

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2012

Marie Benešová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko - technologická
Katedra analytické chemie

Taxonomické zařazení rodu *Shigella*

Marie Benešová

Bakalářská práce

2012

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology
Department of Analytical Chemistry

Taxonomic evaluation of *Shigella* genus

Marie Benešová

Bachelor thesis

2012

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Marie Benešová**
Osobní číslo: **C09549**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Taxonomické zařazení rodu *Shigella***
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Popište taxonomické zařazení rodu *Shigella* z hlediska posledních taxonomických studií. Věnujte se příbuznosti rodu *Escherichia* a *Shigella*.
2. Stručně popište metody analýzy nukleových kyselin používané v taxonomických studiích.
3. Zhodnoťte jejich výhody v porovnání s kultivačními a biochemickými technikami.


Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. února 2012**
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. června 2012**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2012

Prohlášení:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladu, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 17. 6. 2012

.....
Marie Benešová

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat Ing. Marcele Pejchalové, Ph.D za odborné vedení, pomoc a cenné rady při vypracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům za umožnění studia na Univerzitě Pardubice a za jejich podporu v jeho průběhu.

Souhrn

Bakalářská práce je zaměřena na taxonomické zařazení rodu *Shigella*. Popisuje historii rodů *Escherichia* a *Shigella*. Porovnává rod *Shigella* s rodem *Escherichia* z hlediska biochemických a sérologických rozlišení. Dále se zabývá klinickými projevy, patogenezí *shigellosis* a její epidemiologickou situací ve světě a v České Republice.

Na závěr se práce zaměřuje na metody analýzy nukleových kyselin používaných v taxonomických studiích a srovnává je s kultivačními a biologickými technikami.

Klíčová slova: *Shigella*, *Escherichia*, *shigellosis*, molekulárně - biologické metody

Summary

Bachelor thesis is focused on the taxonomic evaluation of *Shigella* genus. The outset describes the history of the genus *Escherichia* and *Shigella* and compares the *Shigella* genus to the genus *Escherichia* in terms of biochemical and serological resolution. It deals also with clinical manifestations, pathogenesis of *shigellosis* and it's epidemiological situation in the world and in the Czech Republic.

The final part focuses on methods of analysis of nucleic acids used in taxonomic studies and compares them with the culture and biological techniques.

Key word: *Shigella*, *Escherichia*, *shigellosis*, molecular - biological methods

Zkratky

DNA – deoxyribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

Mb – megabáze

kb – kilobáze

Da – dalton

G + C – guanin + cytosin

ORFS – otevřený čtecí rámeček

EIES – enterovazivní *E. coli*

EHEC – enterohemoragická *E. coli*

STEC – shigatoxigenní *E. coli*

HUS – hemolyticko - uremický syndrom

VTEC – verotoxin - produčující *E. coli*

EPEC – enteropatogenní *E. coli*

ETEC – enterotoxigenní *E. coli*

DAEC – difúzně adherentní *E. coli*

EAggEC – enteroagregativní *E. coli*

LDC – lysin dekarboxyláza

MDH – malát dehydrogenáza

IS – inzerční sekvence

LT – tepelně labilní toxin

ST – tepelně stabilní toxin

VT – verotoxin

Stx1 – Shiga toxin 1

Stx2 – Shiga toxin 2

TTSS - secretion system type III

ONPG – ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranosid

PMN – polymorfonukleární buňky

tRNA – transferová RNA

PCR – polymerázová řetězová reakce

MLEE – multilokusová enzymová elektroforéza

RAPD – radon amplified polymorphic DNA

RFLP – restrikční analýza DNA

PPD – čistý derivovaný protein

IMS – immunomagnetická separace

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

PMN – polymorfonukleární granulocyty

PAI – ostrovy patogenity

GTR – glutamyl tRNA reduktasa

dsDNA – double - strand DNA

ssDNA - single-strand DNA

Obsah

1	Úvod	13
2	Historie	14
2.1	Historie rodu <i>Escherichia</i>	14
2.2	Historie rodu <i>Shigella</i>	16
3	Biochemické a sérologické rozlišení	18
3.1	O antigen	20
3.2	Chromozon <i>Shigella</i>	21
3.3	Toxiny	22
3.3.1	Toxiny <i>Shigella</i>	22
3.3.1.1	Shiga toxin produkovaný <i>Shigella dysenteriae 1</i>	22
3.3.1.2	Shiga toxin v jiných kmenech <i>shigella</i>	23
3.3.1.3	Další <i>shigella</i> toxiny	23
3.3.2	Toxiny <i>Escherichia</i>	23
3.3.2.1	Enterotoxigenní kmeny <i>Escherichia coli</i>	24
3.3.2.2	Verotoxin produkovaný kmeny <i>Escherichia coli</i>	24
3.4	<i>Shigella boydii</i>	24
3.5	<i>Shigella dysenteriae</i>	25
3.6	<i>Shigella flexneri</i>	25
3.7	<i>Shigella sonnei</i>	25
3.8	<i>Escherichia coli</i>	26
4	Patogeneze	26
4.1	Bakteriální determinanty patogenity	28
4.2	Chromozomální ostrovy patogenity a černé díry genomové sekvence	28
4.3	Invaze a zánětlivé zničení epitelální bariéry	29
5	Klinické projevy	29

6	Epidemiologie.....	31
6.1	Epidemiologický výskyt <i>Shigellosis</i> ve světě.....	32
6.2	Epidemiologická situace v České republice	34
7	Laboratorní diagnostika.....	35
7.1	Blot test k identifikaci EIEC a <i>Shigella</i> ze vzorků vody	37
7.2	ELISA (Enzyme - Linked Immuno Sorbent Assay).....	37
7.3	IMS (Immunomagnetická separace).....	38
7.4	PCR (Polymerase Chain Reaction).....	38
7.4.1	Duplexní real-time PCR	39
7.4.2	Metoda RAPD (radon amplified polymorphic DNA).....	39
7.5	MLEE (multilokusová enzymová elektroforéza).....	40
7.6	Ribotypizace	40
7.7	DNA-DNA hybridizace	40
7.8	RFLP (restrikční analýza DNA)	41
8	Závěr.....	42
9	Použitá literatura.....	43

1 Úvod

Shigella je gramnegativní, nesporující tyčinkovitá bakterie, která patří mezi *Enterobacteriaceae*. Způsobuje onemocnění *shigellosis* (úplavici). *Shigellosis* je závažné onemocnění, které může mít za následek i smrt. Nejvíce se vyskytuje v rozvojových zemích, kde jsou špatné hygienické podmínky. V posledních letech je *Shigella* spojována s rodem *Escherichia*. Z tohoto důvodu se tato práce zaměřuje na taxonomické zařazení rodu *shigella*.

Pro správné taxonomické zařazení rodu *Shigella* a rodu *Escherichia* je nezbytné se zaměřit na historii těchto rodů. Dále je potřeba věnovat se biologickému a sérologickému rozlišení rodu *Shigella* a rodu *Escherichia*, tyto rozlišení mají vliv na jejich virulenci a také poukazují na příbuznost těchto rodů. Jedny z hlavních znaků virulence jsou toxiny a O antigen.

Patogeneze popisuje způsob průniku *shigella* nebo enterovasiní *Escherichia coli* do buněk a způsob vzniku onemocnění *shigellosis*. Klinické projevy se zaměřují na vliv *shigella* na organismus člověka či zvířat. Tyto projevy se liší podle věku a pohlaví napadeného organismu. Počtem případů a místem výskytu *shigellosis* či některých jiných onemocnění způsobených *shigella* nebo enterovasiní *E. coli* se zabývá epidemiologie.

Aby se dalo zabránit případným epidemiím, které způsobují rody *Shigella* a *Escherichia*, je potřeba stále pozorovat tyto mikroorganismy. Ke správné identifikaci těchto dvou rodů jsou zapotřebí vespělé laboratorní techniky, z tohoto důvodu se závěr této práce zabývá těmito technikami a porovnává je mezi sebou.

2 Historie

2.1 Historie rodu *Escherichia*

Escherichia coli byla prvně izolována v roce 1885 ze stolice dítěte pediatrem Theodorem Escherichiem. O deset let později byla popsána jako *Bacillus coli*. Pojmenování *Escherichia* dostala po svém objeviteli. *Escherichia coli* se stala typickým zástupcem rodu *Echerichia* [1].

Escherichia coli a její kmeny jsou běžnou součástí gastrointestinálního traktu, především sliznice tlustého střeva člověka i všech savců [2]. Pro člověka je velmi důležitá nejen tvorbou řady prospěšných látek, které brání rozšíření patogenních bakterií, ale i tvorbou některých vitamínů (například vitamínu K) [1]. Patří mezi komenzály, ale může u ní docházet k značné genetické heterogenitě a k výskytu klonů způsobujících gastrointestinální infekci, infekci močových cest nebo novorozeneckou meningitidu. Je to tedy geneticky nesourodý taxon, jehož případná patogenita či prospěšnost se vztahuje ke konkrétnímu kmenu a ne k druhu.

Dalším popsaným zástupcem po *E. coli* byla „*Escherichia adecarboxylata*“. Druhové jméno vyjadřuje bez dekarboxylázovou aktivitu, má tedy negativní lysin, ornitin a arginin. Po molekulárně genetické analýze byla zjištěna chybná klasifikace tohoto kmene a japonští mikrobiologové ji ustanovili jako *Leclercia adecarboxylata*, jméno dostala po francouzském bakteriologovi H. Leclerci, který první popsal tuto bakterii.

V roce 1973 popsali mikrobiologové třetí *Escherichia* „*Escherichia blatce*“, ale stejně jako její předchůdkyně byla také nesprávně zařazena a v roce 2000 byla klasifikována pod názvem *Shimwellia blattae*, na počest J. L. Shimwella, který jako první izoloval *Obesumbacterium proteus* [2].

V časovém rozmezí 1980 – 1990 došlo k velkému rozvoji zařazení čeledi *Enterobacteriaceae*, včetně rodu *Escherichia*. Za pomoci fenotypových charakteristik, DNA reasociace a stanovení obsahu G + C (guaninu + cytosinu) [3]. V blízké době byly popsány tři nové druhy z humánního klinického materiálu. *Escherichia hermannii* byla izolována jako první z těchto tří druhů. Vyskytuje se v humánním klinickém materiálu, př.: rány, plíce, stolice, krev. Další místa výskytu jsou čistírny odpadních vod a bahno. Druhá

objevená bakterie byla *Escherichia vulneris*, která byla prokázána v humánním prostředí. Slovo „*Vulner*“ znamená v češtině „poranění“, vyskytuje se tedy v poraněných končetinách, sputum, krku, krvi, vagině, moči a stolici. O tři roky déle byla popsána *Escherichia fergusonii*, která se nachází ve stolici, moči, krvi, břišním poraněním a u teplotkrevných savců. Pojmenování dostala na počest mikrobiologa Williama W. Fergusona, který jako první poukázal na možnost vlivu *E. coli* u novorozeneckého průjmu.

U těchto tří druhů nebyl použit polyfázový přístup, absence chemotaxonomických dat a fylogenetických údajů ze sekvencování konzervativních genů, z těchto důvodů došlo k špatnému rodovému zařazení. Druhy *E. vulneris* a *E. hermannii* jsou fylogeneticky příbuzné *Citrobacter*. Na rozdíl od nich je *E. fergusonii* nepatogenní zástupce druhu *E. coli*. Tyto tři druhy ještě stále nebyly přeřazeny do jiných taxonomických rodů, i přesto, že byly prokázány výsledky DNA – DNA hybridizace i fylogenetických studií.

Posledním popsáním druhem *Escherichia* je *E. albertii*, která byla získána ze stolice dětí s průjmem. Název *E. albertii* získala na počest svého objevitele M. Johnu Alberta, který jako první popsal tento druh jako původce průjmovitého onemocnění. *Escherichia coli* a *Escherichia albertii* jsou jedinými správně zařazenými a popsány druhy rodu *Escherichia*.

Hlavním zástupcem rodu *Escherichia* je druh *E. coli*, který se vyskytuje ve střevním traktu teplotkrevných savců. Některé kmeny mohou být intestinální i extraintestinální patogeny člověka a zvířat [2]. *E. coli*, které jsou patogenní ve střevech, se většinou rozdělují do 6 skupin:

1. **EPEC** – enteropatogenní *E. coli* – původci průjmů obvykle u novorozenců a dětí do dvou let.
2. **ETEC** – enterotoxigenní *E. coli* – bakteriální příčina průjmů, které se nejvíce vyskytují v rozvojových zemích a vyvolává „cestovatelské“ průjmy cholerového typu (křeče, zvracení).
3. **EIEC** – enteroinvazivní *E. coli* – způsobuje krvavé průjmy s horečkou šigelového typu, spíše u dospělých.
4. **DAEC** – difúzně adherentní *E. coli* – opět původce „cestovatelských“ vodnatých průjmů se zvracením.
5. **EAggEC** – enteroagregativní *E. coli* – patogen, který má za následek „cestovatelské“ vodnaté průjmy bez zvracení a dlouhotrvající průjmová onemocnění nejčastěji u dětí

z rozvojových zemí, kde jsou špatné hygienické podmínky. Přenáší se hlavně orálně - fekální cestou

6. STEC – shigatoxigenní *E. coli* [1]. Patří mezi nejzávažnější kmeny s faktory virulence, které vyvolávají střevní potíže. Pojmenování získaly z toho důvodu, že jejich toxin je velmi podobný Shiga toxinu, který produkuje *Shigella dysenteriae*. STEC mohou vytvářet další faktory virulence, jako jsou intimin a hemolyzin. Intimin má vliv na těsnou vazbu bakterií na enterocyty tlustého střeva. Mohou vyvolávat hemoragickou kolitidu s krvácením ve střevech, potom jsou označovány jako EHEC (enterohemoragické *E. coli*) a patří do podskupiny STEC [4]. Důležité pro EHEC je nízká infekční dávka. Stejně jako u *Shigella* se u některých sérotypů udává minimální hodnota 10 – 100 bakterií potřebných ke vzniku infekce. Přenos je nejčastěji potravinami (dostatečně tepelně neopracovaným masem, mlékem, zeleninou nebo kontaminovanou pitnou vodou). Přenáší se i z člověka na člověka (při nedodržování pravidel hygieny) [1]. Hemoragická kolitida může v horším případě přejít do hemolytického – uremického syndromu (HUS). HUS je velmi těžké onemocnění, hlavní tři příznaky jsou: mikroangiopatická anémie, snížený počet trombocytů a akutní postižení ledvin. *Escherichia coli* O157:H7 patří k hlavním zástupcům enterohemoragických *E. coli*, způsobující HUS. *E. coli* O157:H7 je dominantním, ale zdaleka ne jediným sérotypem, který je popisován jako původce HUS. Hlavním rezervoárem kmenů *E. coli* O157:H7 je dobytek, ovce, kozy, prasata a drůbež [5].

Tyto fenotypově odlišné *E. coli* jsou biochemicky skoro stejné jako *Shigella*. To vede ke špatnému zařazení taxonů i při použití sérologických testů [2].

2.2 Historie rodu *Shigella*

Chantemesse a Widal v roce 1888 ve Francii a Ogata v roce 1892 v Japonsku, byli první, kdo popsali etiologického bacilárního původce úplavice. Problémy s izolací kultury *Shigella* ze stolice bránily ke konečnému určení totožnosti. Úspěšně izolovat a identifikovat bakterii se povedlo až v roce 1898 japonskému mikrobiologovi Kiyoshi Shiga [6]. Shiga pojmenoval organismu jako *Bacillus dysenteriae*. Následovala rozsáhlá studie, s izolací různých biotypů a sérologických forem. V roce 1919 dali Castellani a Chalmers tomu to rodu bakterií jméno *Shigella* na počest jeho objevitele. Dnes je tedy bakterii známá pod názvem *Shigella dysenteriae*. Do roku 1918 byla některá uskupení odlišná. V roce 1929 Boyd izoloval a popsal v Indii prvních šest sérotypů [7].

Castellani a Chalmers se snažili odlišit bacilárního původce úplavice od právě nalezeného rodu *Escherichia* a druhu *Escherichia coli* [3]. V roce 1940 byl oficiálně uznán nový rod se čtyřmi druhy *Shigella*. Tím, že kmeny *Shigella* dostaly jiné rodové jméno, se rozlišily patogenní formy od nepatogenního *Bacillus* (nyní *Escherichia*) *coli*. Přesto, v roce 1944, byly popsány patogenní formy i u *E. coli* a některé z nich byly uznány. EIEC byla poprvé popsána v roce 1944, byla nazvána jako "*paracolon bacil*", ale její kmen byl později identifikován jako *E. coli* O124 [7].

Shigella nebyla zařazena k *Escherichia coli* z důvodu fenotypových rozdílů, jako je motilita nebo nezkvašování laktózy *Shigella*. Teprve v roce 1971 byly poprvé popsány invazivní kmeny *E. coli*, které mohou způsobovat *shigellosis* [8]. Na základě DNA - DNA hybridizačních studií bylo zjištěno, že kmeny *E. coli* a *Shigella* spolu souvisí na tolik, aby mohly být považovány za jeden druh. Nicméně pro historické, praktické a patofyziologické důvody jsou považovány za samostatné druhy [9]. Z podobných důvodů, se *Shigella* dokonce rozdělila do čtyř druhů: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* a *Shigella sonnei*. Tyto čtyři druhy se ve skutečnosti skládají jen ze čtyř podskupin, které se liší podle klíčových biochemických a sérologických znaků [6]. Pro duhové označení *Shigella* se také používají názvy podskupin A, B, C, D, které mohou poukazovat na nedostatek důvěry v jejich druhovém označení [7].

Podle Georgiades a Raoulta se *Shigella* vyvinula z *E. coli*, díky masivním ztrátám některých z vnitřních oblastí chromozómu, což způsobilo větší virulenci. Dalším faktorem zvyšující virulenci jsou plazmidy nesoucí kritické geny. Každý druh *Shigella* je tedy sérovar patogenních klonů *E. coli* [6].

Genetické identity *Shigella* a *E. coli* jsou spojeny s velkou virulencí plazmidu [10], který kóduje invazivní fenotyp. Dále tyto identity ovlivňují absenci nebo změnou určitého počtu chromozomálních genů (černých děr), na nichž jsou kódovány lysin dekarboxyláza (LDC), beta-galaktosidáza a bičíky. Tyto genetické rozdíly se projevují přítomností nebo nepřítomností určitého množství metabolických ukazatelů, které se běžně používají pro diagnostické účely v klinických laboratořích [6].

Podle historických údajů by se měla *Shigella* jmenovat podle *E. coli*, protože *E. coli* byla objevena dřív. Dalo by se tedy říct, že označení „*Shigella*“ je nesprávné [2].

Genetický profil kmene *Shigella*, jak ho známe dnes, je do značné míry stále stejný jako v roce 1958 [11].

3 Biochemické a sérologické rozlišení

Shigella je fakultativně anaerobní, intracelulární, gramnegativní, nesporující tyčinkovitá bakterie [12]. Patří mezi *Enterobacteriaceae*. Všechny *Shigella* sérotypy jsou enterovazivní, o čemž svědčí jejich schopnost způsobovat experimentální zánět spojivek v očích morčat a napadat střevní sliznici člověka, kde způsobují průjemový syndrom známý jako úplavice. Na základě fenotypových znaků byly uznány čtyři specifické druhy *Shigella* a to: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* a *S. sonnei* [11]. Na rozdíl od klasických znaků popsaných u *E. coli* jsou nepohyblivé, nevytvářejí plyny ze sacharidů (s výjimkou některých biotypů *Shigella flexneri* 6), dekarboxylují lysin nebo hydrolyzují arginin. Indol je většinou negativní [13]. Salicin, adonitol a inositol nejsou fermentovány. *Shigella sonnei* je jediným zástupcem, který fermentuje laktózu při prodloužené inkubaci, jiné druhy nevyužívají tento substrát v tradičním prostředí [7].

Různé studie ukázaly, že kmeny *Shigella* spadají pod *E. coli*, včetně studií využívajících multilokusové enzymatické elektroforézy (MLEE), ribotypizace, kombinace MLEE a sekvence genů malát dehydrogenázy (MDH). Evoluční vztahy všech 46 sérotypů *Shigella* byly objasněny pomocí analýzy změnou sekvencí v osmi housekeeping genech. Tato analýza poukázala na to, že většinu sérotypů lze rozdělit do tří skupin uvnitř *E. coli*. Skupiny zahrnují všechny kmeny z různých podskupin a každá z těchto skupin představuje velmi úspěšný klon patogenní *E. coli*, který se rozvinul z některých biochemických a významných antigenních rozmanitostí [6].

Na přelomu padesátých a šedesátých let bylo zjištěno, že *E. coli* izolovaná od pacientů s úplavicí byla také schopná způsobit experimentální zánět spojivek v očích morčat. Tyto kmeny *E. coli* byly zařazeny pod mnoha různými jmény, jako je *Shigella manolovi*, *S. Sofie*, *S. metadysenteriae*, atd. V poslední době byly všechny označeny jako enteroinvasivní *E. coli* (EIEC) a toto jméno bylo přijato universálně. EIEC odpovídá biosérotypu séroskupiny *E. coli*. Je všeobecně přijato, že EIEC bakterie jsou velmi podobné nebo totožné s rodem *Shigella*, a to i s ohledem na jejich mechanismus virulence. Některé EIEC mají stejný O antigen jako *Shigella*, ale mají vyšší metabolickou aktivitu.

Identifikace patogenních bakterií je velmi důležitá pro epidemiologické studie. V případě EIEC a *Shigella*, je někdy obtížné dosáhnout rozdílu na základě sérologických a biochemických metod [11]. EIEC sdílejí s *Shigella* velký plasmid, který kódují několik vnějších membránových proteinů zapojených do invaze hostitelské buňky. Proteiny mají vliv na invazivitu a také na shigatoxin 2 [8].

Postihnout rozdíly v klasifikaci biochemických vlastností a genetických vztahů, můžeme porovnáním „genových“ a fenotypových evolučních stromů. Dodd a Jones použili 102 *Shigella* kmenů k určení taxonomických vztahů na základě 192 morfologických, biochemických a fyziologických charakteristik založených na pomoci numerické metody. V této studii fenotypu se kmeny *Shigella* dostaly do jedné velké skupiny nejen odlišné od *E. coli*, ale byly více příbuzné s *Yersinia* a *Proteus / Providencia* než s *E. coli*, která jinak poskytovala plnou podporu pro tradiční dělení rodu *Shigella*. Přesvědčení, že důvodem pro tuto nesrovnalost ve dvou studiích spočívá v použití písma pro numerické taxonomie z dřívější studie [6].

Ve skupinách, které jsou obtížně odlišitelné od *E. coli*, jako například *Shigella*, je třeba k diagnóze najít prostředky pro odlišení dvou znaků. Literatura je silně zkreslená ve prospěch těch vztahů, které podporují přednostní taxonomii. Uznání této zaujatosti je důležité, protože za těchto okolností mohou biochemické profily dávat špatné údaje o taxonomickém postavení.

Druhy *Shigella* jsou dále rozděleny podle jejich sérologického O antigenu do sérotypů. Poměrně málo biochemických vlastností se používá pro identifikaci druhu, využívá se především zkvašování mannitolu a dekarboxylace ornithinu. Často je zahrnována i produkce indolu, ale absolutně rozlišit čtyři druhy neumožňuje. Žádné biochemické vlastnosti nemohou rozlišit dva druhy a proto je O sérotypizace nezbytná pro diferenciaci i na úrovni druhu.

Nyní je uznáno čtyřicet šest *Shigella* sérotypů. *Boydii*, *dysenteriae* a *flexneri* mohou mít 18, 13 a 6 sérotypů příslušných, zatímco *sonnei* má pouze jeden sérotyp. Pokud však budeme používat současné pokyny uplatňující formálně *S. enterica* a obecně v praxi *E. coli*, potom bude pouze 33 sérotypů. Je to ovlivněno tím, že mnohé varianty vznikají vnesením fága do *E. coli*, k tomu však může docházet pouze u nekompletních sérotypových stavů [7].

3.1 O antigen

Shigella kmeny jsou ve zvláštním režimu patogeny *Escherichia coli*, 18 z 34 O antigenů se nachází v tradiční *E. coli*. Tři jsou velmi podobné *E. coli* O antigenu a 13 jich je jedinečných pro *Shigella* kmeny. O antigen *Shigella sonnei* je atypický pro *E. coli*. Ostatních 12 antigenů O, které jsou jedinečné pro *Shigella* kmeny, mají struktury typické pro *E. coli*, ale podstatně větší anomálií jsou jejich geny v shluku, pravděpodobně odráží změnu struktury. Kompletní sady struktury a genů mají vliv na rozmanitost v patogenitě a otevírají cestu pro experimentální studie.

Většina O antigenů jsou heteropolysacharidy postavené z lineárních nebo rozvětvených tri-hexasacharidových O jednotek. Cukr složený z *Shigella* O antigenů, je spíše typický pro střevní bakterie. Každý O antigen obsahuje jeden nebo oba N-acetyl-D-glukosamin a N-acetyl-D-galactosamin. Další typické cukry jsou L-ramnosy a D-glukóza.

O antigen obsahuje mnoho oligosacharidových jednotek (O jednotek), které jsou součástí lipopolysacharidů. Ty se vyskytují ve vnější membráně gramnegativních bakterií. Lipopolysacharid patří mezi nejvíce variabilní složky buňky, jelikož antigen O obsahuje rozdílné druhy cukrů a současně i jiné uspořádání uvnitř O jednotek a vazeb uvnitř a mezi O jednotkami. Variabilitou antigenů O se stanovuje hlavní základ sérotypového schématu pro mnoho gram-negativních bakterií a výhradně se používá pro antigen *Shigella*, které jsou závažnými patogeny, pokud chybí H a K antigeny jsou rovněž použity u *Escherichia coli*.

O antigen je vystavěný na povrchu buněk. Je vysoce imunogenní a také se používá jako receptor u některých bakteriofágů, které se mohou podílet na udržení rozmanitosti přerušením výběru proti specifické formě O antigenu. Rozmanitost O antigenů rovněž umožňuje variability klonů a změny v povrchových strukturách, které nabízejí selektivní výhodu u jejich konkrétního výklenku. Některé formy O antigenů jsou nadměrně zastoupeny u patogenních klonů, které také naznačují, že specifické O antigeny přispívají k adaptaci na tomto výklenku.

O antigen je důležitým faktorem virulence a ztráta O antigenů u mnoha patogenů citlivých na sérum může vážně narušit virulenci. Přířímými důkazy v případě *E. coli* O1, O7 a O18 jsou rozdíly v O antigenu, které vysvětlují odlišné vlastnosti patogenity. Bylo prokázáno, že virulence *Shigella flexneri* se snižuje, pokud je změněn O antigen. Kompletní

ztráta O antigenu ovlivňuje citlivost séra, poruchy intracelulární replikace a oslabuje virulenci.

Geny podílející se na syntéze antigen O, se zařazují do tří hlavních tříd: 1) nukleotidové geny pro syntézu cukrů, 2) geny pro přenos cukrů, 3) O jednotka zpracována geny, které kódují flippazu a polymerázu.

Pokud geny obsahují cukry transferázu, flippazu nebo polymerázu jsou obvykle specifické pro každý jednotlivý shluk O antigenu a mají potenciál pro použití v PCR testech založených na rychlé identifikace a detekci příslušných kmenů. Konvenční O-sérotypizace *E. coli* a *Shigella* kmenů podle aglutinační reakce pomocí antiséra je pracná, časově náročná a není praktická pro analýzu velkého množství vzorků. O sérotypizace trpí také sérologickou křížovou reakcí, která dává neurčitý výsledek. Přítomné surové kmeny totiž neprodukují O antigen. Na základě DNA metody, která je založená na specifických genech antigenu O, lze překonat tyto problémy. Bylo prokázáno, že DNA metody jsou spolehlivé, rychlé a citlivé pro detekci příslušných kmenů z klinických, potravinářských a environmentálních vzorků. Pomocí vyvinutého DNA čipu, který se zaměřuje na O-sérotypizaci specifických genů pro detekci všech různých forem antigenů O *Shigella*, se mohou používat lepší alternativy k tradiční sérotypizaci.

Existuje pět *Shigella* serovarů, které představují nezávislé linie v *E. coli*, takže celkový obraz pro *E. coli* jsou různorodé druhy s několika patogenními formami, z kterých se většina kmenů *Shigella* dělí do tří skupin. *S. dysenteriae* typ 1, 8 a 10, *S. boydii* 13 a *S. sonnei* jsou izolovány v rámci klonů *E. coli* [14].

3.2 Chromozon *Shigella*

Celý chromozom se skládá ze 4 607 203 bp, na které se musí připojit 221 618 bp virulujících plasmidů. *Shigella* podobně jako *E. coli* obsahuje v chromozomu 48 – 53 % guaninu a cytosinu. Genom *Shigella flexneri* sérotypu 2a byl sekvencován teprve nedávno. Chromozóm má velikost 4,16 Mb podobně jako chromozom *E. coli* K12. Z 3 235 otevřených čtecích rámců (ORF) má shodných 3 030 s *E. coli* K12 a 2 911 s *E. coli* O157: H7 [2]. Chromozom *Shigella*, i přesto, že je velmi podobný velikostí a genovým složením chromozonu *E. coli* K12, se vyznačuje několika originálními prvky, jako je přítomnost mimořádného počtu zavedených sekvencí (má 314 inzerčních sekvenčních elementů, to je 7 krát více než u *E. coli* K12), 13 případů translokací a inverzí k zapojení segmentu většího

než 5 kB, přičemž většina z nich se týká odstranění nebo získání DNA sekvence [6]. Srovnání těchto dvou kmenů *E. coli* a *Shigella flexneri* představuje genomovou identitu. Je to, ale zcela nepostačující pro přesné definování druhu [2].

S. flexneri se vyznačuje přítomností stovek pseudogenů, jejich inaktivace způsobuje různé příčiny, jako je zavedení stop kodonů, rámcové posunové mutace, zkracování a integrace vkládaných sekvencí. Tato masivní ztráta genové integrity tvoří masivní ztrátu metabolických funkcí, které jsou typické pro *Shigella*. To dokládá fakt, že evoluční proces, který vedla *E. coli*, aby se stala *Shigella*, se vyznačuje nejen získáním genů a patogenických ostrovů, ale také ztrátou genů [6].

3.3 Toxiny

3.3.1 Toxiny *Shigella*

Přestože invazivnost je hlavním faktorem virulence všech čtyř *Shigella* druhů, některá pozorování podnítila diskusi o zapojení toxinu. U některých pacientů, infekce nezpůsobila typickou úplavici, ale jen středně vodnatý průjem. K podobně vodnatému průjmu může také docházet v raných fázích klasické úplavice. V některých pokusech se *S. flexneri* 2a, kmen M4243, vyvinul u některých opic v průjem a ne v úplavici. Tato zvířata byla vystavena čisté sekreci do lačnicku, *Shigella* byla nalezena ve vnitřní části, ačkoli tam nedošlo k žádné bakteriální infekci ani k histologickému poškození. Střevní buňky nejsou citlivé na vnější toxiny, ale toxin, který působí intracelulárně, může způsobit zánět tlustého střeva. Při infekci kmeny *Shigella*, zejména pak *S. dysenteriae* 1, mohou způsobit komplikace tím, že napadají jiné tkáně, což je nejspíš způsobeno cirkulací toxin [14].

3.3.1.1 Shiga toxin produkováný *Shigella dysenteriae* 1

Infekce *S. dysenteriae* 1 je vážnější než ta způsobená jinými kmeny *Shigella*. Může to být způsobeno vysoce účinným toxinem u těchto kmenů tzv. Shiga toxinem [4]. Shiga toxin je silně cytotoxický, má schopnost blokovat biosyntézu bílkovin, ačkoli existuje alternativní příčina smrti buněk [14]. Shiga toxin byl původně rozpoznán jako neurotoxický, způsobuje paralýzu a smrt při intravenózním podáním u myši a králíků. Později bylo prokázáno, že pro některé primáty jsou cytotoxické, rostou v buněčných liniích v tkáňové kultuře. Toxin vykazuje enterotoxickou činnost. Po analýze toxinu se potvrdila neurotoxická, cytotoxická a enterotoxická činnost, která byla způsobena jediným

tepelně labilním proteinem. Shiga toxin inhibuje syntézu proteinů v kultivovaných buňkách. Shiga toxin je proteinový komplex z jedné podjednotky A s molekulovou hmotností 32000 Da a nejméně z pěti B podjednotek. Podjednotka B má molekulovou hmotnost 7600 Da a je pravděpodobně zapojena do navázání toxinu na nejméně dva různé receptory [4]. Shiga toxin 1 (*Stx1*) nese enzymatickou aktivitu Shiga toxinu, zatímco Shiga toxin 2 (*Stx2*) zprostředkovává vazby na svém receptoru. Dosud nebylo přesvědčivě prokázáno, že Shiga toxin postihuje střevní epitelové buňky a vyvolává průjem [14].

3.3.1.2 Shiga toxin v jiných kmenech *shigella*

První studie patogenity kmenů *Shigella* uznala, že *S. dysenteriae* 1 může způsobit nejzávažnější onemocnění. U případů, kde byly testovány *S. jexneri* a *S. sonnei*, byl zjištěn cytotoxin, který neutralizuje antisérum toxinu Shiga. Shiga toxin byl pomocí neutralizačních protilátek prokázán u pacientů s infekcí, která byla způsobena *S. Jexneri* nebo *S. sonnei*. Jsou stále potřebné další studie ke zjištění, zda napětí jiné než u *S. dysenteriae* 1 skutečně produkuje Shiga toxin. *Shigellas* mohou být rozděleny do tří skupin, u kterých mohou být pozorovány patogenní vlastnosti. První jsou kmeny *S. dysenteriae* 1, které jsou invazivní a produkují vysoké hladiny toxinů Shiga. Druhé jsou jiné kmeny *shigella*, které jsou invazivní, ale neprodukují vysoké množství jedu, a za třetí to jsou verotoxin - produkující *E. coli* (VTEC), které produkují vysoké hladiny cytotoxinu, ale nejsou invazivní.

3.3.1.3 Další *shigella* toxiny

Jiné studie naznačují, že *shigellosis* může způsobit cytotoxin odlišný od toxinu Shiga. Pro 106 kmenů *S. sonnei*, *S. fexneri*, *S. boydii* a *S. dysenteriae* 2 nebo 3, byla aktivita minimálně 1000 - krát nižší než u kmenů *S. dysenteriae* 1. Kromě toho u 88 kmenů nebyl neutralizován anti-Shiga toxin a u 18 byl neutralizován jen částečně. Toxin 119s ukázal značné rozdíly mezi činností čistého derivovaného proteinu (PPD) toxinu Shiga a buněk bez lyzátu z *S. dysenteriae* 1, z kterého Shiga toxin byl odstraněn. Lyzát také způsobuje středně těžký až těžký zánět sliznice a nekrózy, zatímco enterocyty Shiga toxinu způsobují jen mírný zánět.

3.3.2 Toxiny *Escherichia*

U toxinů *Escherichia* bylo zjištěno, že některé kmeny *E. coli* produkují cytotoxin velmi podobný jedu produkovaného *Shigella dysenteriae* 1. Mezi členy skupiny

Enterobacteriaceae se řadí čtyři rody, které způsobují střevní infekce, patří sem *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* a *Yersinia*. Produkce toxinu byla hlášena ve všech těchto rodech. Pouze s pomocí alternativních testů bylo zjištěno, že *E. coli* produkuje termolabilní nebo tepelně stabilní enterotoxiny.

3.3.2.1 Enterotoxigenní kmeny *Escherichia coli*

Enterotoxigenní kmeny *E. coli* jsou příčinou průjmu u lidí a mladých zvířat. Virulence je způsobena díky jejich schopnosti produkovat enterotoxin a držet specifické povrchové adheziny, které bakteriím pomáhají kolonizovat střevní epitelové buňky. Byly identifikovány dvě hlavní skupiny enterotoxinů. Jedná se o tepelně labilní toxin (LT), inaktivovaný při 60°C po dobu 30 minut a tepelně stabilní toxin (ST), který je odolný do 100°C po dobu 15 min.

3.3.2.2 Verotoxin produkováný kmeny *Escherichia coli*

Shiga toxin STEC dříve označovaný jako verotoxin (VT) a kmeny, které ho produkují, se nazývají verotoxigenní *E. coli*. VT produkuje kmen H30, který je velmi podobný biologicky a fyzikálně-chemickými vlastnostmi toxinu Shiga a je neutralizován anti-Shiga toxinem. Toxiny se liší aminokyselinovým složením a fyzikálně - chemickými vlastnostmi. STEC jsou spojovány s hemoragickou kolitidou a hemolytickým uremickým syndromem [15]. Shiga toxin je cytotoxin, působí na Vero buňky a má cytopatický účinek. Patří mezi jedny z neúčinnějších látek, které mají vliv na eukaryotické buňky.

Shiga toxin *E. coli* se dělí na dva typy: Shiga toxin 1 a Shiga toxin 2. *Stx1* a *Stx2* mají podobnou biologickou aktivitu a strukturu jako Shiga toxin *Shigella dysenteriae*, z toho důvodu se používá označení Shiga toxin *E. coli*. Kmeny STEC *Stx1* nebo kmeny s kombinací *Stx1* a *Stx2* většinou způsobují jen lehce závažná průjmová onemocnění, závažné onemocnění HUS způsobují převážně kmeny *Stx2*. Zástupcem STEC je kmen *E. coli* O157:H7 [4].

3.4 *Shigella boydii*

Shigella boydii má pozitivní zkvašování mannitolu, ale negativní dekarboxylaci ornitinu, s výjimkou *Boydii* 13, která je pozitivní na ornitin a *Boydii* 14, která nefermentuje mannitol. Některé další sérotypy *Shigella Boydii* mají pozitivní maltosu, negativní sorbitol a pozitivní ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranosid (ONPG) [6]. Onemocněním způsobené *Shigella Boydii* se objevuje jen zřídka [13].

3.5 *Shigella dysenteriae*

S. dysenteriae nefermentuje mannitolu, má negativní dekarboxylaci ornitinu, pozitivní ONPG, negativné indol a katalasu [6]. Způsobuje rychlou a smrtelnou epidemii [13]. Jednoznačná identifikace *S. dysenteriae* je možná bez problémů tím, že se kombinují fenotypové metody s detekcí jeho Shiga toxinu nebo příslušných toxinů [8]. Shiga toxin je hlavní příčinou vysoké virulence *S. dysenteriae* [14]. Detekce *S. dysenteriae* je možná díky metodě PCR, kde se kombinuje *pInv* plazmid a genový toxin *stx1* [8].

3.6 *Shigella flexneri*

S. flexneri je gramnegativní (obr. 1), zkvašuje mannitol, ale má negativní dekarboxylaci ornitinu. Indol je většinou negativní, ale u některých sérotypů je pozitivní [6]. *S. flexneri* je rozdělena do 13 sérotypů [22]. Virulence, které byly popsány v podstatě *S. flexneri*, sérotypu 1, jsou charakterizovány Shiga toxinem, který je silný cytotoxin [14]. *S. flexneri* vykazuje endemickou formu onemocnění ve vyspělých zemích [13].



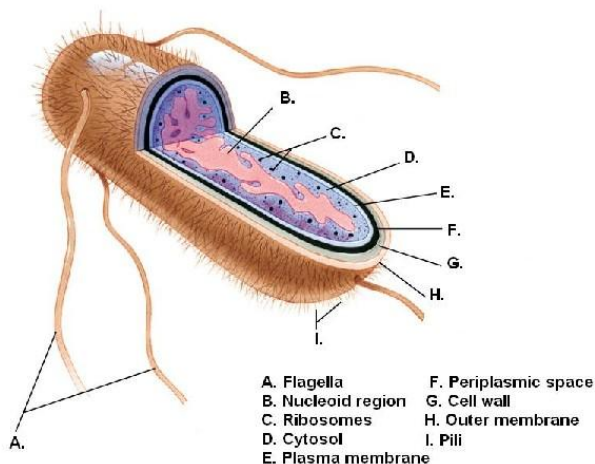
Obr. 1: *Shigella flexneri* [32]

3.7 *Shigella sonnei*

S. sonnei má pozitivní zkvašování mannitolu i dekarboxylaci ornitinu [6]. Pouze *S. sonnei* je schopna pomalu fermentovat laktózu nebo sacharózu [8]. Jako jediný kmen *Shigella* má pouze jeden sérotyp. *Shigella sonnei* tvoří endemické formy onemocnění ve vyspělých zemích stejně jako *S. flexneri* [13]. Specifickou detekcí pomocí PCR lze zjistit *S. sonnei* s využitím IS1 oblasti [8].

3.8 *Escherichia coli*

E. coli je gramnegativní tyčinka (Obr. 2) [1]. Není schopná štěpit sorbitol během 24 hod. [4], má pozitivní fermentaci laktózy, negativní glukuronidázu a pozitivní indol [1]. Nejzávažnější z patogenních *E. coli* jsou ty, které produkují shiga toxin, který způsobuje HUS a hemoragickou kolitidu [5]. *E. coli* je enormně pohyblivá. V sorbitol pozitivní půdě roste v podobě růžových kolonií [1].



Obr. 2: stavba *E. coli* [29]

4 Patogeneze

Bakterie *Shigella* ve střevní sliznici izoluje invazivní fenotyp, který v podstatě odráží schopnost bakterie proniknout do nefagocytické epitelové buňky a šířit se z buňky do buňky. Proces šíření je v korelaci s vývojem silné zánětlivé reakce způsobující prasknutí a zničení epiteliální bariéry. Způsobuje prasknutí, invazi a zničení zánětlivé střevní epiteliální bariéry složitým procesem [16]. Na rozdíl od jiných invazivních patogenů má *Shigella* velmi malou schopnost vázat buňky.

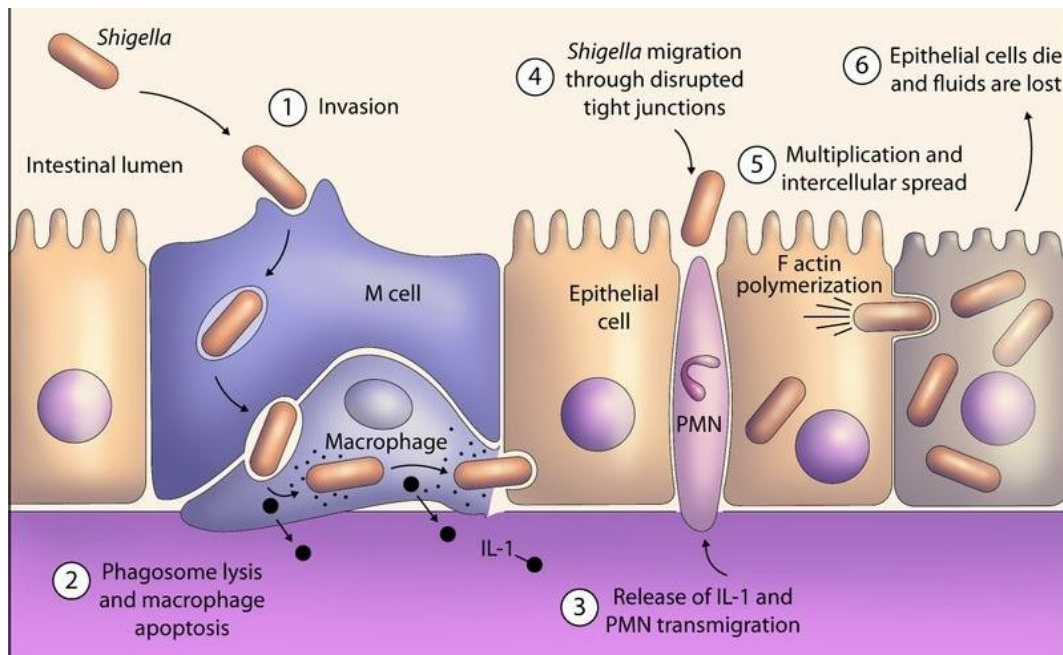
Shigella nemůže napadnout epitelové buňky apikálně, proto napadají M buňky obložené lymfatickým folikulem, což jim umožňuje dostat se na basolaterální pól epiteliálních buněk, a tím vyvolat jejich přijetí [5]. K překročení epiteliální bariéry využívá více invazivních mikroorganismů [16]. Při vstupu buňky do epitelu se přestaví buněčný cytoskelet, ten poskytuje bakteriím styk s buněčnou membránou, což vede k pohlcení této bakterie dovnitř vakuoly [5]. V oblasti lymfatických folikulů jsou fagocytovány makrofágy

a dendritické buňky. *Shigella* zabije makrofágy apoptózou, pak uteče na subepiteliální tkáň a napadá basolaterální epiteliální výstelky. Tato schopnost zabíjet makrofágy a napadat epitelové buňky zcela závisí na TTSS, který je zakódován v 31 kB vstupním regionu v plazmidu virulence *Shigella* [10]. Apoptóza makrofágů *Shigella* umožní fagocytům uniknout a zahájit zánět. V důsledku toho, polymorfonukleární buňky (PMN) proniknout do nakažených buněk a destabilizují epitel. Ruptura soudržnosti epiteliální bariéry umožňuje více bakteriím se přemístit, čímž poskytuje přístup k tolerantní basolaterální straně epitelových buněk [16].

Shigella po vstřebání se do epitelu buňky prochází přes buněčný cytosol do sousedních buněk kde se aktivně hromadí na aktin ocas bakteriálního pole. Vnější membránový protein *IcsA* aktivuje actin polymeraci v hostitelské buňce, protein *IcsA* je lokalizován na bakteriálním pólu [6]. *Shigella* aktin má vliv na pohyblivost v buňkách [16]. Intracelulární bakterie se pohybuje v cytoplazmě infikovaných buněk tím, že actin přeměňuje polymeraci na jednom ze svých pólů. Toto hnutí generuje vznik výstupky, která obsahuje jednu bakterii na své špičce vedle epitelové buňky, a tím umožňuje bakteriím se šířit z buňky do buňky, aniž by byly vystaveny vnějšímu prostředí [10].

Infikované epitelové buňky se prokazují analýzou transkriptomu, zejména zvýšením exprese genu IL-8 a silnými chemoatraktanty neutrofilů. Tím se epitelové buňky aktivně podílejí na odhalování a signalizaci invazivních bakterií k obraně hostitele. Bakterie uvolněné z buněk M (po počáteční absorpci) nebo epitelové buňky (po jeho intracelulární násobení) komunikují s makrofágy, uniknou z fagocytární vakuoly a indukují apoptózu infikovaných buněk [16].

Apoptotické makrofágy patří mezi protizánětlivé cytokiny, včetně IL-1 a IL-18, které spolu s IL-8 propouštějí infikované epitelové buňky a přijímají polymorfonukleární buňky (PMN) v místě infekce. Stěhování PMN destabilizuje epiteliální bariéry a usnadňuje další invaze do lumina bakterií. Při interakci bakterie s hostitelskou buňkou dochází k vrozené adaptivní imunitní odpovědi na infekci (Obr. 3) [5].



Obr. 3: Model patogeneze vyvolaný *Shigella* [31]

4.1 Bakteriální determinanty patogenity

Hlavním virulenčním faktorem *Shigella* je plazmid o velikosti 220 kb, který obsahuje geny potřebné pro buněčnou invazi do epitelu buňky. Tyto geny jsou zakódovány do 31 kb velké oblasti na chromozomálním ostrově patogenity (PAI) a do sekrečního systému typu III (TTSS) [34]. TTSS *Shigella* obsahuje přibližně 20 proteinů, které se shromažďují na vnitřní nebo vnější membráně a rozšiřují ji. Po kontaktu bakterie a hostitelské buňky jsou *IpaB* a *IpaC* inkorporovány do hostitelské membrány, kde tvoří 25 pórů a slouží k přepravě dalších invazivních buněk do buněčné cytoplasmy [6].

4.2 Chromozomální ostrovy patogenity a černé díry genomové sekvence

PAI jsou nezbytné pro vstup bakterií do epitelálních buněk a k aktivaci polymorfonukleárních buněk. Obsahují geny kódující cytoplazmatické chaperony a proteiny, které jsou vylučovány TTSS [6]. Geny, které jsou lokalizovány na chromozomálních ostrovech, se podílejí na patogenezi. Mezi tyto geny patří *sit* geny kódující příjem železa, *sigA* extracelulární proteázy, *gtr* geny kódující proteiny zapojené do glukosylace antigenu O a *stx* geny kódující toxin Shiga [5].

Tyto geny jsou transportovány k makrofágům, ve kterých indukují apoptózu [10]. Tím se uvolní velké množství cytokinů a chemokinů IL-1, které jsou důležité pro vyvolání zánětu a shromáždění PMN buněk v místě infekce. Kromě toho, invaze epiteliálních buněk *Shigella* aktivuje přepis a sekreci IL-8. IL-8 je chemotaktický pro PMN buňky a hraje významnou roli při náboru PMN buněk do zamořené subepiteliální oblasti [13]. IL-8 podporuje přijímání monocytů, které se stěhují přes epiteliální bariéru a usnadňuje tím vstup PMN buněk do lumina bakterie a epitelu, čímž se zvýší invaze epitelu [10].

4.3 Invaze a zánětlivé zničení epiteliální bariéry

Pro akutní zánětlivou odpověď, kterou generuje infekce *Shigella* je charakteristické difuzní zarudnutí s otokem sliznice, krvácením a hlenovitým exsudátem. U pacientů s akutní a rekonvalescentní fází infekce *S. flexneri* a *S. dysenteriae 1* se uvolňují cytokiny a chemokiny, které poškozují tkáň. U závažných onemocnění dochází ke zvýšené produkci cytokinů a chemokinů v IL-1 beta, IL-6, TNF alfa a IFN gamma. IL-1 jsou v podstatě produkovány monocyty/makrofágy, zatímco IL-6 a IL-8 jsou vyráběny epiteliálními buňkami. První krok invaze epitelu tkáň vede přes folikuly k bakteriální fagocytóze makrofágy, následuje apoptotická smrt fagocytů, která je způsobená aktivací Caspase-1. Makrofágová apoptóza také způsobuje uvolnění zánětlivých cytokinů IL-1 beta a IL-18 a zahájí tak zánětlivé kaskády charakteristické pro *shigellosis*.

Střevní epitelové buňky poskytují důležité signály pro zahájení a zesílení akutní zánětlivé odpovědi na sliznici. Z velké části se na začátku interakce vyskytují infikované slizniční lymfatické uzliny, masivní infiltrací mononukleárních a polymorfonukleárních buněk (PMN) se narušuje epitel a otevírá se cesta pro bakteriální invazi v basolaterální membráně. PMN buňky na začátku infekce přispívá k rozvoji invaze a v konečném důsledku se podílí na řešení infekce, prostřednictvím rozkladu bakteriálního faktoru virulence a usmrcením invazivních bakterií šigely [6].

5 Klinické projevy

Bakterie *Shigella spp.* (*S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri* a *S. sonnei*) a enteroinvasivní *Escherichia coli* jsou zodpovědné za bakteriální úplavice (*shigellosis*) u lidí [10]. Pro onemocnění je charakteristické zničením střevní sliznice vyvolané bakteriální invazí a následným nárůstem bakterií v epitelu [15]. *Shigella* a EIEC kmeny

obsahují virulenční plazmid, který kóduje faktory pro vstup do epitelu buňky a šíření z buňky do buňky. Tento přehled prezentuje současný model mechanismu invaze do epitelu tlustého střeva těmito bakteriemi a zaměřuje se na jejich faktory patogenity [10].

Shigella spp. jsou fakultativní intracelulární patogeny, které kolonizují střevní sliznici. Nízká infekční dávka umožňuje šigelám se efektivně šířit [14]. Princip etiologického působení bakteriální úplavice stále představuje hrozbu pro veřejné zdraví [11]. *Shigellosis* je v podstatě akutní rektokolitida způsobená invazí *Shigella* do epitelu rekta a tračnicku. Poškození je většinou na pravé přední straně esovité oblasti, projeví se zduřením sliznice, hlenem, krvácením a vředy.

Histopatologická analýza ukazuje, trvalé a difuzní poškození, které se vyznačují edémem na sliznici, kontaktní krvácení značí prasknutí epiteliální sliznice kapilár a skládá se z prostupných polymorfonukleárních leukocytů, lymfocytů a žírných buněk. Objevují se také skryté abscesy.

Bakterie mohou být pozorovány na povrchu a v horní třetině epitelu tlustého střeva. Jsou často spojeny s abscesy a slizničními vředy uvolňující výpotek. Jsou složeny ze síťoviny fibrinu, individuálních kolonocytů nebo oddělených epitelových fragmentů. Polymorfonukleární erytrocyty a leukocyty tvoří bílou hlenově hnisavou vrstvu ulpívající na epitelu. V pozdějším stádiu choroby, mohou mononukleární buňky masivně proniknout do slizničního vaziva. Tyto léze jednoznačně charakterizují *shigellosis* u klinických případů.

Úplavice je klasický syndrom spojený s infekcí bakterií *Shigella*, jeho závažnost se liší v závislosti na spektru zahrnující těžké úplavice, průjemy nebo asymptomatickou infekci [6]. Prvním klasickým příznakem úplavice je průjem. U experimentálně infikovaných dobrovolníků, byly určeny tři klasické příznaky zahrnující horečku, střevní křeče a krvavý, hnisavý, hlenový průjem [17]. Tyto příznaky jsou pozorovány přibližně u 50 % infikovaných [6].

Inkubační doba je 1 - 4 dny [17], projevuje se vysokou frekvencí stolice, často dosahuje až 100 pohybů střev za den. Těžké dehydratace jsou vzácné, protože ztráty tekutin zůstávají omezeny. Mohou se však objevit vážnější klinické projevy, zejména u podvyživených dětí v nejhudších oblastech jako dehydratace a sepse, které zvyšují závažnost úplavice a případné úmrtí.

Všechny druhy *Shigella* mají potenciál způsobit smrtelné onemocnění, které odrážejí závažné komplikace, jako je hypoglykémie, perforace střeva se zánětem pobřišnice a hemolyticko-uremický syndrom, který způsobuje akutní selhání ledvin a záchvaty [16].

Mezi rizikové faktory, zvláště pro malé děti ve věku mladší než 1 rok, patří letargie, abnormálně nízká hladina proteinů, a snížené množství krevních destiček. Navíc silné, dlouhotrvající příznaky *shigellosis* u malých dětí mohou vést k podvýživě, k malému vzrůstu a v nejhorších případech až k smrti. V nejhudších oblastech může být *shigellosis* hlavní příčinou zpomalení růstu u kojenců a malých dětí. V neposlední řadě může být pozorována reaktivní artritida jako následek *S. flexneri* infekce [6].

6 Epidemiologie

Shigella má úzkou distribuci v přírodě, v podstatě obývá střevní trakt člověka a primátů v zajetí. I přesto se *shigella* velmi obtížně kultivuje z environmentálních vzorků, jako jsou např. čistírny odpadních vod, v kterých je trvale přítomna. Náhodná kontaminace vodních zdrojů je možná v případě, že by se do nich dostala odpadní voda. Pokud by k této kontaminaci došlo, následovala by epidemiologie *shigellosis* [6].

Většina případů *shigellosis* se přenáší z člověka na člověka [10], i když některé onemocnění může být z jídla nebo právě ze znečištěné vody [20]. Při průřezu historií k epidemiím *shigellosis* vždy docházelo při špatných hygienických podmínkách, jako jsou například válečné konflikty, poutě nebo uprchlické tábory [6].

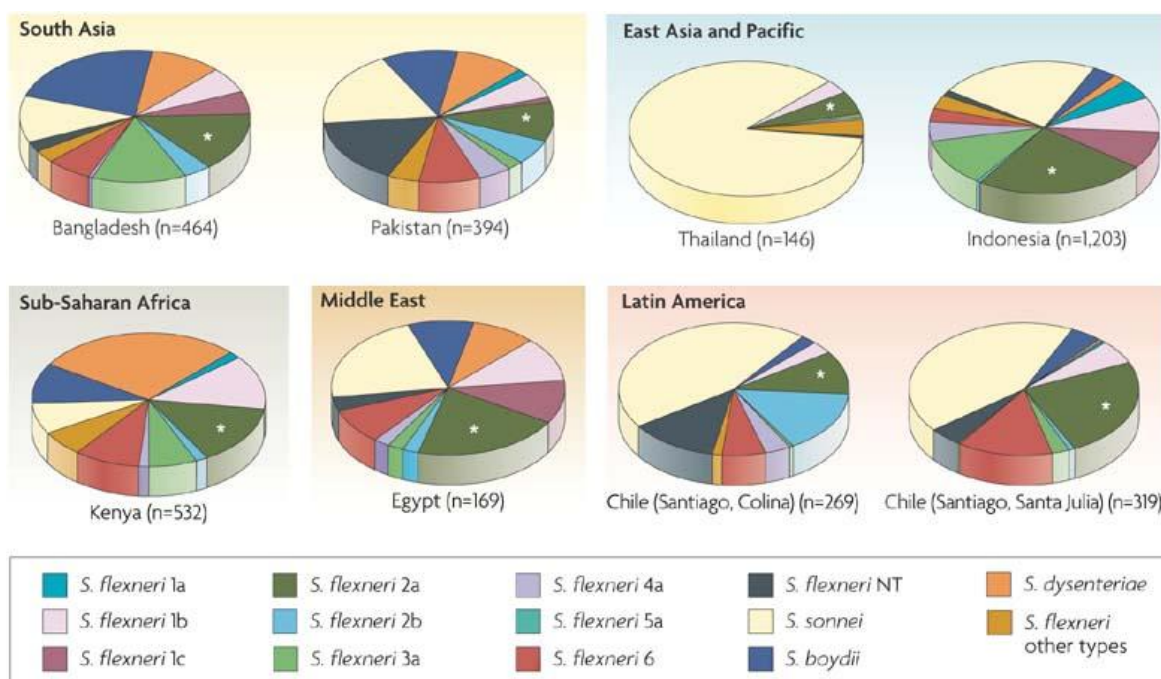
K přenosu *Shigella* dochází především prostřednictvím fekálně - orální cesty [8]. Šíří se přímým kontaktem s infikovanými jedinci, protože bakterie vykazují významné přežití na kůži. Vysoká infekčnost *Shigella* se nejvíc projevuje při vypuknutí infekce ve školkách (33 – 73 %). Sekundární případy lze pozorovat u rodinných příslušníků nemocných dětí (26 - 33 %) [6].

Shigella může být také přenášena kontaminovanými potravinami. Důležitou roli v kontaminaci potravin hrají mouchy [23]. Mnoho případů ohnisek infekce bylo zaznamenáno z kontaminovaných produktů potravin [18]. Kontaminované potraviny jsou velice různorodé, může to být cibule, salát, kokosové mléko, hamburgery nebo těstoviny.

Shigellosis je sexuálně přenosné onemocnění, přenáší se ústně - genitálními sexuálními praktikami [6].

Je třeba znovu zdůraznit, že *shigellosis* je především ovlivněno podmínkami, které panují v málo rozvinutých regionech světa: přelidnění, chudoba, špatná osobní hygiena, absence kontroly potravin, nedostatečné zásobování pitnou vodou a špatná nebo žádná kanalizace. V těchto podmínkách děti často trpí podvýživou, čímž se zvyšují počty závažných komplikací [6].

Hlavním zástupcem *Shigella* je *S. dysenteriae* 1, která zodpovídá za rychlou a možná i smrtící epidemii, zatímco *S. flexneri* a *S. sonnei* v podstatě odpovídají za endemické formy *shigellosis*. *S. boydii* se vyskytují jen zřídka, patří také mezi endemickou formu onemocnění. V rozvojových oblastech, je nejvíce rozšířen druh *S. flexneri*, hlavně sérotypy 1b, 2a, 3a, 4a, 6 (obr. 4). Prevalence těchto dominantních sérotypů se značně liší, závisí na sledování určité oblasti v daném čase, což vyžaduje trvalé sledování a aktualizaci [18].



Obr. 4: Grafy s výskytem různých kmenů a sérotypů *Shigella* [30]

6.1 Epidemiologický výskyt *Shigellosis* ve světě

Shigellosis je endemická na celém světě i přesto, že 99 % infekcí pochází z rozvojových oblastí světa. Z celkového počtu 164,7 milionu případů ročně, je 600 000

z nich smrtelných [13]. Děti mladších 5 let, tvoří 69 % klinických případů a 62 % úmrtí. *Shigellosis* je rychle se rozvíjející onemocnění, které vyžaduje stálou aktualizaci s ohledem na celkový počet nově hlášených nemocných jedinců v daném časovém období a počet všech jedinců ve sledované populaci. Dále se musí sledovat vývoj jednotlivých druhů a sérotypů. Je velice důležité mít k dispozici vhodné vakcíny pro daný druh [14].

Shigella je vysoce infekční mikroorganismus, bylo prokázáno kolem 100 případů *shigellosis* jako příčina onemocnění u 25 - 50 % dobrovolníků ze Severní Ameriky. Relativní odolnost na žaludeční kyselost *Shigella* je částečný důvod této vysoké infekčnosti.

V Bangladéši, epidemie způsobená *S. dysenteriae* 1 zvýšila nárůst úmrtnosti na 42 % dětí ve věku od 1 do 4 let. Podobně, v uprchlickém táboře v Gomě, *Shigella* zapříčinila 38 % úmrtnost. Závažnost onemocnění souvisí s vysokou úrovní multiresistance izolovaných kmenů (obr. 5).

Podle geografického rozložení *S. dysenteriae* 1 se nachází převážně v jižní Asii a v subsaharské Africe. V ekonomicky rozvinutých oblastech převládá *S. sonnei* společně s *S. flexneri* [6]. A v indických oblastech se nejvíce vyskytuje *S. boydii* [23].

Prvé sporadické případy i epidemie onemocnění EHEC byly zaznamenány v USA a v Kanadě v 80. letech minulého století. Často to bylo z hamburgerů – v USA se používá označení „hamburgerová“ nemoc. První epidemie byly vyvolány sérotypem *E. coli* O157:H7. Ten je nejznámější, ale zdaleka ne jediný. V literatuře se uvádí těchto pět nejčastějších séro skupin: O157, O26, O111, O103 a O145 [6].

V období května až července 2011 vypukla v Německu velká epidemie gastrointestinálního onemocnění a hemolyticko-uremického syndromu (HUS) vyvolaná shigatoxigenním kmenem *Escherichia coli* (STEC) [1]. Rozsáhlá epidemie přesáhla hranice Německa (postihla dalších 13 evropských států) a dokonce se dostala i do USA a Kanady [9]. Epidemie byla způsobena Shiga toxinem, který produkovala *E. coli* sérotypu O104:H4. Hlavní znaky virulence měla podobné s enterohemoragickou *E. coli* s *stx2* a s enteroagregativní *E. coli*. Tato unikátní kombinace vlastností virulence prokázaly, že tento kmen patří do hybridní entero-agregativní-hemoragická *E. coli* [14]. Vyspělé kultivační techniky a molekulárně biologické přístupy jsou dobrým předpokladem pro

identifikaci nových, neobvyklých patogenů. Ke dni uzávěrky bylo zaznamenáno 4055 postižených, 885 (21,8 %) s těžkým průběhem nemoci, tj. s HUS a 48 (1,2 %) případů úmrtí. Je to dosud druhá největší epidemie vyvolaná STEC na světě a největší co do počtu pacientů s HUS. Samostatnou otázkou je vehikulum této epidemie. Poslední indicie ukazují na luštěninové výhonky. Shodný kmen „EAHEC“ O104:H4 byl zachycen v těchto vzorcích, ale tyto vzorky nebyly odebrané z prodejny či výroby potravin. Podobné epidemie byly zaznamenány v roce 1996 v japonském Sakai, kdy onemocnělo, podle některých zdrojů, až 10 000 školních dětí. Vehikulem byly ředkvičkové výhonky [1].



Obr. 5: Mapa s výskytem největších pandemií *shigellosis* [30]

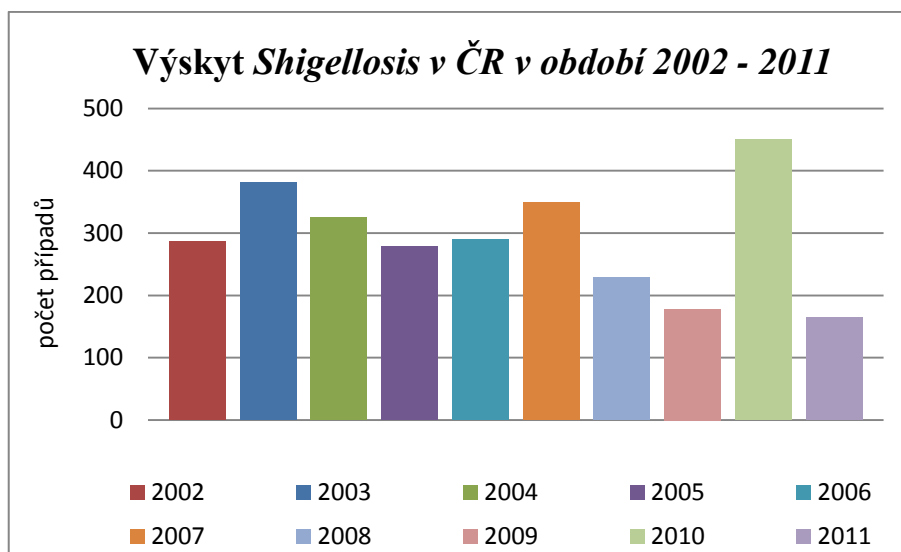
6.2 Epidemiologická situace v České republice

V posledních letech se počet hlášených onemocnění *shigellosis* oproti 70. a 80. letům minulého století výrazně snížil, ale stále se pohybuje v ČR ve stovkách případů za rok. V roce 2010 došlo dokonce ke zvýšení případů, kdy oproti 178 případům zaznamenaným v roce 2009 se počet zvýšil o 150 % až na 450 případů. V roce 2010 byly větší epidemie *shigellosis* v Jihočeském, Moravsko-slezském a Olomouckém kraji (celkem 326 případů) a dále i ve Středočeském a Plzeňském kraji (celkem 69). 23 případů bacilární úplavice bylo nahlášeno i v Praze (graf 1). Od roku 1993 byly v ČR postupně zaznamenány všechny 4 sérotypy, včetně *S. dysenteriae*. Podle molekulárně - genetických analýz se na základě

příbuznosti DNA prokázalo, že *E. coli* a čtyři druhy rodu *Shigella* jsou totožným taxonem, takže jednotlivé druhy *shigella* jsou vlastně séro skupiny patogenních klonů *E. coli* [9].

V České republice je frekvence záhytu EHEC infekcí nízká. Od roku 2006 bylo pro *E. coli* a *shigella* zaznamenáno 25 případů tohoto onemocnění (průjem, krvavý průjem, hemolyticko-uremický syndrom), kdy byla jako příčina potvrzena EHEC. Ve zprávách CEM byly prezentovány dva případy HUS v srpnu 2007 [12]. Etiologickým původcem byl EHEC O111:NM, produkující oba typy Shiga toxinů 1 a 2. Shiga toxinu 2 se připisuje mnohonásobně větší toxicita, než typu 1 [9].

Při vypuknutí velké epidemie v Německu roku 2011 se podařilo zachytit a následně pomocí genotypových i fenotypových metod potvrdit dosud jediný izolát epidemického kmene „EAHEC“ O104:H ze stolice americké pacientky v Česku. V souvislosti s velkou německou epidemií byly do NRL pro *E. coli* a *shigella* zaslány vzorky stolic od dalších 9 pacientů s krvavým průjmem, u kterých bylo podezření, že se mohli tímto epidemickým kmenem nakazit. Všechny byly na *E. coli* O104:H4 negativní [1].



Graf 1: Výskyt shigellosis v České republice v období 2002-2011 [19].

7 Laboratorní diagnostika

Onemocnění způsobené EIEC a *Shigella* je problém veřejného zdraví ve všech oblastech světa. Proto je velmi důležité identifikovat patogenní bakterie, hlavně pro epidemiologické studie [8]. Isolace živých bakterií je důležitá pro charakterizaci jejich

patogenního potenciálu a pro zjištění citlivosti na antimikrobiální zástupce [20]. V případě EIEC a *Shigella* je někdy obtížné dosáhnout rozdílu na základě sérologických a biochemických metod [8].

Laboratoře obvykle zjišťují *Shigella* filtrací velkého množství vody (2 ± 5 l) přes membrány. Předpokládané kolonie se identifikují sérotypizací. Tento přístup má však určité nedostatky. Mezi tyto nedostatky patří omezený počet desek, může být hodnoceno jen několik desítek nebo stovek izolovaných kolonií a potvrzení identity kolonií *Shigella* může trvat jeden nebo dva dny [10].

Vzhledem k velkému množství fenotypových a genetických markerů, které jsou potřeba na odlišení EIEC a *Shigella*, se v současné době používají k odlišení metody založené na velmi omezeném počtu znaků. Některé kmeny EIEC, zejména ty, které jsou u neaktivních *E. coli*, mají v podstatě všechny vlastnosti *Shigella* kmenů [8]. Stále více jsou používány DNA genotypové metody pro charakterizaci bakterií. Nejčastěji používanými metody jsou RFLP (polymorfní restrikční fragmenty), elektroforéza, PCR a ribotypizace. Tyto techniky jsou však pracné, drahé a nejsou vhodné pro studium velkého počtu kmenů [11].

Molekulární specifické techniky virulence související s geny *Shigella* a EIEC, mezi tyto techniky patří DNA hybridizace a PCR, které se používají k identifikaci těchto patogenů [20]. PCR byla úspěšně použita k detekci fekální koliformní bakterie. *Shigella* byla s vysokou specifikací a citlivostí úspěšně zjištěna ve vzorcích vody i bez kultury patogenů. Další výhodou technik je, že vzhledem k podobnosti virulentních genů se specifikací na *Shigella*, PCR také detekuje EIEC kmeny. Tyto metody jsou však drahé a vyžadují sofistikované zařízení, které nemusí být k dispozici v rozvojových zemích. To je zvláště znepokojující, protože většina ze střevních infekcí je endemická v těchto částech světa. Proto jsou ještě stále za potřeby jednoduché metody pro identifikaci těchto patogenů ve vzorcích vody [10].

Nedostatek jednoduchých a levných technik značně limituje výzkum výskytu a epidemiologii původce bacilární úplavice, zejména EIEC. Zatímco obvykle méně citlivé metody než molekulární, jako například imunologické mají tu výhodu, že jsou poměrně jednoduché. To jim umožňuje se snadno zařadit do metodického repertoáru prakticky každé laboratoře. Ve střevní bakteriologii se používají blot metody k identifikaci Shiga

toxinu, který produkuje *E. coli* a *S. dysenteriae*. Nedávno byla pro identifikaci *Shigella* a EIEC využita ELISA (enzyme – linked immuno sorbent assay) s polyklonálním vstřebáváním protilátky, je to jednoduchá a levná technika [21].

7.1 Blot test k identifikaci EIEC a *Shigella* ze vzorků vody

Základem této techniky je filtrace bakteriální buňky na nitrocelulózní membráně. Je to obvyčejná technika pro vyšetřování mikrobiálního obsahu vzorků vody. Po noční inkubaci jsou detekovány *IpaC* v koloniích pomocí monoklonálních protilátek. *IpaC* antigen je trvale vyráběn *Shigella* a EIEC. Je specifický pro tyto patogenní kmeny a zajišťuje detekci patogenů touto metodou. Studie ukázala, že žádný ze 100 neinvazivních testovaných kmenů nebyl pozitivní na membráně, zatímco všech 20 *Shigella* a 80 EIEC kmenů bylo pozitivních.

Screening s několika sety kolonií na jedné nebo dvou membránách, je přítomný ve všech enteroinvasivních kmenech bez ohledu na jejich biologický druh nebo sérotyp, tím překonává všechny tyto testy. Může být dokončen v jednom dni, což snižuje dobu potřebnou k identifikaci patogenů, které obsahuje vzorek. Předpokládá se, že zavedení jednoduché, levné metody v méně rozvinutých částech světa by mohl vést k lepšímu pochopení epidemiologie úplavice a působení mikroorganismy zejména EIEC.

Vymezení tzv. neaktivních EIEC a *Shigella* je velmi náročné. Biochemické a sérologické metody jsou omezeny. Tento test jednoznačně zjednodušuje rozdíly těchto kmenů [3].

7.2 ELISA (Enzyme - Linked Immuno Sorbent Assay)

Metoda funguje na bázi imunoenzymatické reakce a lze s ní rovněž detekovat i antigen. ELISA využívá dvou základních vlastností imunoglobulinů. Za prvé je to schopnost proteinů (tedy imunoglobulinů) vázat se na povrch plastů (např. polystyrenu) a v druhé řadě pak schopnost vázat enzymy na Fc fragmenty (viz protilátka) imunoglobulinových molekul [33]. Později byla tato technika zlepšena zavedením monoklonálních protilátek. Monoklonální protilátky reagují se všemi testovanými virulentními *Shigella* a EIEC kmeny, ale neposkytují žádné pozitivní reakci s některým

z neinvazivních kmenů. Tento test detekuje plazmid - kódovaný protein, *IpaC*, unikátní u těchto patogenů a souvisí s jejich invazivním charakterem.

7.3 IMS (Immunomagnetická separace)

Immunomagnetická separace (IMS), fluorescenční mikroskopie a následná polymerázová řetězová reakce (IMSPCR) byly již dříve použity pro detekce *S. dysenteriae* sérotypu 1 a *S. flexneri* z vzorcích stolice. IMS-fluorescenční mikroskopické techniky dosáhly detekčního limitu 103 KTJ/ml, zatímco IMS-PCR metoda dosáhla detekčního limitu 101 KTJ/g [21]. Imunologický test ukázal, že je velmi citlivý. Poznává většinu (38 z 40) patogenů obsahující více než 1000 krát více nepatogenní buněk než EIEC. V případě *Shigella*, by mohl test trvat jeden nebo více dní podle úrovně a druhu identifikace [3].

7.4 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Polymerázová řetězová reakce, byla navržena pro řešení exponenciální amplifikace oligonukleotidů v tzv. beta-globinovém programu. Amplifikuje se specifická sekvence DNA, jež je komplementární k hybridizační sondě. V případě infekčního agens se jedná o druhově, případně rodově specifický úsek nukleové kyseliny. Pro rutinní testy je důležité, aby tento úsek byl neměnný, nesmí v něm docházet k bodovým mutacím. DNA uvolněná z infekčního agens je nejprve tepelně denaturována. Při teplotě nad 90°C jsou rozvolňovány vodíkové můstky spojující purinové a pyrimidinové báze vzájemně komplementárních nukleotidů, čím jsou od sebe oddělovány jednotlivé řetězce DNA. Výsledkem tohoto procesu je jednořetězcová DNA (ssDNA). Ta v další fázi slouží jako matrix pro syntézu nového komplementárního řetězce.

Tato syntéza je enzymatickým procesem, který začíná nasednutím tzv. primeru (očka) na komplementární sekvenci matricového řetězce. Primery jsou syntetické oligonukleotidy (zpravidla 20 – 30 nukleotidů). Od jejich 3' konce začíná syntéza nového řetězce. Jednotlivé nukleotidy jsou přiřazovány podle komplementarity bází (A-T, C-G), propojení cukrů fosfodiesterickou vazbou do zpátečního řetězce zajišťuje polymeraza.

Nasednutí oček (annealing primerů) probíhá obvykle při teplotě kolem 60°C, pro elongaci (polymeraci) řetězce je optimální teplota 72°C. Výsledkem procesu je novotvořený úsek dvouřetězcové DNA (dsDNA), tzv. amplikon. Protože se amplifikují oba řetězce matricové DNA zároveň (i druhý řetězec má svůj specifický primer), vzniknou

v průběhu cyklu z jedné výchozí molekuly dsDNA dva amplikony. Druhý cyklus začíná opět tepelnou denaturací dsDNA (amplikonů), následuje annealing (nasednutí) primerů a od jejich 3' konců elongace řetězců. Ze 2 výchozích molekul (amplikonů) tak vzniknou 4 nově vytvořené amplikony [22].

7.4.1 Duplexní real-time PCR

Je jednoduchá, rychlá, spolehlivá a přesná metoda pro stanovení EIEC a *Shigella*. PCR v duplexním reálném čase, je specifická pro geny kódující β -glukuronidazu (*uidA*) a laktózu permeazu (*lacY*). Byla provedena optimalizace specifického primeru s nastavením pro detekci permeazy a laktózy. *E. coli* byla testována pomocí podmnožiny *E. coli* a *Shigella spp.* referenčních kmenů. *lacY* - PCR není však vhodná pro rozlišení *Shigella spp.* a *E. coli* od dalších *Shigella* kmenů, z důvodu podobné velikosti všech *Shigella* kmenů. K tomu to účelu byla navržena zvláštní sonda z upraveného *lacY* genu z některých EIEC kmenů. Díky tomu byly *lacY* geny obou kmenů sekvenovány. Vzhledem k tomu, že se *lacY* geny vyskytují pouze v genomu *E. coli*, nemohou být výsledky falešně negativní. Při kombinaci testu jsou vyloučeny problémy s komponenty PCR, jako jsou inhibiční látky nebo nedostatečné extrakce DNA. Tato PCR je schopna rozlišit *Shigella spp.* a EIEC od všech testovaných *E. coli* kmenů.

Skutečnost, že EIEC jsou velmi podobné *Shigella spp.*, tradiční mikrobiologické techniky často vedou k protichůdným výsledkům v oblasti diskriminace EIEC a *Shigella spp.* Například, zatímco *Shigella spp.* mohou způsobit život ohrožující HUS, u EIEC to není zatím prokázáno. Duplexní real-time PCR je jednoduchá, rychlá, spolehlivá a přesná metoda, která může konečně jasně identifikovat *E. coli* [8].

7.4.2 Metoda RAPD (radon amplified polymorphic DNA)

RAPD (radon amplified polymorphic DNA), modifikovaná PCR je rychlá typická molekulární metoda. Krátká (10-mer) a náhodná generovaná oligonukleotidová sekvence slouží jako náter k doplnění žihacích regionů po celém genomu, pochází z otisků prstů organismu. Tato metoda se úspěšně používá pro bakteriální molekulární charakteristiky, identifikační a fylogenetickou analýzu [11].

7.5 MLEE (multilokusová enzymová elektroforéza)

Multilokusová enzymová elektroforéza využívá polyakrylamidový gel. Gelové elektroforézy s elektroforetickými transfery na nitrocelulózovém listě, byly vyvinuty pro analýzu polymorfního enzymu pro několik aerobních a anaerobních bakteriálních druhů. Sériové elektroforetické převody z jednoho polyakrylamidovém gelu by mohly být u většiny sledovaných enzymů, a tím by se zvýšila definice skupiny enzymů na nitrocelulózách ve srovnání s migrací gelů. Analýza polymorfních enzymů různých živočišných druhů zvýšilo zájem polymorfních lokusů na epidemiologických studiích [24].

7.6 Ribotypizace

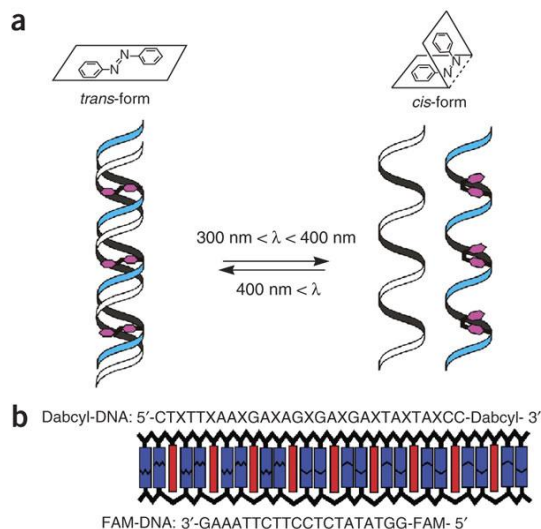
Ribotypizace je metoda, která dokáže identifikovat a třídit bakterie založené na rozdílech v rRNA. To vede ke vzniku vysoce reprodukovatelných a přesných otisků prstů, které mohou být použity ke klasifikaci rodu nebo dokonce druhu bakterie. DNA je extrahována z kolonie bakterií a následně omezena na diskrétní velikost fragmentů. Potom je přenesena do blány a sondou v regionu rRNA operonu je odhalena struktura genů rRNA. Vzor je zaznamenán, digitalizován a uložen v databázi. Tato databáze i nadále roste, neboť další bakterie jsou ribotypizovány [25].

7.7 DNA-DNA hybridizace

Metoda DNA-DNA hybridizace je založena na denaturaci a reasociaci (renaturaci) dvoušroubovicové DNA (Obr. 7). Jestliže dsDNA zahřejeme na 100°C, dojde k rozpojení vodíkových vazeb mezi komplementárními řetězci a ke vzniku jednořetězcové DNA. Následné ochlazení naopak umožní opětovné spojení obou řetězců. Podmínky této reasociace (koncentrace solí, teplota, viskozita, velikost fragmentů) určují rozsah chyb v párování jednotlivých komplementárních nukleotidů. Při striktních podmínkách (nízká koncentrace solí, vysoká teplota) je umožněno spojení jen velmi podobných sekvencí. S postupným uvolňováním těchto podmínek (zvyšující se koncentrace solí, snižující se teplota) se mohou párovat i méně podobné sekvence až do chvíle, kdy se mohou náhodně párovat i naprosto odlišné sekvence.

Základní princip metody tkví v tom, že fragmenty DNA dvou různých druhů mohou být smíchány, denaturovány a posléze vzájemně reasociovány za vzniku heteroduplexů. Tyto heteroduplexy vznikají tím hůře (resp. disociují tím snáze), čím jsou oba druhy více

evolučně vzdáleny, tj. čím větší jsou rozdíly mezi jejich DNA. Jestliže jsou hybridní molekuly umístěny do teplotního gradientu, můžeme srovnat teplotu tání, tj. teplota přechodu dvouřetězcového heteroduplexu na jednořetězcovou molekulu, s teplotou, při které disociuje homoduplexy [27].



Obr. 7: DNA-DNA hybridizace [28]

7.8 RFLP (restrikční analýza DNA)

Restrikční analýza DNA je charakterizovaná štěpením restrikčních endonukleas na fragmenty. Identifikace a analýza produktů štěpení se provádí elektroforetickým dělením. Je známo velké množství bakteriálních restrikčních endonukleas (asi 1500), které se od sebe liší tím, že rozpoznávají různé krátké sekvence nukleotidů 4, 6, 8 a že štěpí DNA na různě dlouhé fragmenty podle individuálního pořadí bází a podle rozpoznané sekvence. Za daných podmínek vzniká reprodukovatelný počet restrikčních fragmentů o určité reprodukovatelné délce. Počet a délka fragmentů je pro daného jedince specifická. Odlišení různých DNA se provádí na základě polymorfismu, délky štěpných úseků. Tento polymorfismus vzniká na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti rozpoznávacích a štěpných míst. Obecně restrikční endonukleasy, které rozpoznávají kratší sekvenci, štěpí DNA častěji na menší úseky, zatímco restrikční endonukleasy rozpoznávající delší sekvenci štěpí méně často a na delší fragmenty [26].

8 Závěr

Rody *Shigella* a *Escherichia* by se daly téměř považovat za jeden rod, liší se pouze fenotypovými rozdíly. Většina studií prokazuje, že *Shigella* je patogenní *Escherichia*, přesto z historického a praktického hlediska stále zůstává název *Shigella*. *Shigella* je na rozdíl od *Escherichia* mnohem více virulentní, je to způsobeno změnou ve vnitřní oblasti chromozómu.

Onemocnění *shigellosis* způsobené *Shigella* se ve světě stále vyskytuje ve velké míře. I v České Republice se toto onemocnění vyskytuje až ve stovkách případů za rok. Pro boj s tímto onemocněním je třeba včasná a přesná diagnostika.

Nejúčinnější laboratorní techniky, které se používají k diagnostice *Shigella* a *Escherichia* jsou molekulární metody, hlavně PCR a DNA - hybridizace, které na rozdíl od sérologických a biochemických technik jsou daleko přesnější a hlavně umožňují detekovat mikroorganismus během krátkého časového období. Ovšem nevýhodou těchto metod je, že jsou poměrně pracné a hlavně drahé. Proto je stále potřeba vyvíjet nové technologie k určení *Shigella* a *Escherichia*, které by byly hlavně levné, aby se daly používat v rozvojových zemích, kde je onemocnění způsobené těmito rody nejvíce rozšířené.

9 Použitá literatura

- [1] Majerková M.: Zjišťování přítomnosti genů kódující produkci Shiga toxinů Stx1 a Stx2 u klinických izolátů *E. coli*, CEM (SZÚ, PRAHA) 2006, 464 – 467
- [2] Sedláček I.: *Escherichia* a *Shigella* - pro klinickou bakteriologii dva dlouho známé rody, přesto taxonomicky stále problematické, CEM (SZÚ, Praha), 2011, **20**(3), 100 – 103
- [3] Moss J. E., Fisher P. E., Vick B., Groisman E. A. and Zychlinsky A.: The regulatory protein *PhoP* controls susceptibility to the host inflammatory response in *Shigella flexneri*, Cellular Microbiology, Blackwell Science Ltd, New York, USA, 2000, **2**(6), 443 – 452
- [4] Liu B., Knirel Y. A., Feng Lu, Perepelov A. V., Senchenkova S. N., Wang Q., Reeves P. R. & Wang L.: Structure and genetics of *Shigella* O antigens, Federation of European Microbiological Societies FEMS, 2008, 627 – 653
- [5] Parsot C.: *Shigella spp.* and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors, FEMS Microbiology Letters, 2005, **252**(1), 11–18
- [6] Sansonetti P. J.: *Shigella*, MD Professeur à l'Institut Pasteur, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, John Wiley & Sons, New York, USA, 2010
- [7] Lan R., Reeves: P. R. *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of *Shigella*, Australia, **4**(11), 2002, 1125 – 1132
- [8] Microbiol J. M.: *Shigella* and *Escherichia coli* at the crossroads: Machiavellian masqueraders or taxonomic treachery? The Pathological Society of Great Britain and Ireland, 2000, **49**, 583 – 585
- [9] Žemličková H., Kolínská R., Marejková M., Petráš P., Urbášková P.: EHK – 709 Bakteriologická diagnostika – vyhodnocení, zprávy CEM (SZÚ, PRAHA) 2011, **20**(8), 300 - 302
- [10] Pavlovic M., Luze A., Konrad R., Berger A., Sing A., Busch U. and Huber I.: Development of a duplex real-time PCR for differentiation between *E. coli* and *Shigella spp.*, Journal of Applied Microbiology, 2011, **110**, 1245–1251

- [11] Bando S. Y., Valle do G. R. F, Martinez M. B., Trabulsi L. R., Moreira-Filho C. A.: Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains by RAPD analysis, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Brazilia, 1998
- [12] Penga J., Yanga J., Jina Qi, Laboratory for Molecular Virology and Genetic Engineering: The molecular evolutionary history of *Shigella spp.* and enteroinvasive *Escherichia coli*, Institute of Pathogen Biology, China, 2009, 147 – 152
- [13] Jennison A. V., Verma N. K.: *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development, FEMS Microbiology Reviews, 2004, **28**, 43–58
- [14] Warren B. R., Yuk H. and Schneider K. R.: Detection of *Shigellas sonnei* in selected foods by flow-through immunocapture followed by real-time polymerase chain reaction or isolation on macconkey agar, Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology, 2006, **14**, 309 – 324
- [15] Scotland S. M., Division of Enteric Pathogens, Central Public Health Laboratory: Toxins, Journal of Applied Bacteriology, 1988, 109 - 129
- [16] Ally S., Sauer N. J., Loureiro J. J., Snapper S. B., Gertler F. B. and Goldberg M. B.: *Shigella* interactions with the actin cytoskeleton in the absence of Ena/VASP family proteins, Cellular Microbiology, 2004, **6**(4), 355–366
- [17] NSW Public Health Bulletin: What is *Shigellosis*?, **13**(9-10), 2002, 218
- [18] Žemličková H., Kolínská R., Marejková M., Urbášková P.: EHK – 599 Bakteriologická diagnostika – vyhodnocení, zprávy CEM (SZÚ, PRAHA) 2011, **20**(8), 143 – 145
- [19] www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-1998-2007-absolutne [11. 6. 2012]
- [20] Sharma A., Singh S. K, Bajpai D.: Phenotypic and genotypic characterization of *Shigella spp.* With reference to its virulence genes and antibiogram analysis from river Narmada, Microbiological Research, 2010, **165**, 33 – 42

- [21] Szakál D., Gadó I. and Pál T.: A colony blot immunoassay to detect enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* in water samples, *Journal of Applied Microbiology*, 2001, **90**, 229 – 236
- [22] <http://www.rochediagnostics.cz/download/la/odborne/pcr3.pdf> [11. 6. 2012]
- [23] Cohen D., Green M., Block C., Slepon R., Ambar R., Wasserman S. S., Levine M. M.: Reduction of transmission of shigellosis by control of houseflies, *The Lancet*, 337, 8748, 1991, 993–997
- [24] Combe M. L., Lemeland J. F., Caron M. P., Pons J. L.: Multilocus enzyme analysis in aerobic and anaerobic bacteria using gel electrophoresis – nitrocellulose blotting, *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 169–174
- [25] <http://foodscience.cornell.edu/cals/foodsci/research/labs/wiedmann/lmt/about-ribotyping.cfm> [11. 6. 2012]
- [26] <http://www.lf2.cuni.cz/projekty/prusa-DNA/newlook/defa3.htm> [11. 6. 2012]
- [27] Gooding J. J.: Electrochemical DNA Hybridization Biosensors, *Electroanalysis*, 2002, **14(17)**, 1149 – 1156
- [28] http://www.nature.com/nprot/journal/v2/n1/fig_tab/nprot.2006.465_F3.html
[11. 6. 2012]
- [29] http://healthdefine.com/wp-content/uploads/2011/06/E_COLI_bacteria.jpg
[11. 6. 2012]
- [30] http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n7/fig_tab/nrmicro1662_ft.html
[11. 6. 2012]
- [31] <http://ocw.jhsph.edu> [11. 6. 2012]
- [32] <http://www.waterscan.co.yu> [11. 6. 2012]
- [33] Tijssen P., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, *Analytical Biochemistry*, **162(1)**, 1987, 309 – 310

[34] Ogawa M., Suzuki T., Tatsuno I., Abe H. and Sasakawa Ch.: *IcsB*, secreted via the type III secretion system, is chaperoned by *IpgA* and required at the post-invasion stage of *Shigella* pathogenicity, *Molecular Microbiology*, Blackwell Publishing Ltd, Tokyo, Japan, 2003, **48**(4), 913–931

Název práce	Taxonomické zařazení rodu <i>Shigella</i>
Autor práce	Marie Benešová
Obor	Hodnocení a analýza potravin
Rok obhajoby	2012
Vedoucí práce	Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.
Anotace	<p>Bakalářská práce je zaměřena na taxonomické zařazení rodu <i>Shigella</i>. Popisuje historii rodů <i>Escherichia</i> a <i>Shigella</i>. Porovnává rod <i>Shigella</i> s rodem <i>Escherichia</i> z hlediska biochemických a sérologických rozlišení. Dále se zabývá klinickými projevy, patogenézí <i>shigellosis</i> a její epidemiologickou situací ve světě a v České Republice.</p> <p>Na závěr se práce zaměřuje na metody analýzy nukleových kyselin používaných v taxonomických studiích a srovnává je s kultivačními a biologickými technikami.</p>
Klíčová slova	<i>Shigella</i> , <i>Escherichia</i> , <i>shigellosis</i> , molekulárně - biologické metody
Annotation	<p>Bachelor thesis is focused on the taxonomic evaluation of <i>Shigella</i> genus. The outset describes the history of the genus <i>Escherichia</i> and <i>Shigella</i> and compares the <i>Shigella</i> genus to the genus <i>Escherichia</i> in terms of biochemical and serological resolution. It deals also with clinical manifestations, pathogenesis of <i>shigellosis</i> and its epidemiological situation in the world and in the Czech Republic.</p> <p>The final part focuses on methods of analysis of nucleic acids used in taxonomic studies and compares them with the culture and biological techniques.</p>
Keywords	<i>Shigella</i> , <i>Escherichia</i> , <i>shigellosis</i> , molecular - biological methods