cattle in the Czech Republic. *Veterinární Medicina*, 2011;56:149-155.
2. Ambrožová H, Marejková M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* - dangerous new pathogens. *Cas Lek Cesk*, 2012;151(11):514-518.
3. Bielaszewska M, Janda J. Mikrobiologické aspekty infekce kmene *E. coli* produkujícími verotoxin u dětí s hemolyticko-uremickým syndromem. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 1989;38:237-244.

4. Bielaszewska M, Mellmann A, Bletz S et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H- : A new virulent clone emerges in Europe. *Clin Infect Dis*, 2013;56:1373-1381.
5. Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W et al. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis*, 2011;11:671-676.
6. Bielaszewska M, Rüter C, Kunsmann L et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin employs outer membrane vesicles to target mitochondria and cause endothelial and epithelial apoptosis. *PLoS Pathog*, 2013;9(12):e1003797.
7. Bielaszewska M, Schmidt H, Liesegang A et al. Cattle can be a reservoir of sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H- strains and a source of human diseases. *J Clin Microbiol*, 2000;38(9):3470-3473.
8. Buchholz U, Bernard H, Werber D et al. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *N Engl J Med*, 2011;365(19):1763-70.
9. Bunger JC, Melton-Celsa AR, O'Brien AD. Shiga toxin type 2dct displays increased binding to globotriaosylceramide in vitro and increased lethality in mice after activation by elastase. *Toxins (Basel)*, 2013;5(11):2074-92. doi: 10.3390/toxins5112074.
10. Buvens G, Bogaerts P, Glupczynski Y et al. Antimicrobial resistance testing of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* and first description of TEM-52 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in serogroup O26. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010;54(11):4907-9.
11. Buvens G, De Gheldre Y, Dediste A et al. Incidence and virulence determinants of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections in the Brussels-Capital Region, Belgium, in 2008-2010. *J Clin Microbiol*, 2012;50:1336-45.
12. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 Infections Associated with Sprout Consumption - Europe and North America, May-July 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2013;62(50):1029-31.
13. Čížek A, Dolejšká M, Novotná R et al. Survey of Shiga toxigenic *Escherichia coli* O157 and drug-resistant coliform bacteria from in-line milk filters on dairy farms in the Czech Republic. *J Appl Microbiol*, 2007;104:852-860.
14. Eklund M, Scheutz F, Siitonen A. Clinical isolates of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. *J Clin Microbiol*, 2001;39:2829-2834.
15. EUCAST committees and subcommittees. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST SOP 4.1, 2013. Dostupný na [www: http://www.eucast.org](http://www.eucast.org).
16. Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang W et al. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis*, 2002;185:74-84.
17. Friedrich AW, Lu S, Bielaszewska M et al. Cytolethal distending toxin in *Escherichia coli* O157:H7: spectrum of conservation, structure, and endothelial toxicity. *J Clin Microbiol*, 2006;44(5):1844-6.
18. Hiramatsu R, Matsumoto M, Miwa Y et al. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains and establishment of selective isolation media for these strains. *J Clin Microbiol*, 2002;40:922-925.
19. Karch H, Denamur E, Dobrindt U et al. The enemy within us: lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak. *EMBO Mol Med*, 2012;4(9):841-8.
20. Karch H, Schubert S, Zhang D et al. A genomic island, termed high-pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infect Immun*, 1999;67:5994-6001.
21. Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol*, 2005;295(6-7):405-418.
22. Karmali MA, Petric M, Lim C, et al. The association between hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, 1985;151:775-782.
23. Lhotová H. Hemolyticko-uremický syndrom u dítěte vyvolaný verotoxigenním kmenem *Escherichia coli* O26. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*, 1999;8(11):426.
24. Lhotová H, Bielaszewska M, Kopalová E et al. Haemolyticko-uremický syndrom - mikrobiologické šetření. *Cesk Epid Mikrobiol Imunol*, 1990;39(1):13-20.

25. Lhotová H, Ševčíková A. Závažný průběh hemolyticko-uremického syndromu u dítěte vyvolaný kmenem *E. coli* O157:H7 produkujícím verocytotoxin. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*, 2000;9(10):405-406.
26. Liu Y, Fratamico P, Debroy C et al. DNA sequencing and identification of serogroup-specific genes in the *Escherichia coli* O118 O antigen gene cluster and demonstration of antigenic diversity but only minor variation in DNA sequence of the O antigen clusters of *E. coli* O118 and O151. *Foodborne Pathog Dis*, 2008;5(4):449-57.
27. Marejková M, Bláhová K, Janda J et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* as causes of hemolytic uremic syndrome in the Czech Republic. *PLoS One*, 2013;8(9):e73927.
28. Marejková M, Roháčová H, Reisingerová M et al. An imported case of bloody diarrhea in the Czech Republic caused by a hybrid enteroaggregative hemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC) O104:H4 strain associated with the large outbreak in Germany, May 2011. *Folia Microbiol (Praha)*, 2012;57(2):85-89.
29. Marejková M, Zieg J, Dušek J et al. Smrtelný případ diareapozitivního hemolyticko-uremického syndromu vyvolaného enterohemoragickou *E. coli* O26. *Zprávy EM (SZÚ, Praha)* 2009;18(6):212-214.
30. Rangel JM, Sparling PH et al. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerg Infect Dis*, 2005;11:603–609.
31. Ribot EM, Fair MA, Gautom R et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, Salmonella, and Shigella for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis*, 2006;3:59-67.
32. Rosales A, Hofer J, Zimmerhackl LB et al. Need for long-term follow-up in enterohemorrhagic *Escherichia coli* - associated hemolytic uremic syndrome due to late-emerging sequelae. *Clin Infect Dis*, 2012;54:1413-1421.
33. Scheutz F, Teel LD, Beutin L et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol*, 2012;50:2951-2963.
34. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*, 2005;365:1073-86.
35. Tarr PI, Neill MA, Clausen CR et al. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology. *J Infect Dis*, 1990;162:553-556.
36. Torres AG, Zhou X, Kaper JB. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun*, 2005;73(1):18-29.
37. Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL et al. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med*, 2000;342:1930-1936.
38. Zhang W, Nadirk J, Kossow A et al. Phylogeny and phenotypes of clinical and environmental Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O174. *Environ Microbiol*, 2013; Aug 1. doi: 10.1111/1462-2920.12234. [Epub ahead of print]
39. Zieg J, Dusek J, Marejkova M et al. Fatal case of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome with severe neurologic involvement. *Pediatr Int*, 2012;54:166–167.

Adresa pro korespondenci

**Ing. Monika Marejková**

NRL pro *E. coli* a shigely

Státní zdravotní ústav

Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

e-mail: [monmarej@szu.cz](mailto:monmarej@szu.cz)

# An imported case of bloody diarrhea in the Czech Republic caused by a hybrid enteroaggregative hemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC) O104:H4 strain associated with the large outbreak in Germany, May 2011

M. Marejková · H. Roháčová · M. Reisingerová · P. Petráš

Received: 6 October 2011 / Accepted: 15 December 2011  
© Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i. 2012

**Abstract** A large outbreak caused by a rare Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O104:H4 occurred in Germany in May to July 2011. The National Reference Laboratory for *E. coli* and *Shigella* investigated the stool sample from an American tourist with bloody diarrhea who arrived in the Czech Republic from Germany where she consumed salads with raw vegetable a week ago. Using culture of the enriched stool on extended-spectrum  $\beta$ -lactamase agar, we isolated *E. coli* strain which belonged to serotype O104:H4 as determined by conventional and molecular serotyping. The strain contained the major virulence characteristics of enterohemorrhagic *E. coli* (*stx*<sub>2</sub> encoding Shiga toxin 2) and enteroaggregative *E. coli* (*aggA* encoding aggregative adherence fimbriae I). This unique combination of virulence traits demonstrated that this strain belongs to the hybrid enteroaggregative hemorrhagic *E. coli* clone which caused the German outbreak. Using advanced culture and molecular biological approaches is the prerequisite for identification of new, unusual pathogens.

---

M. Marejková (✉) · P. Petráš  
National Reference Laboratory for *E. coli* and *Shigella*,  
National Institute of Public Health,  
Šrobárova 48,  
100 42 Prague 10, Czech Republic  
e-mail: monmarej@szu.cz

M. Marejková  
3rd Medical Faculty, Charles University in Prague,  
Prague, Czech Republic

H. Roháčová · M. Reisingerová  
Department of Infectious Diseases, University Hospital Bulovka,  
Prague, Czech Republic

## Abbreviations

EAEC	Enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>
EAHEC	Enteroaggregative hemorrhagic <i>Escherichia coli</i>
HUS	Hemolytic–uremic syndrome
Stx	Shiga toxin
ESBL	Extended-spectrum $\beta$ -lactamase
CTX-M-15	Type of $\beta$ -lactamase (class A)
TEM	Type of $\beta$ -lactamase (class A)
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption ionization
MS	time-of-flight mass spectrometry
NIPH	National Institute of Public Health
NRL	National Reference Laboratory

## Introduction

In May to July 2011, a large outbreak of hemolytic–uremic syndrome (HUS) and bloody diarrhea caused by Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* O104:H4 occurred in Germany. As of 26 July 2011, when the Robert Koch Institute (RKI) in Berlin, Germany declared the outbreak to be officially over, 3,842 cases of *E. coli* O104:H4 infections have been reported in Germany, of which 855 (22.2%) were complicated by HUS. Fifty-three (1.4%) patients, including 29 HUS cases, died (RKI final report 2011). There were additional 137 cases of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O104:H4 infection in other 13 European countries, the USA, and Canada, most of which was associated with travel to Germany. Of these,

54 (39.4%) were HUS cases, including 2 deaths (ECDC report 2011). This was the second largest outbreak caused by Stx-producing *E. coli* (after the Sakai outbreak in Japan in 1996) (Michino et al. 1999; Fukushima et al. 1999), and the largest outbreak of HUS in the history of these pathogens.

France reported a local *E. coli* O104:H4 outbreak in Bordeaux region (Gault et al. 2011). This outbreak which involved 15 patients, including 8 cases of HUS, was not associated with travel to Germany. However, both the German and the French outbreaks had a common vehicle of transmission, in particular imported fenugreek seeds and sprouts (Gault et al. 2011; Buchholz et al. 2011).

This outbreak was caused by a previously very rare Stx-producing *E. coli* serotype, O104:H4. The highly virulent *E. coli* O104:H4 outbreak strain is a hybrid which shares the characteristics of enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and EHEC, including the typical aggregative adherence to epithelial cells and production of Stx2. In contrast to typical EHEC, this strain lacks the *eae* gene encoding adhesin intimin and EHEC-*hlyA* gene encoding EHEC hemolysin. Similarly to EHEC O157:H7, the outbreak strain contains the *ter* gene cluster encoding tellurite resistance (Bielaszewska et al. 2011a). The whole genome sequence analyses of two German outbreak isolates revealed that this strain is most similar to EAEC (more than 90%), but, in contrast to EAEC, it harbors a prophage encoding Stx2, which is typical for EHEC (Brzuskiwicz et al. 2011; Rasko et al. 2011; Mellmann et al. 2011). On the basis of this unusual combination of its genomic features, it has been proposed that the German outbreak strain represents a new pathotype of enteroaggregative hemorrhagic *E. coli* (EAHEC) (Brzuskiwicz et al. 2011). The outbreak strain contains three plasmids, two larger of which are of particular interest (Rasko et al. 2011). The larger plasmid (ca. 88 kb) designated pESBL contains the genes *bla* CTX-M-15 [type of  $\beta$ -lactamase (class A)] encoding extended-spectrum  $\beta$ -lactamase agar (ESBL) CTX-M-15 and *bla* TEM-1 [type of  $\beta$ -lactamase (class A)] encoding TEM-1  $\beta$ -lactamase. This plasmid encodes resistance of this strain to a broad spectrum of antimicrobials. The smaller plasmid (ca. 75 kb) contains virulence loci typical for EAEC, including *aggR* encoding master regulator of EAEC plasmid virulence genes and several genes under transcription control of *AggR* (Rasko et al. 2011). It also contains *aggABCD* cluster, encoding aggregative adherence fimbriae I (AAF/I), which mediate the typical aggregative adherence of this strain to intestinal epithelial cells (Bielaszewska et al. 2011a).

During the last 12 years, only two Stx-producing *E. coli* O104:H4 isolates have been reported from patients with HUS. The first strain, which was isolated in 2001 in Germany (Mellmann et al. 2008), has been later included in the HUS-associated *E. coli* (HUSEC) collection of the National Consulting Laboratory for HUS, University of Münster, Germany

as HUSEC041 (Mellmann et al. 2008). The second strain was isolated in 2006 from a 29-year-old woman in Korea (Bae et al. 2006). However, several Stx-producing *E. coli* O104:H4 isolates from patients with HUS or diarrhea were identified in several laboratories during or after the O104:H4 outbreak by retrospective typing of previously uncharacterized EHEC isolates (Scavia et al. 2011; Monecke et al. 2011; Scheutz et al. 2011; EFSA report 2011).

In the Czech Republic, there is a long tradition of the detection of EHEC infections. As early as in 1988, i.e., only 5 years after *E. coli* O157:H7 had been reported for the first time as a cause of human diseases in the USA (Riley et al. 1983), the first HUS outbreak in the Czech Republic was identified in North Bohemia (city of Česká Lípa). This outbreak consisted of five HUS cases in children between 4 and 20 months of age, with one of these cases being fatal. EHEC O157:H7 was isolated from feces of the patients (Lhotová et al. 1990). Another HUS outbreak, including four cases of the disease in children between 10 months and 3 years of age, was reported in summer 1995 again in North Bohemia, in the districts of Teplice and Ústí nad Labem. The infection was transmitted via consumption of non-pasteurized milk from a goat that shed EHEC O157:H7 in its feces (Bielaszewska et al. 1997).

During the last 6 years, 27 cases of EHEC infection (diarrhea, bloody diarrhea, HUS) were confirmed in the National Reference Laboratory (NRL) for *E. coli* and *Shigella* of the National Institute of Public Health (NIPH), Prague. The most frequently identified EHEC serotypes in the Czech Republic have been O26:H11, O157:H7, and O111:H8/H- (Marejková et al. 2011). Over the last 2 years, three family outbreaks occurred which were caused by EHEC of serogroups O157, O26, and O145. A 2-year-old girl with HUS caused by EHEC O26:H11 died (Marejková et al. 2009).

## Methods and case report

### Microbiological material

The stool sample from this patient at the stage of bloody diarrhea was sent to the NRL for *E. coli* and *Shigella* at NIPH on May 30, 2011 from the Department of Infectious Diseases, University Hospital Bulovka, Prague.

### EAHEC isolation and phenotyping

The strain was isolated using the stool enrichment in GN broth Hajna (BioVendor, Czech Republic) with novobiocin supplement (Oxoid) for 5 h and subsequent plating of the enriched sample on Columbia blood agar (Oxoid) and selective media including the ESBL agar (Oxoid), glucitol (formerly “sorbitol”) MacConkey agar (SMAC; Oxoid), cefixime–tellurite glucitol

MacConkey agar (CT-SMAC; Oxoid) and enterohemolysin agar (Sifin; Labmedia Servis, Czech Republic) for 18 h. The isolated strain was confirmed as *E. coli* [API 20E, bioMérieux; and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), Microflex, Bruker Daltonics] and serotyped using an *E. coli* O104 and H4 antisera from Statens Serum Institute, Denmark.  $\beta$ -D-Glucuronosidase activity was assessed using COLItest (Erba Lachema, Czech Republic). Production of Stx by the isolates was detected using the reverse passive latex agglutination test VTEC-RPLA (Denka Seiken, Japan).

### Genotyping

The isolate was screened using PCR for EHEC virulence genes including *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eae*, and EHEC-*hlyA* (Friedrich et al. 2002; Paton and Paton 1998), and for EAEC virulence, locus *aggA* which is a part of the gene cluster encoding AAF/I (Bielaszewska et al. 2011a). In addition, we used multiplex PCR targeting typical molecular features of the outbreak O104:H4 strain (*rfb*<sub>O104</sub>, *fliC*<sub>H4</sub>, *stx*<sub>2</sub>, and *terD*) which was developed in the National Consulting Laboratory for HUS in Münster, Germany (Bielaszewska et al. 2011a). The multiplex PCR was performed using PCR reaction mix (Top-Bio, Czech Republic) and primers from Generi Biotech (Czech Republic).

### Case report

A 62-year-old American traveler with diarrhea arrived in the Czech Republic from northern Germany where she had consumed raw vegetables and salads a week ago. She was admitted to the Hospital Na Františku in Prague and then transferred to the Clinic of Infectious, Parasitic and Tropical Diseases of the University Hospital Bulovka on May 28 with 1 week history of abdominal pain and diarrhea, followed during 5 days hereafter by bloody diarrhea. The patient was exhausted, afebrile, with painful urination and reduced urine output. She suffered from an early stage dehydration and had mildly elevated inflammatory markers (CRP=23.3 mg/L). There were no signs of anemia (red blood cells,  $4.47 \times 10^{12}/L$ ; hemoglobin, 141.0 g/L), thrombocytopenia (platelet count in range of  $471\text{--}554 \times 10^9/L$ ), or hemolysis (total bilirubin, 8  $\mu\text{mol}/L$ ; lactate dehydrogenase was not estimated). Serum levels of creatinine and blood urea nitrogen were in normal range. Urinalysis revealed microscopic hematuria only after admission. She was without any neurological symptoms all the time.

The patient was treated symptomatically with intravenous fluids for rehydration, diosmectite (Smecta), APO-Lactobacillus, No-SPA, and vitamin K (Kanavit). Her condition improved gradually, and she was discharged after 5 days with the instruction to see her physician when she is back in

the USA to be checked for her complete blood count and renal parameters.

### Results

A massive, uniform bacterial growth was observed on all solid media including Columbia blood agar, SMAC, CT-SMAC, ESBL, and enterohemolysin agar after overnight incubation of the enriched patient's stool sample. Dark blue-colored colonies typical for organisms that express the ESBL phenotype prevailed on ESBL agar (Fig. 1); they were confirmed as *E. coli* using API 20E and MALDI-TOF MS. Moreover, a few light blue colonies were subsequently identified as *Klebsiella pneumoniae*, also ESBL positive.

PCR genotyping and multiplex PCR targeting the typical features of the German outbreak strain confirmed that the *E. coli* strain isolated from ESBL agar has all the characteristics typical for the EAHEC O104:H4, i.e., it possessed *stx*<sub>2</sub>, *aggA*, *rfb*<sub>O104</sub>, *fliC*<sub>H4</sub>, and *terD*. The strain did not possess *stx*<sub>1</sub>, *eae*, and EHEC-*hlyA* genes. The presence of somatic O104 and flagellin H4 antigens was confirmed by slide agglutination, and production of Stx2 was verified by reverse passive latex agglutination.

EAHEC O104:H4 is phenotypically classical *E. coli*, i.e., Gram-negative and lactose-,  $\beta$ -glucuronosidase-, and indol-positive rod. The strain has an enormous motility, and the colonies could be agglutinated directly from the plate (without boiling) using monovalent antiserum O104. The strain grows well on all common media used for isolation of *Enterobacteriaceae*. On media for isolation of EHEC, such as SMAC agar and CT-SMAC agar, EAHEC O104:H4 grows in pink, glucitol-positive colonies, similar to most normal *E. coli* flora, which makes its isolation from these media difficult. The ability to grow on CT-SMAC demonstrates that the tellurite resistance phenotype encoded by the *ter* cluster (Bielaszewska



**Fig. 1** Growth of EAHEC O104:H4 (Czech isolate from an imported case of bloody diarrhea) on ESBL agar



et al. 2011b) is expressed in this strain. The ESBL phenotype expressed by the outbreak strain (resistance to all penicilins, cefalosporin, and co-trimoxazole) has facilitated an easy isolation of this strain from the stool sample on the ESBL medium where the strain grew in almost pure culture.

After the EAHEC O104:H4 strain had been isolated from the American traveler, additional nine stool specimens from patients with bloody diarrhea were sent to our laboratory for screening for this organism. All the patients had a history of recent travel to Germany. However, none of these stool specimens contained EAHEC O104:H4.

## Discussion

This is the first and probably the only case of bloody diarrhea in the Czech Republic caused by the EAHEC O104:H4 strain that caused the large German outbreak in May–July 2011. The travel history of the patient to Germany where she consumed salads containing the sprouts epidemiologically incriminated as a vehicle of transmission of the outbreak strain (EFSA report 2011) is in accordance with the microbiological findings. Results from epidemiological studies in Germany and also from France, where a cluster of EAHEC infections in patients without travel history to Germany occurred (Gault et al. 2011), support the hypothesis that seeds used for sprouting (distributed to local producers or retail outlets) contained the EAHEC O104:H4 contamination. This ultimately led to recall of the contaminated sprouts from the market (ECDC report 2011). The EFSA technical report published on 5 July concluded that a specific lot of fenugreek seeds imported from Egypt were most probably the vehicle of the EAHEC O104:H4 infection; however, it cannot be excluded that other lots might also have been implicated. The exact point of contamination of the seeds/sprouts in the food chain has not been determined, but it is speculated that this occurred before their import (EFSA report 2011).

The largest food-borne *E. coli* outbreak with similar vehicle of transmission was reported in Japan in three Sakai districts in 1996, where elementary school children were infected with EHEC O157:H7 after consumption of white radish sprouts from a particular farm, which were served as a part of a school lunch (Michino et al. 1999). According to Fukushima et al. (1999), 12,680 symptomatic patients including putative secondary infections were infected in this massive outbreak; 121 cases developed HUS, and 3 girls died. However, similar to the EAHEC outbreak strain in Germany, the EHEC O157:H7 strain associated with the Sakai outbreak has never been isolated from the sprouts. The possible reason for the failure to isolate the EAHEC O104:H4 strain from the sprouts might be its ability to enter the viable but non-culturable state which might be a form in which it might survive in the environment (Aurass et al. 2011).

The recent (2011) EAHEC outbreak was the largest *E. coli* outbreak ever reported in Germany, with a very atypical age and sex distribution of the cases. The majority of cases involved adults, while till this time the EHEC infections were largely a pediatric problem. The number of cases affecting women outnumbered men in both HUS (68%) and EHEC infections (58%) (RKI final report 2011).

We conclude that the successful isolation of the EAHEC O104:H4 strain from the human stool in the NRL for *E. coli* and *Shigella* and subsequent prompt characterization of this strain as a close relative of the German outbreak strain were only possible by using new culture and molecular biological approaches, which is the prerequisite for identification of new, unusual pathogens.

**Acknowledgments** The first author is indebted to Prof. Dr. H. Karch, the Head of the National Consulting Laboratory for Hemolytic–Uremic Syndrome at the Institute for Hygiene, University of Münster (Germany) for the possibility to get trained in this laboratory in diagnosis of EHEC infections. The authors are also thankful to Assoc. Prof. Dr. M. Bielaszewska (from the above Institute) for assistance provided to the Czech NRL for *E. coli* and *Shigella*, especially during the hectic time of the German outbreak, and for discussions during the preparation of this manuscript. The authors thank the laboratory colleagues, in particular Ms. M. Vašáková, and the collaborating microbiologists and clinicians for providing the patients' data. The authors also thank BioVendor Ltd. (Czech Republic) for long-term access to the device Microflex for MALDI-TOF MS identification of bacteria.

## References

- Aurass P, Prager R, Flieger A (2011) EHEC/EAEC O104:H4 strain linked with the 2011 German outbreak of hemolytic uremic syndrome enters into the viable but non-culturable state in response to various stresses and resuscitates upon stress relief. *Environ Microbiol* 13(12):3139–3148. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02604.x
- Bae WK, Lee YK, Cho MS et al (2006) A case of hemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O104:H4. *Yonsei Med J* 47:437–439
- Bielaszewska M, Janda J, Bláhová K et al (1997) Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidemiol Infect* 119:299–305
- Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H (2011a) Characterization of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of hemolytic uremic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis* 11(9):671–676. doi:10.1016/S1473-3099(11)70165-7
- Bielaszewska M, Middendorf B, Tarr PI, Zhang W, Prager R, Aldick T, Dobrindt U, Karch H, Mellmann A (2011b) Chromosomal instability in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: impact on adherence, tellurite resistance and colony phenotype. *Mol Microbiol* 79:1024–1044. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07499.x
- Brzuskiwicz E, Thürmer A, Schuldes J et al (2011) Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: entero-aggregative-haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch Microbiol* 193(12):883–891. doi:10.1007/s00203-011-0725-6
- Buchholz U, Bernard H, Werber D et al (2011) German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *N Engl J Med* 365:1763–1770, Epub accessed 26 November 2011

- ECDC report (2011) European Centre for Disease Prevention and Control. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC): update on outbreak in the EU, 27 July 2011. Epidemiological updates; available at: [http://ecdc.europa.eu/en/activities/sciadvice/Pages/Epidemiological\\_Updates.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/activities/sciadvice/Pages/Epidemiological_Updates.aspx). Accessed 30 Sept 2011
- EFSA (European Food Safety Authority) report (2011) Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 OUTbreaks in Germany and France. European Food Safety Authority, technical report; available at: <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/176e.pdf>. Accessed 8 Aug 2011
- Robert Koch Institute (RKI) Final Report (2011) Final presentation and evaluation of epidemiological findings in the EHEC O104:H4 outbreak, Germany 2011. Berlin 2011; [http://www.rki.de/clin\\_153/nn\\_217400/EN/Home/EHEC\\_final\\_report,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/EHEC\\_final\\_report.pdf](http://www.rki.de/clin_153/nn_217400/EN/Home/EHEC_final_report,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/EHEC_final_report.pdf)
- Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang W-L et al (2002) *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* 185:74–84
- Fukushima H, Hashizume T, Morita Z et al (1999) Clinical experiences in Sakai City Hospital during the massive outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections in Sakai City, 1996. *Pediatr Int* 41:213–217
- Gault G, Weill F, Mariani-Kurkdjian P, et al. (2011) Outbreak of hemolytic uremic syndrome and bloody diarrhea due to *Escherichia coli* O104:H4, south-west France, June 2011. *Euro Surveill* 16:pii=19905; available at: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19905>. Accessed 29 Jul 2011
- Lhotová H, Bielaszewska M, Kopalová E, Štolbová M (1990) Hemolytic-uremic syndrome—microbiological characterization. *Čs Epidemiol Microbiol Imunol* 39:13–20 (In Czech)
- Marejková M, Zieg J, Dušek J, Bláhová K, Petráš P (2009) Fatal case of diarrhea-positive hemolytic-uremic syndrome caused by enterohemorrhagic *E. coli* O26. (In Czech) *Zprávy EM (SZÚ, Praha)* 18:212–214; English summary available at: [http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy\\_EM/18\\_2009/6\\_cerven/212\\_hus.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/18_2009/6_cerven/212_hus.pdf)
- Marejková M, Roháčová H, Reisingerová M, Petráš P (2011) A large outbreak caused by a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O104:H4 and one imported case in the Czech Republic. (In Czech) *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 20:170–173 (published on-line 7 July 2011); English summary available at: <http://www.szu.cz/tema/prevence/velka-nemecka-epidemie-vyvolana-shigatoxigenim-kmenem>
- Mellmann A, Bielaszewska M, Kock R, Friedrich AW, Fruth A, Middendorf B et al (2008) Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 14:1287–1290
- Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA 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. doi:10.1371/journal.pone.0022751
- Michino H, Araki K, Miniami S et al (1999) Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am J Epidemiol* 150:787–796
- Monecke S, Mariani-Kurkdjian P, Bingen E et al (2011) Presence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* ST678/O104:H4 in France prior to 2011. *Appl Environ Microbiol* 77:8784–8786
- Paton AW, Paton JC (1998) Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*<sub>O111</sub>, and *rfb*<sub>O157</sub>. *J Clin Microbiol* 36:98–602
- Rasko DA, Webster DR, Sahl JW et al (2011) Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *New Engl J Med* 365(8):709–717. doi:10.1056/NEJMoa1106920
- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD et al (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New Engl J Med* 308:681–685
- Scavia G, Morabito S, Tozzoli R, Michelacci V et al (2011) Similarity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strains from Italy and Germany. *Emerg Infect Dis* 17:1957–1958
- Scheut F, Møller Nielsen E, Frimodt-Møller J et al (2011) Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Eurosurveillance* 16:19889

# Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H<sup>-</sup>: A New Virulent Clone Emerges in Europe

Martina Bielaszewska,<sup>1,a</sup> Alexander Mellmann,<sup>1,a</sup> Stefan Bletz,<sup>1</sup> Wenlan Zhang,<sup>1</sup> Robin Köck,<sup>1</sup> Annelene Kossow,<sup>1</sup> Rita Prager,<sup>2</sup> Angelika Fruth,<sup>2</sup> Dorothea Orth-Höller,<sup>3</sup> Monika Marejková,<sup>4</sup> Stefano Morabito,<sup>5</sup> Alfredo Caprioli,<sup>5</sup> Denis Piérard,<sup>6</sup> Geraldine Smith,<sup>7</sup> Claire Jenkins,<sup>7</sup> Katarína Čurová,<sup>8</sup> and Helge Karch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Hygiene and the National Consulting Laboratory on Hemolytic Uremic Syndrome, University of Münster, and <sup>2</sup>National Reference Center for Salmonella and Other Enteric Pathogens, Robert Koch Institute, Wernigerode, Germany; <sup>3</sup>Division of Hygiene and Medical Microbiology, Innsbruck Medical University, Austria; <sup>4</sup>Reference Laboratory for *E. coli* and Shigellae, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic; <sup>5</sup>European Union Reference Laboratory for *E. coli*, Department of Veterinary Public Health and Food Safety, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy; <sup>6</sup>Department of Microbiology, Universitair Ziekenhuis Brussel, Brussels, Belgium; <sup>7</sup>Division of Enteric Pathogens, Central Public Health Laboratory, London, United Kingdom; and <sup>8</sup>Department of Medical and Clinical Microbiology, Pavol Jozef Safarik University of Košice, Slovakia

**Background.** Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O26 causes diarrhea and hemolytic uremic syndrome (HUS). Strains harboring the *stx*<sub>1a</sub> gene prevail, but strains with *stx*<sub>2a</sub> as the sole Shiga toxin–encoding gene are now emerging. The traits and virulence of the latter set of strains are unknown. We correlated *stx* genotypes of 272 EHEC O26 strains isolated in 7 European countries between 1996 and 2012 with disease phenotypes. We determined phylogeny, clonal structure, and plasmid gene profiles of the isolates and portray geographic and temporal distribution of the different subgroups.

**Methods.** The *stx* genotypes and plasmid genes were identified using polymerase chain reaction, phylogeny was assigned using multilocus sequence typing, and clonal relatedness was established using pulsed-field gel electrophoresis.

**Results.** Of the 272 EHEC O26 isolates, 107 (39.3%), 139 (51.1%), and 26 (9.6%) possessed *stx*<sub>1a</sub>, *stx*<sub>2a</sub>, or both genes, respectively. Strains harboring *stx*<sub>2a</sub> only were significantly associated with HUS (odds ratio, 14.2; 95% confidence interval, 7.9–25.6; *P* < .001) compared to other *stx* genotypes. The *stx*<sub>2a</sub>-harboring strains consist of 2 phylogenetically distinct groups defined by sequence type (ST) 21 and ST29. The ST29 strains are highly conserved and correspond by plasmid genes to the new virulent clone of EHEC O26 that emerged in Germany in the 1990s. This new clone occurred in 6 of the 7 countries and represented approximately 50% of all *stx*<sub>2a</sub>-harboring EHEC O26 strains isolated between 1996 and 2012.

**Conclusions.** A new highly virulent clone of EHEC O26 has emerged in Europe. Its reservoirs and sources warrant identification.

**Keywords.** enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26; new clone; Shiga toxin; hemolytic uremic syndrome.

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) causes diarrhea, bloody diarrhea, and the hemolytic uremic syndrome (HUS) [1]. HUS, consisting of hemolytic anemia,

thrombocytopenia, and acute renal insufficiency [1], complicates approximately 15% of childhood EHEC O157:H7 infections and is the most common cause of childhood acute renal failure [2].

Although *E. coli* O157:H7 is the predominant cause of HUS worldwide [1], EHEC of serotype O26:H11/H<sup>-</sup> (nonmotile) has emerged as the most common non-O157 EHEC strain causing human diseases in Europe [3–10] and the United States [11–13]. It has also been increasingly isolated from patients in South America [14], Asia [15], and Australia [16]. EHEC O26 can cause disease that is as severe as that caused by EHEC O157:H7 [3, 17, 18], and there appears to be

Received 16 November 2012; accepted 24 January 2013; electronically published 1 February 2013.

<sup>a</sup>M. B. and A. M. contributed equally to this work.

Correspondence: Martina Bielaszewska, MD, PhD, Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Str 41, 48149 Münster, Germany (mbiela@uni-muenster.de).

**Clinical Infectious Diseases** 2013;56(10):1373–81

© The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/cid/cit055

no significant difference in the long-term outcome of HUS caused by non-O157 EHEC (including EHEC O26) and EHEC O157 [19]. Children suffering from HUS caused by EHEC O26 and other non-O157 EHEC strains are younger than those with HUS caused by EHEC O157:H7 [3, 10].

Thrombotic microangiopathy caused by Shiga toxins (Stx), the major virulence factors of EHEC, forms the histopathological basis of HUS [1]. EHEC O26:H11/H<sup>-</sup> produces, singly or together, Stx1a and Stx2a encoded by *stx*<sub>1a</sub> and *stx*<sub>2a</sub> genes, respectively [20]. Most EHEC O26 strains isolated from patients harbor *stx*<sub>1a</sub> only [9, 11, 12, 14, 15, 21], but strains possessing *stx*<sub>2a</sub> as the sole *stx* gene, which were first identified in Germany in the mid-1990s [22], have been increasingly detected throughout Europe [5, 8, 18, 23–25] and the New World [11, 14]. However, characteristics of such isolates and their potential to cause HUS compared to that of EHEC O26 with other *stx* genotypes have not been systematically studied. Here we correlated clinical outcomes of the infection with *stx* genotypes of EHEC O26 isolates, determined the isolates' phylogeny and clonal structure, and portray geographic and temporal distribution of the different subgroups in different European countries.

## METHODS

### Strains and Patients

Two hundred seventy-two EHEC O26:H11/H<sup>-</sup> strains were isolated between January 1996 and September 2012 from stools of epidemiologically unrelated patients with HUS (n = 127), bloody diarrhea (n = 18), or nonbloody diarrhea (n = 127) in Germany (n = 182), Austria (n = 38), Italy (n = 24), the Czech Republic (n = 18), Belgium (n = 7), the United Kingdom (n = 2), and Slovakia (n = 1). Demographic characteristics of the patients are provided in Table 1.

### Case Definitions

Diarrhea was defined as 3 or more liquid stools without visible blood per day, and as bloody if blood was visible by the naked eye. The information about the number of stools per

day, stool consistency, presence of mucus and/or visible blood, and duration of diarrhea was obtained from treating physicians or patients' parents or guardians using standardized questionnaires. The questionnaires were reviewed nonanonymously by laboratory staff. HUS was defined by a hematocrit level of <30%, with smear evidence of intravascular hemolysis, thrombocytopenia (platelet count <150 000/mm<sup>3</sup>), and renal insufficiency (serum creatinine concentration greater than the upper limit of the normal range for age) [1]. Clinical diagnoses based on the case definitions were provided for all patients by treating physicians.

### Genotypic and Phenotypic Characterization of EHEC O26 Isolates

Isolates were verified as *E. coli* (API 20 E; bioMérieux, Marcy l'Etoile, Lyon, France) and O:H serotyped [26]. H types were confirmed using *fliC* genotyping [7]; all strains, both motile and nonmotile, possessed the *fliC* gene encoding the H11 antigen. All *stx* genotypes, presence of *eae* (encoding adhesin intimin), and plasmid genes were determined using polymerase chain reaction (PCR) [20, 22]. Stx production was confirmed by Vero cell assay [26].

### Multilocus Sequence Typing

Multilocus sequence typing (MLST) was built on sequences of 7 housekeeping genes [7], and sequence types (STs) were assigned (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>).

### Pulsed-Field Gel Electrophoresis

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed using the standardized PulseNet protocol [27] with a subset of geographically and temporally representative strains. Restriction patterns were analyzed and the cluster analysis was performed with BioNumerics software, version 6.5 (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium). The dendrogram was generated using the band-based Dice similarity coefficient (1% band position and 1% optimization tolerance) and the unweighted pair group method with arithmetic means.

### Antimicrobial Susceptibility Testing

Susceptibility to ampicillin, cefuroxime, cefotaxime, cefpodoxime, ceftazidime, piperacillin/tazobactam, tigecycline, meropenem, gentamicin, amikacin, trimethoprim/sulfamethoxazole, ciprofloxacin, fosfomicin, and nitrofurantoin was tested using the disk diffusion method according to EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) breakpoints [28] and standard recommendations [29].

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using  $\chi^2$ , Fisher exact (EpiInfo version 7.1.0.6) or Mann-Whitney *U* (IBM SPSS Statistics 20.0) tests. Two-tailed *P* values <.05 were considered significant.

**Table 1. Demographic Characteristics of 272 Patients**

Variable	Specification
Male sex <sup>a</sup>	141/272 (51.8%)
Female sex <sup>a</sup>	115/272 (42.3%)
Children	261/272 (96.0%)
Adults	11/272 (4.0%)
Age, all patients, median (range)	23 mo (2 mo–63 y)
Age, children, median (range) (n = 261)	21 mo (2 mo–14 y)
Age, adults, median (range) (n = 11)	35 y (26–63 y)

<sup>a</sup> Sex was unknown in 16 patients.

**Table 2. Association Between *stx* Genotypes of 272 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H<sup>-</sup> Isolates and Clinical Outcomes of Infection**

Isolate	No. of Isolates	No. of Isolates From Clinical Outcome		OR (95% CI)	P Value for HUS <sup>a</sup>
		HUS (n = 127)	Diarrhea (Nonbloody/Bloody) Without HUS (n = 145; 127/18)		
<i>stx</i> <sub>1a</sub>	107	9 <sup>b</sup>	98 (84/14)	.04 (.02–.08)	P < .001
<i>stx</i> <sub>1a</sub> + <i>stx</i> <sub>2a</sub>	26	14 <sup>c</sup>	12 (11/1)	1.4 (.6–3.1)	P = .57
<i>stx</i> <sub>2a</sub> (all strains)	139	104	35 (32/3)	14.2 (7.9–25.6)	P < .001
<i>stx</i> <sub>2a</sub> (ST21) <sup>d</sup>	67	46	21 (18/3)	3.4 (1.9–6.0) <sup>e</sup>	P < .001
<i>stx</i> <sub>2a</sub> (ST29) <sup>d</sup>	69	57	12 (12/0)	9.0 (4.5–17.9) <sup>e</sup>	P < .001

Statistical analysis was performed using the  $\chi^2$  test.

Abbreviations: CI, confidence interval; HUS, hemolytic uremic syndrome; OR, odds ratio; ST, sequence type; *stx*, Shiga toxin–encoding gene.

<sup>a</sup> P < .05 was considered significant.

<sup>b</sup> All 9 isolates from HUS patients belonged to ST21.

<sup>c</sup> All 14 isolates from HUS patients belonged to ST21.

<sup>d</sup> Three single *stx*<sub>2a</sub>-positive isolates with STs other than ST21 or ST29 (STs 396, 591, 1566) were excluded from statistical analysis.

<sup>e</sup> Association with HUS ST21 vs ST29: OR, 2.2; 95% CI, 1.0–4.9; P = .089.

## RESULTS

### Association Between *stx* Genotypes and Clinical Outcomes of Infection

Among the 272 EHEC O26:H11/H<sup>-</sup> isolates, 107 (39.3%) possessed *stx*<sub>1a</sub>, 139 (51.1%) *stx*<sub>2a</sub>, and 26 (9.6%) both *stx*<sub>1a</sub> and *stx*<sub>2a</sub> (Table 2). Of the 107 *stx*<sub>1a</sub>-containing strains, 9 (8.4%) were isolated from patients with HUS and 98 (91.6%) from patients with diarrhea without HUS, demonstrating a significant association of the *stx*<sub>1a</sub> genotype with uncomplicated diarrhea (odds ratio [OR], 27.3; 95% confidence interval [CI], 12.8–58.6; P < .001) compared to HUS (OR, 0.04; 95% CI, .02–.08; P < .001) (Table 2). In contrast, 104 of the 139 *stx*<sub>2a</sub>-harboring isolates (74.8%) originated from patients with HUS, and 35 (25.2%) from patients with diarrhea without HUS, demonstrating the statistically significant association of the *stx*<sub>2a</sub> genotype with HUS (OR, 14.2; 95% CI, 7.9–25.6; P < .001) compared to uncomplicated diarrhea (OR, 0.07; 95% CI, .04–.13; P < .001) (Table 2). Strains harboring both *stx*<sub>1a</sub> and *stx*<sub>2a</sub> had equal potential to cause HUS and diarrhea (Table 2). Children were significantly more frequently infected with strains harboring *stx*<sub>2a</sub> only (138 of 261 [52.9%]) than adults (1 of 11 [9.1%]) (OR, 11.2; 95% CI, 1.1–88.9; P = .004). Accordingly, in children the infection had a tendency to progress to HUS (124 of 261 [47.5%]) (OR, 2.4; 95% CI, .6–9.3; P = .228; Supplementary Table 1).

### Phylogeny of EHEC O26:H11/H<sup>-</sup> With Different *stx* Genotypes

Two major STs (21 and 29), which share 6 of the 7 MLST loci, and 5 single locus variants (SLVs) of these 2 STs were identified (Table 3, Supplementary Table 2). Almost all strains harboring *stx*<sub>1a</sub> only (105 of 107 [98.1%]), and all strains

harboring *stx*<sub>1a</sub> and *stx*<sub>2a</sub>, belonged to ST21 (Table 3); the remaining 2 strains of the *stx*<sub>1a</sub> genotype belonged to ST1565 and ST1705, respectively (Table 3), which are SLVs of ST21 (Supplementary Table 2). In contrast, strains containing *stx*<sub>2a</sub> but not *stx*<sub>1a</sub> were equally distributed between ST21 (67 of 139 [48.2%]) and ST29 (69 of 139 [49.6%]) (Table 3); 3 strains belonged to ST396, ST591, and ST1566 (1 each) (Table 3), which are SLVs of ST29 (ST396 and ST1566) and ST21 (ST591) (Supplementary Table 2). Thus, EHEC O26:H11/H<sup>-</sup> strains harboring *stx*<sub>1a</sub> alone or in combination with *stx*<sub>2a</sub> are phylogenetically positioned in the same genetic background (as defined by MLST core genome genes), whereas strains with *stx*<sub>2a</sub> but not *stx*<sub>1a</sub> consist of 2 distinct but closely related phylogenetic groups. Of these 2 groups characterized by ST21 and ST29, ST29 and its 2 SLVs (ST396 and ST1566) and ST591 (SLV of ST21) are unique for such strains (Table 3).

### Plasmid Gene Profiles

We plasmid genotyped *stx*<sub>2a</sub>-harboring EHEC O26:H11/H<sup>-</sup> strains belonging to different STs to provide deeper characterization, with emphasis on the presence of the unique plasmid gene combination found previously in the new *stx*<sub>2a</sub>-harboring EHEC O26 German clone [22]. Almost all (65 of 69 [94.2%]) ST29 strains possessed the plasmid gene combination typical for the new clone (EHEC-*hlyA*<sup>+</sup>/*katP*<sup>-</sup>/*espP*<sup>-</sup>/*etpD*<sup>+</sup>); in contrast, this combination was found in no other STs (Table 4). Of the 4 different plasmid gene combinations in ST21, the most frequent (52 of 67 strains [77.6%]) was EHEC-*hlyA*<sup>+</sup>/*katP*<sup>+</sup>/*espP*<sup>+</sup>/*etpD*<sup>-</sup> (Table 4). This combination was also found in 2 strains of ST29 and single strains of STs 396 and 591 (Table 4). Two strains of ST29 and the single ST1566

**Table 3. Phylogeny of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H<sup>-</sup> Strains With Different *stx* Genotypes Based on Multilocus Sequence Typing**

stx Genotype	No. of Strains Belonging to Sequence Type <sup>a</sup>							Strains Total
	ST21	ST29	ST396 <sup>b</sup>	ST591 <sup>c</sup>	ST1565 <sup>c</sup>	ST1566 <sup>b</sup>	ST1705 <sup>c</sup>	
<i>stx</i> <sub>1a</sub>	105	0	0	0	1	0	1	107
<i>stx</i> <sub>2a</sub>	67	69	1	1	0	1	0	139
<i>stx</i> <sub>1a</sub> + <i>stx</i> <sub>2a</sub>	26	0	0	0	0	0	0	26
Strains total	198	69	1	1	1	1	1	272

Abbreviations: ST, sequence type; *stx*, Shiga toxin-encoding gene.

<sup>a</sup> Allelic profiles of the different STs are shown in [Supplementary Table 2](#).

<sup>b</sup> Single locus variant of ST29.

<sup>c</sup> Single locus variant of ST21.

strain had none of the plasmid genes sought (Table 4). Thus, based on the phylogeny and plasmid gene profiles, *stx*<sub>2a</sub>-harboring EHEC O26 consists of 2 major subgroups: (i) strains of ST29, which typically contain EHEC-*hlyA* and *etpD*, but not *espP* and *katP*, and belong to the new EHEC O26 German clone, and (ii) strains of ST21, which differ phylogenetically and by plasmid gene profiles from strains of ST29. Both groups showed a significant risk of progression of the infection to HUS (ST21: OR, 3.4; 95% CI, 1.9–6.0;  $P < .001$ ; ST29: OR, 9.0; 95% CI, 4.5–17.9;  $P < .001$ ; Table 2). Although ST29 had a 2.6-fold higher OR in terms of HUS association than ST21, there was no statistically significant difference between these 2 STs in their association with HUS (OR, 2.2; 95% CI, 1.0–4.9;  $P = .089$ ; Table 2). Also, ages of children who developed HUS after infection with strains of ST29 (median, 24 months [range, 8–156 months]) and ST21 (median, 20 months [range, 2–84 months]) did not significantly differ ( $P = .053$ , Mann-Whitney  $U$  test),

and sex was equally distributed among the 2 groups ( $P = .88$ , Mann-Whitney  $U$  test).

#### Clonal Structure of *stx*<sub>2a</sub>-harboring EHEC O26:H11/H<sup>-</sup>

All but 2 strains (ST396 and ST1566) belonged to 3 PFGE-defined clusters (Figure 1). Cluster A was comprised of all 16 ST21 strains and the single ST591 isolate, with a 78% total similarity (Figure 1). ST29 strains belonged to clusters B (n = 28) and C (n = 13). The similarity between and within clusters B and C was 80%, and 84% and 86%, respectively (Figure 1). Thus, strains of ST29 (the new clone) were more closely related to each other than were strains of the other STs. Intriguingly, within each of clusters B and C there were strains with closely related (similarity >95%) or even identical PFGE patterns despite their recovery in different years and/or in different countries (Figure 1). The PFGE data suggest the clonal origin of ST29 strains and demonstrate that the new

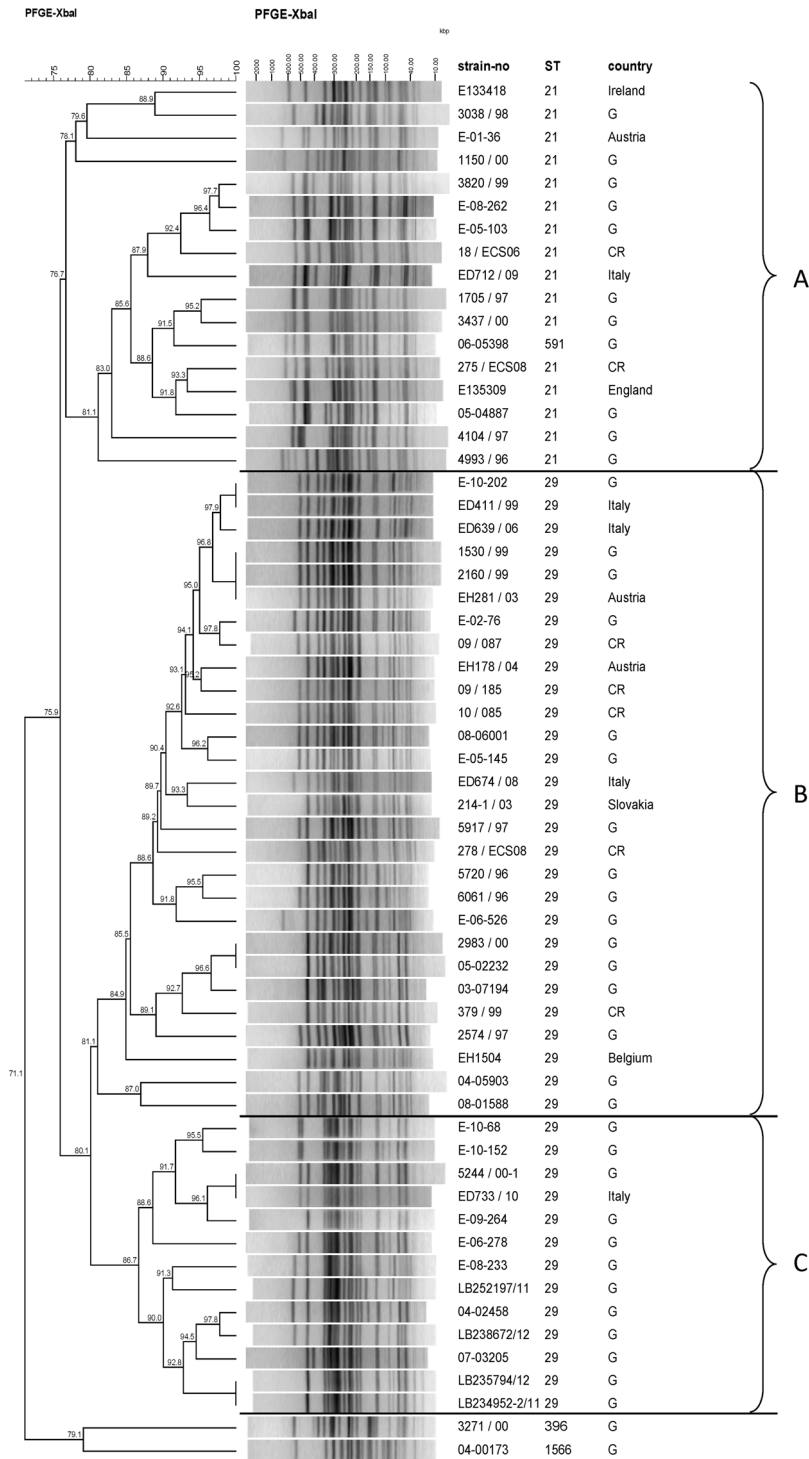
**Table 4. Plasmid Gene Profiles of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H<sup>-</sup> of the *stx*<sub>2a</sub> Genotype Belonging to Different Sequence Types**

ST	Plasmid Gene Combination (Gene Order EHEC- <i>hlyA</i> / <i>katP</i> / <i>espP</i> / <i>etpD</i> ) <sup>a</sup>						Strains Total
	+/-/-/+ <sup>b</sup>	+/+/+/-	+/-/-/-	+/-/+/-	+/+/-/-	-/-/-/-	
ST21	0	52	7	3	5	0	67
ST29	65	2	0	0	0	2	69
ST396	0	1	0	0	0	0	1
ST591	0	1	0	0	0	0	1
ST1566	0	0	0	0	0	1	1
Strains total	65	56	7	3	5	3	139

Abbreviations: +, gene present; -, gene absent; EHEC, enterohemorrhagic *Escherichia coli*; ST, sequence type.

<sup>a</sup> Presence of the plasmid genes EHEC-*hlyA*, *katP*, *espP*, and *etpD* (encoding EHEC hemolysin, catalase-peroxidase, serine protease EspP, and type II secretion system, respectively) was determined using polymerase chain reaction.

<sup>b</sup> Plasmid gene profile typical for the new EHEC O26 German clone [22].



**Figure 1.** Dendrogram of *Xba*I pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) band patterns of 60 enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 isolates harboring *stx*<sub>2a</sub> only and belonging to different sequence types (STs). The isolates are representatives of strains from all 7 countries and the entire study period 1996 to 2012. ST21 and ST29 strains share 6 of 7 multilocus sequence typing loci; the other STs are single locus variants of either ST21 or ST29 (Supplementary Table 2). The dendrogram was created by unweighted pair group method with arithmetic means in BioNumerics software 6.5 (Dice similarity coefficient; positional tolerance settings were as follows: optimization 1%; tolerance 1%; H>0%; S>0%); to design patterns, any discernible band difference was considered according to the criteria of PulseNet. The assigned clusters (A, B, and C) are indicated by brackets. The degree of similarity (%) is shown on the scale at the top left of the figure. The following strains had identical PFGE patterns (country and year of isolation in parentheses): E-10-202 (Germany, 2010) and ED411/99 (Italy, 1999); 1530/99, 2160/99 (Germany, 1999) and EH281/03 (Austria, 2003); 2983/00 and 05-02232 (Germany, 2000 and 2005, respectively); 5244/00-1 (Germany, 2000) and ED733/10 (Italy, 2010); LB235794/12 and LB234952-2/11 (Germany, 2012 and 2011, respectively). Abbreviations: CR, Czech Republic; G, Germany; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; ST, sequence type.

**Table 5. Proportions of Strains of the New Clone (ST29) Among All *stx*<sub>2a</sub>-Harboring Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 Isolated in Different European Countries, 1996–2012**

Country	<i>stx</i> <sub>2a</sub> -Harboring EHEC O26 Isolates		
	Total	No. (%) of ST29	No. (%) of Other STs
Austria	15	4 (26.7)	ST21: 11 (73.3)
Belgium	7	3 (42.9)	ST21: 4 (57.1)
Czech Republic	16	7 (43.7)	ST21: 9 (56.3)
Germany	86	47 (54.7)	STs 21, 396, 591, 1566: 39 (45.3)
Italy	12	7 (58.3)	ST21: 5 (41.7)
Slovakia	1	1 (100)	0
United Kingdom	2 <sup>a</sup>	0	ST21: 2 (100)
Total	139	69 (49.6)	70 (50.4)

Abbreviations: EHEC, enterohemorrhagic *Escherichia coli*; ST, sequence type; *stx*<sub>2a</sub>, Shiga toxin 2a-encoding gene.

<sup>a</sup> One strain was from England and 1 from Ireland.

EHEC O26 clone is highly conserved, in accordance with its recent emergence [22].

#### Geographic and Temporal Distribution of EHEC O26 ST29 Strains

EHEC O26 ST29 strains were recovered in 6 of the 7 countries (Table 5), and in all but 1 study years (Figure 2). There were considerable interannual variations in the relative proportion of ST29 strains among all *stx*<sub>2a</sub>-harboring EHEC O26 (Figure 2A) and in spatial distribution of such isolates (Figure 2B). Whereas in Germany ST29 strains were isolated during the entire study period (except 2001), their isolation in the other countries was intermittent (Figure 2B).

#### Antibiotic Susceptibilities of *stx*<sub>2a</sub>-harboring EHEC O26 of Different STs

Twenty-three ST29 strains and 11 strains of the other STs selected to span the entire study region and period were tested for their susceptibility to 14 antimicrobials. Twenty ST29, 7 ST21, and 1 each ST396, ST591, and ST1566 strains were susceptible to all tested antimicrobials. One ST21 strain was resistant to ampicillin, cefuroxime, cefpodoxime, tazobactam/piperacillin, and trimethoprim/sulfamethoxazole and had intermediate susceptibility to cefotaxime. The 3 remaining ST29 strains were resistant to ampicillin ( $n = 2$ ; one of them had intermediate susceptibility to tigecycline and ciprofloxacin) or to amikacin ( $n = 1$ ). Hence, there was no correlation between STs and antimicrobial resistance patterns.

## DISCUSSION

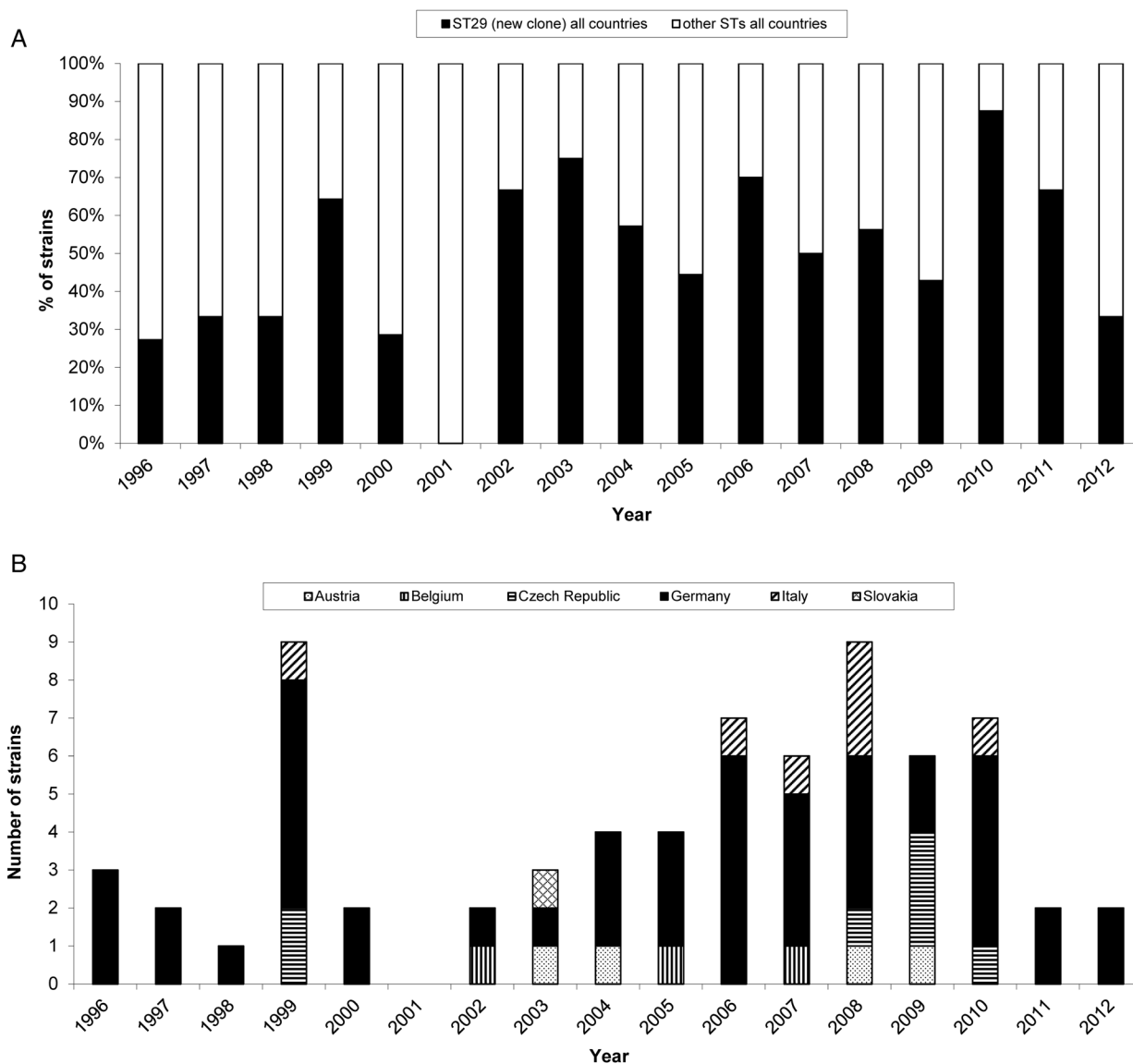
EHEC O26:H11/H<sup>-</sup> are globally emerging human pathogens. They accounted for 5%–7% of all human EHEC isolates and for

15%–19% of HUS-associated EHEC isolates reported to the European Surveillance System of the European Centre for Disease Prevention and Control between 2008 and 2010, following in frequency EHEC O157 [30, 31]. In the countries participating in this study, EHEC O26 accounted for 16%–55% of EHEC isolates from HUS patients between 2008 and 2012, being in some countries and years the most common cause of pediatric HUS [32] (authors' unpublished data). We now demonstrate that EHEC O26 strains harboring *stx*<sub>2a</sub> as the sole *stx* have a significant potential to cause HUS, and those harboring both *stx*<sub>1a</sub> and *stx*<sub>2a</sub> have equal potential to cause HUS and diarrhea without HUS, based on analysis of the available clinical isolates. The strong association of the *stx*<sub>2a</sub> genotype in the EHEC O26 infecting strains with the progression of the infection to HUS is in accordance with data from other EHEC series [3, 5, 8, 11].

This study extends our current knowledge about this serotype by demonstrating that *stx*<sub>2a</sub>-harboring EHEC O26 are heterogeneous, consisting of 2 major phylogenetically distinct subgroups (ST21 and ST29), each of which is associated with a particular plasmid gene profile. ST29 strains represent a highly virulent clone of EHEC O26:H11/H<sup>-</sup> which emerged in Germany in the mid-1990s [22], and appear to have spread throughout Europe. However, we do acknowledge that this analysis depends on strain recovery practices, and cannot be considered to be a population-based survey. We wish to note that *stx*<sub>2a</sub>-harboring EHEC O26 of ST21 and ST29 do not substantially differ in their association with HUS (Table 2). Thus, the presence of *stx*<sub>2a</sub> rather than ST of the EHEC O26 isolate is a predictor for HUS development in infected individuals.

Why is *stx*<sub>2a</sub>-harboring EHEC O26 a successful clone? We speculate that the ability of EHEC O26 of the new clone to lose the *stx*<sub>2a</sub>-harboring bacteriophage [33] might contribute to its evolutionary success. The lysogenic state is potentially suicidal because it makes the bacterium prone to lysis by stimuli present in its environment, including the human digestive system. Therefore, the absence of the *stx*-phage might not only increase the adaptability of the pathogens outside the host, but also enable them to avoid lysis in the human gut. Such *stx*-negative EHEC O26 variants then represent suitable targets for lysogenization by *stx*-harboring phages released from other EHEC during infection, which could facilitate emergence of highly virulent EHEC O26. Thus, interconversion between EHEC O26 and their *stx*-negative variants, mediated by recycling *stx*<sub>2a</sub> genes via loss and gain of bacteriophages [33, 34], might abet the emergence of highly pathogenic new clones of EHEC O26. Although a similar scenario has been proposed for the emergence of the EHEC O104:H4 2011 outbreak strain [35], the new EHEC O26 clone and the O104:H4 outbreak strain are clearly distinct pathogens, which share the ability to cause HUS, albeit in different age groups (as shown in the current study) [35].





**Figure 2.** Temporal and geographic distribution of *stx*<sub>2a</sub>-harboring enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O26 belonging to sequence type (ST) 29 (new clone) and other STs (ST21, ST396, ST591, ST1566) in 7 European countries during 1996 to 2012. *A*, Relative proportions of ST29 strains among all *stx*<sub>2a</sub>-harboring EHEC O26 isolates from the 7 countries in different years. *B*, Numbers of ST29 strains (new clone) per year and country. Abbreviation: ST, sequence type.

The distinct virulence potentials of EHEC O26 harboring *stx*<sub>1a</sub> and *stx*<sub>2a</sub>, respectively, offer clinical opportunities. In particular, rapid *stx* genotyping of EHEC O26 isolates from patients with diarrhea might define risk of progression of the disease to HUS and provide a rationale for further management of patients infected with *stx*<sub>2a</sub>-harboring EHEC O26 similarly, as is recommended for patients infected with EHEC O157:H7 [1, 36, 37]. However, because EHEC O26 harboring *stx*<sub>1a</sub> or *stx*<sub>1a</sub> and *stx*<sub>2a</sub> can also cause HUS (Table 2) [5, 7, 17, 22, 25], individual analysis of each particular case based on

clinical parameters is necessary for a final decision about the therapeutic approach. Also, the possibility exists that ex vivo or in-host loss of the *stx*<sub>2a</sub> gene [33, 34] could inappropriately cause an isolate to be categorized as low risk. In this context we wish to note that although we analyzed typical *stx*-harboring EHEC O26, this fact is unlikely to bias our results toward an increased significance of the new clone, because the *stx*<sub>2a</sub> loss, which we observed in our previous studies [33, 34] occurred in EHEC O26 of ST29. Hence, the emerging role of the new clone in HUS might be rather underestimated in our

study. Furthermore, it is unlikely that coinfection with another EHEC, in particular EHEC O157, influenced the disease outcome, specifically HUS development in patients with EHEC O26. Only 5 of 272 patients (1.8%) had an additional EHEC strain (1 of them O157) in their stools, and these strains were equally distributed among patients with HUS (n = 2) and uncomplicated diarrhea (n = 3).

Although therapeutic strategies should primarily rely on the presence of the *stx*<sub>2</sub> genotype as a general risk factor for HUS development, the identification of an EHEC O26 isolate as a member of the new clone is urgent for infection control measures. For this purpose, MLST to determine ST29 is required, in addition to *stx* subtyping. To accelerate the diagnosis of EHEC O26 ST29, we are developing a real-time multiplex PCR for a rapid and specific detection of this pathogen. Importantly, because ST29 strains have no typical antibiotic resistance pattern, this characteristic cannot be used to identify the new clone. It should be kept in mind that although most EHEC O26 isolates in this study were susceptible to a broad spectrum of antimicrobials, these agents are generally not recommended for treatment of patients with confirmed or suspected EHEC infections because there is no credible evidence that antimicrobials avert HUS, and there are considerable data in support of these agents increasing the risk of this adverse outcome [37].

Interannual variation in recovery of strains of the new clone might reflect varying exposure of the population to a source/reservoir of these organisms. Cattle, a major reservoir of EHEC, are also reservoirs for EHEC O26 [25, 38, 39], but EHEC O26 harboring *stx*<sub>2a</sub> only and/or belonging to ST29 have only rarely been isolated from cattle [23, 25, 39]. Moreover, such strains have only rarely been identified in food [23], making the risk analysis for acquiring infections caused by *stx*<sub>2a</sub>-harboring EHEC O26 difficult, although some limited data do suggest a bovine source [23]. Improved knowledge about the source of these infections, requiring a close collaboration between public health agencies, veterinary microbiologists, and food safety authorities should facilitate specific infection prevention practices.

In conclusion, in this largest study analyzing the role of EHEC O26 as a human pathogen, we identified the new EHEC O26 clone first found in Germany in the 1990s as an emerging cause of HUS in Europe. These data should prompt efforts to identify reservoirs and sources of these pathogens and to implement rapid diagnostic approaches for their detection.

## Supplementary Data

Supplementary materials are available at *Clinical Infectious Diseases* online (<http://cid.oxfordjournals.org/>). Supplementary materials consist of data provided by the author that are published to benefit the reader. The

posted materials are not copyedited. The contents of all supplementary data are the sole responsibility of the authors. Questions or messages regarding errors should be addressed to the author.

## Notes

**Acknowledgments.** We thank Phillip I. Tarr (Washington University School of Medicine, St Louis, Missouri) for extensive and fruitful discussion of the manuscript. The skillful technical assistance of Ralph Fischer, Andrea Lagemann, Nadine Brandt, Isabell Höfig, and Ursula Koeckevot is greatly appreciated.

**Financial support.** This work was supported by the EU Network ERA-NET PathoGenoMics II (grant number 0315443), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant number ME3205/2-1), the EU FP7 ANTIGONE (grant number 278976), the Federal Ministry of Education and Research cross-sectional activity PBA-Zoo (grant number 01KI1020), and the Medical Faculty of the University of Münster (grant number BD9817044).

**Potential conflicts of interest.** All authors: No potential conflicts. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

## References

1. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* **2005**; 365:1073–86.
2. Siegler RL. Postdiarrheal Shiga toxin-mediated hemolytic uraemic syndrome. *JAMA* **2003**; 290:1379–81.
3. Gerber A, Karch H, Allerberger F, Verweyen HM, Zimmerhackl LB. Clinical course and the role of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uraemic syndrome in pediatric patients, 1997–2000, in Germany and Austria: a prospective study. *J Infect Dis* **2002**; 186:493–500.
4. Tozzi E, Caprioli A, Minelli F, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with hemolytic uraemic syndrome, Italy, 1988–2000. *Emerg Infect Dis* **2003**; 9:106–8.
5. Ethelberg S, Olsen KE, Scheutz F, et al. Virulence factors for hemolytic uraemic syndrome, Denmark. *Emerg Infect Dis* **2004**; 10:842–7.
6. Espié E, Grimont F, Mariani-Kurkdjian P, et al. Surveillance of hemolytic uraemic syndrome in children less than 15 years of age, a system to monitor O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in France, 1996–2006. *Pediatr Infect Dis J* **2008**; 27:595–601.
7. Mellmann A, Bielaszewska M, Köck R, et al. Analysis of collection of hemolytic uraemic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* **2008**; 14:1287–90.
8. Käppli U, Hächler H, Giezendanner N, Beutin L, Stephan R. Human infections with non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Switzerland, 2000–2009. *Emerg Infect Dis* **2011**; 17:180–5.
9. Buvens G, De Gheldre Y, Dediste A, et al. Incidence and virulence determinants of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections in the Brussels-Capital Region, Belgium, in 2008–2010. *J Clin Microbiol* **2012**; 50:1336–45.
10. Zimmerhackl LB, Rosales A, Hofer J, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11-associated hemolytic uraemic syndrome: bacteriology and clinical presentation. *Semin Thromb Hemost* **2010**; 36:586–93.
11. Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, et al. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. *J Infect Dis* **2005**; 192:1422–29.
12. Jelacic JK, Damrow T, Chen GS, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. *J Infect Dis* **2003**; 188:719–29.

13. Hedican EB, Medus C, Besser JM, et al. Characteristics of O157 versus non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Minnesota, 2000–2006. *Clin Infect Dis* **2009**; 49:358–64.
14. Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, et al. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathog Dis* **2006**; 3:88–96.
15. Hiroi M, Takahashi N, Harada T, et al. Serotype, Shiga toxin (Stx) type, and antimicrobial resistance of Stx-producing *Escherichia coli* isolated from humans in Shizuoka Prefecture, Japan (2003–2007). *Jpn J Infect Dis* **2012**; 65:198–202.
16. Elliott EJ, Robins-Browne RM, O’Loughlin EV, et al. Nationwide study of haemolytic uremic syndrome: clinical, microbiological, and epidemiological features. *Arch Dis Child* **2001**; 85:125–31.
17. Pollock KG, Bhojani S, Beattie TJ, et al. Highly virulent *Escherichia coli* O26, Scotland. *Emerg Infect Dis* **2011**; 17:1777–9.
18. Zieg J, Dusek J, Marejkova M, et al. Fatal case of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome with severe neurologic involvement. *Pediatr Int* **2012**; 54:166–7.
19. Rosales A, Hofer J, Zimmerhackl LB, et al. Need for long-term follow-up in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-associated hemolytic uremic syndrome due to late-emerging sequelae. *Clin Infect Dis* **2012**; 54:1413–21.
20. Scheutz F, Teel LD, Beutin L, et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol* **2012**; 50:2951–63.
21. Ethelberg S, Smith B, Torpdahl M, et al. Outbreak of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection from consumption of beef sausage. *Clin Infect Dis* **2009**; 48:e78–81.
22. Zhang WL, Bielaszewska M, Liesegang A, et al. Molecular characteristics and epidemiological significance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains. *J Clin Microbiol* **2000**; 38:2134–40.
23. Allerberger F, Friedrich AW, Grif K, et al. Hemolytic-uremic syndrome associated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H infection and consumption of unpasteurized cow’s milk. *Int J Infect Dis* **2003**; 7:42–5.
24. Sobieszkańska BM, Gryko R, Malek CW. Isolation of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* O26 in Poland. *Clin Microbiol Infect* **2000**; 6:227–9.
25. Chase-Topping ME, Rosser T, Allison LJ, et al. Pathogenic potential to humans of bovine *Escherichia coli* O26, Scotland. *Emerg Infect Dis* **2012**; 18:439–48.
26. Bielaszewska M, Friedrich AW, Aldick T, Schürk-Bulgrin R, Karch H. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clin Infect Dis* **2006**; 43:1160–7.
27. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis* **2006**; 3:59–67.
28. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST MIC and Zone diameter breakpoint tables, **2012**. Available at: [http://www.eucast.org/antimicrobial\\_susceptibility\\_testing/breakpoints/](http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/breakpoints/). Accessed 22 October 2012.
29. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method, **2012**. Available at: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/Manual\\_v\\_2.1\\_EUCAST\\_Disk\\_Test.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Manual_v_2.1_EUCAST_Disk_Test.pdf). Accessed 22 October 2012.
30. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA Journal* **2011**; 9:2090. Available at: <http://www.efsa.europa.eu/efsajournal>. Accessed 15 January 2013.
31. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal* **2012**; 10:2597. Available at: <http://www.efsa.europa.eu/efsajournal>. Accessed 15 January 2013.
32. Registrato Italiano della Sindrome Emolitico-Uremica. Situazione epidemiologica della SEU in Italia. Available at: <http://www.iss.it/seu/ital/cont.php?id=15&lang=1&tipo=15>. Accessed 18 January 2013.
33. Bielaszewska M, Prager R, Köck R, et al. Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. *Appl Environ Microbiol* **2007**; 73:3144–50.
34. Mellmann A, Bielaszewska M, Karch H. Intrahost genome alterations in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Gastroenterology* **2009**; 136:1925–38.
35. Frank C, Werber D, Cramer JP, et al. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med* **2011**; 365:1771–80.
36. Hickey CA, Beattie TJ, Cowieson J, et al. Early volume expansion during diarrhea and relative nephroprotection during subsequent hemolytic uremic syndrome. *Arch Pediatr Adolesc Med* **2011**; 165:884–9.
37. Wong CS, Mooney JC, Brandt JR, et al. Risk factors for the hemolytic uremic syndrome in children infected with *Escherichia coli* O157:H7: a multivariable analysis. *Clin Infect Dis* **2012**; 55:33–41.
38. Geue L, Klare S, Schnick C, Mintel B, Meyer K, Conraths FJ. Analysis of the clonal relationship of serotype O26:H11 enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolates from cattle. *Appl Environ Microbiol* **2009**; 75:6947–53.
39. Blanco M, Blanco JE, Mora A, et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-ζ). *J Clin Microbiol* **2004**; 42:645–51.