

**M A S A R Y K O V A
U N I V E R Z I T A**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Extraintestinální
patogenní *Escherichia
coli*: epidemické linie a
rezistence
k antimikrobiálním
látkám**

Bakalářská práce

MAGDALÉNA ŠIMČÍKOVÁ

Vedoucí práce: doc. RNDr. Monika Dolejská, PhD.

Ústav experimentální biologie
Obor Speciální biologie

Brno 2021



Bibliografický záznam

Autor:	Magdaléna Šimčíková Přírodovědecká fakulta Masarykova univerzita Ústav experimentální biologie
Název práce:	Extraintestinální patogenní <i>Escherichia coli</i> : epidemické linie a rezistence k antimikrobiálním látkám
Studijní program:	Experimentální biologie
Studijní obor:	Speciální biologie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Monika Dolejská, PhD.
Rok:	2021
Počet stran:	72
Klíčová slova:	extraintestinální <i>Escherichia coli</i> ; patogen; antibiotika; metody typizace; sekvenční typy

Bibliographic record

Author: Magdaléna Šimčíková
Faculty of Science
Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*:
epidemic lineages and antimicrobial resistance

Degree Programme: Experimental Biology

Field of Study: Special Biology

Supervisor: doc. RNDr. Monika Dolejská, PhD.

Year: 2021

Number of Pages: 72

Keywords: extraintestinal *Escherichia coli*; pathogen;
antibiotics; typing methods; sequence types

Anotace

Escherichia coli je gramnegativní bakterie, vyskytující se jako komenzál a intestinální či extraintestinální patogen. Tato bakalářská práce se zabývá primárně extraintestinální patogenní *E. coli*, způsobující infekce močových cest, krevního řečiště, novorozenecké meningitidy či sepse. Některé epidemické linie se kromě člověka vyskytují i volně v přírodě nebo u zvířat. V práci jsou popsány virulenční mechanismy, typizační metody a podrobněji také rezistence k antimikrobiálním látkám u *E. coli* a jsou představeny významné epidemické linie *E. coli*, například v současnosti celosvětově nejrozšířenější ST131.

Abstract

Escherichia coli is a gram-negative bacterium, occurring as a commensal and an intestinal or extraintestinal pathogen. This bachelor thesis deals primarily with extraintestinal pathogenic *E. coli*, causing infections of the urinary tract, bloodstream, neonatal meningitis or sepsis. In addition to humans, some epidemic lines also occur wild in nature or in animals. This work describes virulence mechanisms, typing methods and in more detail also resistance to antimicrobials in *E. coli* and presents important epidemic lines of *E. coli*, for example, currently the most widespread ST131 worldwide.

ZADÁNÍ
BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Akademický rok: 2020/2021

Ústav:	Ústav experimentální biologie
Studentka:	Magdaléna Šimčíková
Program:	Experimentální biologie
Obor:	Speciální biologie
Směr:	Mikrobiologie a molekulární biotechnologie

Ředitel ústavu PFF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s názvem:

Název práce:	Extraintestinální patogenní <i>Escherichia coli</i> : epidemické linie a rezistence k antimikrobiálním látkám
Název práce anglicky:	Extraintestinal pathogenic <i>Escherichia coli</i> : epidemic lineages and antimicrobial resistance
Jazyk závěrečné práce:	čeština

Oficiální zadání:

Extraintestinálně patogenní *Escherichia coli* (ExPEC) je významným původcem závažných onemocnění člověka a zvířat. Rostoucí rezistence ExPEC kmenů ke kriticky důležitým skupinám antimikrobiálních látek má obrovské dopady na veřejné zdraví, zemědělství a světovou ekonomiku. Cílem bakalářské práce je zpracovat přehled významným skupin ExPEC kmenů, zhodnotit jejich rozšíření ve světě a stav rezistence k antibiotikům.

Literatura:

Woodford, N., Turton, J. F., Livermore, D. M. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 35, 736-755.
Mathers, A. J., Peirano, G., Pitout, J. D. 2015. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev* 28, 565-591.
Vila, J. et al. 2016. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol Rev*. 40(4): 437-463. doi: 10.1093/femsre/fuw005.
Dale, A.P., Woodford, N. 2015. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *Journal of Infection* 71 (6): 615-626.

Vedoucí práce:	doc. RNDr. Monika Dolejská, Ph.D.
Datum zadání práce:	1. 11. 2020
V Brně dne:	24. 5. 2021

Zadání bylo schváleno prostřednictvím IS MU.

Magdaléna Šimčíková, 24. 11. 2020
doc. RNDr. Monika Dolejská, Ph.D., 25. 11. 2020
RNDr. Pavel Lízal, Ph.D., 25. 11. 2020

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího práce s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

V Brně 24. května 2021

.....
Magdaléna Šimčíková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí své bakalářské práce doc. RNDr. Monice Dolejské, PhD. za vedení a cenné rady při psaní práce.

Obsah

Seznam obrázků	12
Seznam pojmů a zkratk	13
1 Úvod	15
2 Charakteristika <i>E. coli</i>	16
2.1 Taxonomie a rozšíření	16
2.2 Morfologie	16
2.3 Fyziologické a biochemické vlastnosti	17
2.4 Genom	18
3 Dělení <i>E. coli</i> podle patogenity a místa výskytu	19
3.1 Komenzální <i>E. coli</i>	19
3.2 Intestinální patogenní <i>E. coli</i>	19
3.3 Extraintestinální patogenní <i>E. coli</i>	21
3.4 Patogenní <i>E. coli</i> pro zvířata	23
3.4.1 Ptačí patogenní <i>E. coli</i>	23
3.4.2 Prasečí patogenní <i>E. coli</i>	23
3.4.3 Patogenní <i>E. coli</i> u psů a koček.....	23
3.4.4 Další zvířecí patogenní <i>E. coli</i>	24
4 Patogenita	25
4.1 Virulenční faktory ExPEC	25
4.1.1 Adherence.....	25
4.1.2 Toxiny	26
4.1.3 Systémy získávání železa.....	28
4.1.4 Kapsula	29
5 Typizace <i>E. coli</i>	31
5.1 Sérotypizace.....	31

5.2	Multilokusová enzymatická elektroforéza.....	31
5.3	Multiplexní PCR.....	32
5.4	Multilokusová sekvenční typizace	33
5.5	CH typizace.....	34
5.6	Celogenomové sekvenování	35
6	Antimikrobiální látky a rezistence	37
6.1	Historie objevu antibiotik.....	37
6.2	Mechanismy působení antimikrobiálních látek	38
6.3	Mechanismy rezistence ExPEC k antimikrobiálním látkám	38
6.3.1	β-laktamázy a jejich klasifikace.....	39
6.3.1.1	Širokospektré β-laktamázy.....	40
6.3.1.2	AmpC β-laktamázy	40
6.3.1.3	Karbapenemázy.....	41
6.3.2	Fluorochinolony	42
6.3.2.1	Rezistence kódovaná chromozomálními geny	43
6.3.2.2	Rezistence kódovaná plazmidovými geny.....	43
6.4	Mobilní genetické elementy	44
6.4.1	Plazmidy.....	44
6.4.2	Transpozony.....	45
6.5	Přenos genů u bakterií.....	46
6.5.1	Konjugace	46
6.5.2	Transdukce.....	47
6.5.3	Transformace	48
7	Epidemické linie <i>E. coli</i>	49
7.1	<i>E. coli</i> ST131.....	49
7.1.1	Fylogeneze.....	50
7.1.2	Virulence	51
7.1.3	Rezistence k antimikrobiálním látkám	51
7.2	<i>E. coli</i> ST69	52

7.2.1	Fylogeneze.....	52
7.2.2	Virulence.....	52
7.2.3	Rezistence k antimikrobiálním látkám	53
7.3	<i>E. coli</i> ST95	54
7.3.1	Fylogeneze.....	54
7.3.2	Virulence.....	54
7.3.3	Rezistence k antimikrobiálním látkám	55
7.4	Další ST <i>E. coli</i>	55
7.4.1	<i>E. coli</i> ST393.....	55
7.4.2	<i>E. coli</i> ST73	56
8	Závěr	57
	Použité zdroje	58

Seznam obrázků

Obr. 1: <i>E. coli</i> s bičíky (F) a pili (P) (Mayer, 2015)	17
Obr. 2: EAEC přiléhající k HEp-2 buňkám (Navarro-Garcia et al., 2010)	21
Obr. 3: Zařazení <i>E. coli</i> do fylogenetické skupiny (Clermont et al., 2000)	33
Obr. 4: Mechanizmy antibiotické rezistence (Grönthal et al., 2018, upraveno)	39
Obr. 5: Přenos DNA konjugací (F. Al Marjani, 2015, upraveno)	47

Seznam pojmů a zkratk

APEC	– aviární patogenní <i>E. coli</i>
CNF1	– cytotoxický nekrotizující faktor 1
DAEC	– difúzně–adherentní <i>E. coli</i>
EAEC	– enteroagregativní <i>E. coli</i>
EHEC	– enterohemoragická <i>E. coli</i>
EIEC	– enteroinvazivní <i>E. coli</i>
EPEC	– enteropatogenní <i>E. coli</i>
ESBL	– širokospektré β -laktamázy (z angl. extended spectrum β -lastamases)
ETEC	– enterotoxigenní <i>E. coli</i>
ExPEC	– extraintestinální patogenní <i>E. coli</i>
HEp-2	– lidské epiteliální buňky typu 2
HUS	– hemolyticko-uremický syndrom
IPEC	– intestinální patogenní <i>E. coli</i>
IS	– inzerční sekvence
MBL	– metallo- β -laktamázy
MGE	– mobilní genetické elementy
MLEE	– multilokusová enzymatická elektroforéza
MLST	– multilokusová sekvenční typizace
NGS	– sekvenování nové generace (z angl. next-generation sequencing)
NMEC	– <i>E. coli</i> vyvolávající novorozeneckou meningitidu (z angl. neonatal meningitis <i>E. coli</i>)
PAI	– ostrovy spojené s patogenií (z angl. pathogenicity associated islands)

PBP	- Proteiny vázající penicilin (z angl. penicillin-binding protein)
SEPEC	- <i>E. coli</i> vyvolávající sepse (z angl. sepsis-associated <i>E. coli</i>)
ST	- sekvenční typ
Stx	- Shiga toxin
UPEC	- uropatogenní <i>E. coli</i>
WGS	- celogenomové sekvenování (z angl. whole genome sequencing)

1 Úvod

Escherichia coli nese název podle svého objevitele, Theodora Eschericha (185–1911), který se zabýval mikrobiologií a pediatrií. Roku 1884 začal studovat přirozenou mikroflóru intestinálního traktu u dětí a její změny bezprostředně po narození. Během svého výzkumu objevil a popsal bakterii, která kolonizovala střevo novorozence již během několika hodin po narození. Tuto bakterii nazval *Bacterium coli commune* (později přejmenovaná na *Escherichia coli*).

E. coli se stala v biologii velmi oblíbenou a často používanou bakterií, díky svým schopnostem rychlého růstu a snadné kultivace. Je také široce dostupná, protože její nepatogenní kmeny žijí běžně jako komenzálové lidského střeva. Z těchto a mnoha dalších důvodů byla *E. coli* na počátku 20. století označena jako modelový organizmus pro mikrobiologii a také genetiku.

Komenzální *E. coli* se u člověka a dalších savců vyskytuje jako součást běžné mikroflóry a většinou nezpůsobuje žádná onemocnění. Výjimkou mohou být například imunokompromitovaní jedinci. Řada kmenů této bakterie je však patogenní a mohou způsobovat širokou škálu intestinálních i extraintestinálních onemocnění.

Problémem u extraintestinálních patogenních kmenů je také narůstající rezistence k antimikrobiálním látkám. Rozšířené jsou především enzymy širokospektrých β -laktamáz, které zprostředkovávají rezistenci k několika běžně používaným antibiotikům. Rizikovým faktorem jsou ale hlavně karbapenemázy, které kromě karbapenemů vyvolávají rezistenci ke všem β -laktamovým antibiotikům a často i k fluorochinolonům. Geny pro rezistenci k antibiotikům se liší v rámci jednotlivých epidemických linií extraintestinální *E. coli*, které jsou globálně rozšířeny a způsobují komunitní i nemocniční infekce močových cest, krevního řečiště nebo novorozenecké meningitidy.

Cílem této bakalářské práce je shrnout dostupné informace o extraintestinální *E. coli*. Práce se věnuje patogenitě a mechanismům virulence, stručně shrnuje onemocnění, které *E. coli* vyvolává a popisuje metody její typizace. Zabývá se také mechanismy vyvolávající rezistenci k antibiotikům, které se nejčastěji vyskytují u extraintestinální *E. coli*. V poslední části jsou shrnuty poznámky o některých významných sekvenčních typech.

2 Charakteristika *E. coli*

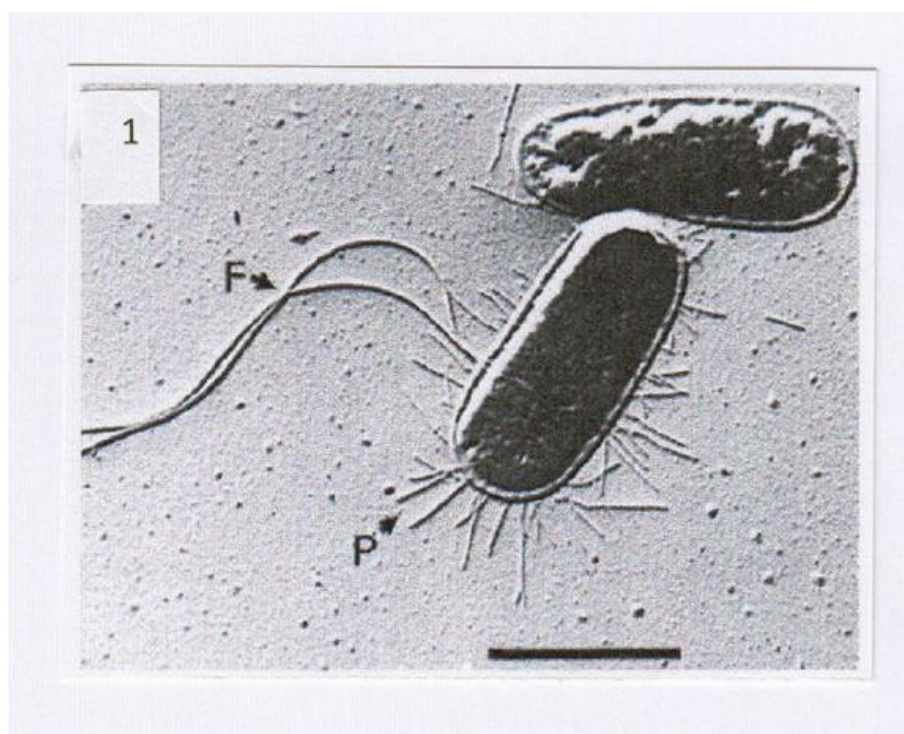
2.1 Taxonomie a rozšíření

Taxonomicky je *E. coli* řazena do rodu *Escherichia*, patřící do čeledi Enterobacteriaceae, řádu Enterobacterales, třídy Gammaproteobacteria a kmene Proteobacteria. Zástupci čeledi Enterobacteriaceae jsou celosvětově rozšíření, nacházející se v půdě, vodě, ovoci i zelenině, zrnech, rostlinách, červech a hmyzu, zvířatech až po člověka. Jsou velmi rozmanití, co se týče jejich ekologie či patogenity. Zástupci této čeledi způsobují intestinální onemocnění, nejčastěji průjmová, ale i extraintestinální, jako například meningitidy, infekce močových cest, respiračního traktu nebo ran (Sedláček, 2007; Soutar & Stavrinides, 2020).

2.2 Morfologie

E. coli je jednobuněčná bakterie tvaru rovné tyčky a vyskytuje se jednotlivě nebo ve dvojicích. Některé kmeny, především extraintestinální, jsou obklopeny polysacharidovou kapsulou (Greenwood, 2012; Sedláček, 2007).

Většina kmenů *E. coli* je pohyblivá pomocí peritrichálně umístěných bičíků. Na svém povrchu má také fimbrie neboli pili, což jsou tenké štětinovité výběžky (Obr. 1). Některé typy fimbrií mohou zprostředkovávat adhezi k různým typům buněk (např. buňky střevního nebo urogenitálního traktu). Právě adheze je jedna z důležitých složek patogenity. Dále na povrchu *E. coli* rozeznáváme tzv. sex pili, struktury širší a mnohem delší než fimbrie. Mají svou funkci zejména při konjugaci, což je jeden ze způsobů přenosu genetické informace z donorové do recipientní buňky (Greenwood, 2012; Snustad & Simmons, 2017; Votava, 2005).



Obr. 1: *E. coli* s bičičky (F) a pili (P) (Mayer, 2015)

2.3 Fyziologické a biochemické vlastnosti

E. coli je fakultativně anaerobní bakterie. Barví se gramnegativně, to znamená, že její buněčná stěna je tvořena tenkou vrstvou peptidoglykanu, na které je vrstva lipopolysacharidu. Optimální teplota pro *E. coli* je 37 °C, roste však při širokém rozmezí teplot (15–45 °C) (Greenwood, 2012; Sedláček, 2007).

Je oxidáza negativní, kataláza pozitivní, metylčerveň pozitivní a citráty obvykle negativní. Jako zdroj energie využívá organické látky, je to tedy chemoorganotrof s respiratorním i fermentativním typem metabolismu. Roste na běžných neselektivních médiích a obvykle štěpí glukózu i laktózu. Na agaru MacConkey tvoří rozsáhlé červené kolonie, na Endově agaru zase nápadné purpurové kolonie (Greenwood, 2012; Sedláček, 2007).

2.4 Genom

Kompletní genom *E. coli* K-12 MG 1655 byl přečten a zveřejněn koncem 90. let 20. století. Velikost chromozomálního genomu *E. coli* K-12 dosahuje mezi 4,7–5,2 Mb a u jednotlivých kmenů se liší. Obsah G+C se pohybuje v průměru kolem 50,8 % a počet kódujících genů je přibližně 4700 (Touchon et al., 2009).

V genomu *E. coli* je také zakódována schopnost patogenity a virulence. Nebyl však nalezen žádný specifický gen pro extraintestinální onemocnění. Z toho vyplývá, že extraintestinální virulence je proces, který je vyvolán kombinací několika genů současně. Tyto informace podporují hypotézu, že extraintestinální virulence je vedlejším produktem komenzalizmu (Touchon et al., 2009).

3 Dělení *E. coli* podle patogenity a místa výskytu

Kmeny *E. coli* můžeme rozdělit na patogenní a komenzální. Patogenní kmeny se dále dělí do dvou skupin, podle místa svého výskytu, na intestinální a extraintestinální. Zvláštní skupinou jsou kmeny patogenní pro zvířata (Donnenberg, 2013).

3.1 Komenzální *E. coli*

Komenzální kmeny se nachází v intestinálním traktu člověka a dalších obratlovců a nejsou pro organizmus škodlivé. S anaerobními zástupci v mikrobiomu člověka mohou tvořit i mutualistické vztahy. Vzájemná prospěšnost spočívá v tom, že anaerobové degradují komplexní polysacharidy na monosacharidy a disacharidy, které využívá *E. coli* k růstu, zatímco *E. coli* přispívá k vytvoření anaerobního prostředí, jelikož jako fakultativně anaerobní bakterie spotřebovává kyslík. Některé studie také naznačují, že komenzální kmeny *E. coli* mohou sloužit jako bariéra proti infekci patogenem (Maltby et al., 2013).

Komenzální kmeny se vyskytují napříč všemi fylogenetickými skupinami, ale nejčastěji jsou zařazovány do skupin A, případně B1 a B2 (Rasko et al., 2008).

Z několika studií vyplývá, že patogenní kmeny *E. coli* mohly vzniknout právě z komenzálních kmenů získáním virulenčních operonů umístěných extrachromozomálně (plazmidy, bakteriofágy) nebo na bakteriálním chromozomu. Komenzální kmeny se mohou přeměnit v patogenní také náhodnou mutací v genomu. Faktory virulence se původně u ExPEC vyvinuly pravděpodobně proto, aby napomáhaly kolonizaci střev komenzální *E. coli* a jejímu přežití v normálním střevním prostředí (Duriez et al., 2001; Köhler & Dobrindt, 2011).

3.2 Intestinální patogenní *E. coli*

Intestinální patogenní *E. coli* nejčastěji způsobuje průjemová onemocnění. Kmeny intestinální patogenní *E. coli* se dělí do 6 základních a dobře popsaných skupin:

- EPEC (enteropatogenní *E. coli*)
- EHEC (enterohemoragická *E. coli*)
- ETEC (enterotoxigenní *E. coli*)
- EAEC (enteroagregativní *E. coli*)
- EIEC (enteroinvazivní *E. coli*)
- DAEC (difúzně adherentní *E. coli*) (Kaper et al., 2004)

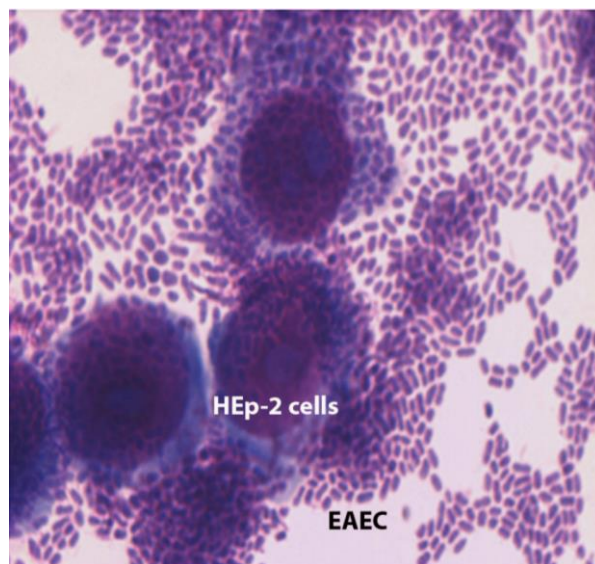
Kmeny **EPEC** způsobují průjmy, zejména u dětí, což je problém především v rozvojových zemích. Mechanismus patogeneze byl dlouho neznámý, ale v současné době patří tento patotyp mezi nejvíce probádané v porovnání s dalšími patogenními *E. coli*. Charakteristické pro tyto kmeny je, že po přichycení ke střevním epiteliálním buňkám způsobují změny v cytoskeletu (Greenwood, 2012; Kaper et al., 2004).

EHEC vyvolávají především krvácivé průjmy, kolitidy a hemolyticko-uremický syndrom (HUS). K propuknutí infekce stačí jen několik málo buněk (<100) a přenáší se například po požití nedostatečně tepelně upraveného masa, nepasterizovaného mléka nebo neočištěné zeleniny (např. ředkviček). Hlavním virulencním faktorem EHEC je Shiga toxin (Stx), který štěpí rRNA a tím inhibuje syntézu proteinů. Je produkován v tlustém střevě, odkud přechází krevním řečištěm do ledvin, kde poškozuje renální endoteliální buňky a indukuje produkci cytokinů a chemokinů. Důsledkem těchto dějů je rozvoj zánětu ledvin, který může vést až k hemolyticko-uremickému zánětu. HUS se projevuje hemolytickou anémií, trombocytopenií a v některých případech akutním selháním ledvin. Produkci Shiga toxinu můžeme nalézt i u dalších skupin *E. coli* (Donnenberg, 2013; Greenwood, 2012; Kaper et al., 2004).

ETEC způsobuje vodnaté průjmy, hlavně u dětí a turistů v rozvojových zemích. Kolonizují sliznici tenkého střeva a produkují dva druhy enterotoxinů – tepelně labilní a tepelně stabilní. Dalším patogenním znakem jsou fimbrie, které jsou specifické pro dané hostitele a způsobují snadnější přichycení k povrchu tenkého střeva. Zajímavým poznatkem je také to, že tepelně stabilní enterotoxin třídy „a“ potlačuje proliferaci rakovinných buněk tlustého střeva (Donnenberg, 2013; Greenwood, 2012; Kaper et al., 2004).

EAEC podněcuje vznik perzistentního průjmu u dětí i dospělých. Vyskytuje se v rozvojových i vyspělých státech. Tyto kmeny neprodukují tepelně labilní ani tepelně stabilní enterotoxin, ale mají schopnost tzv. auto-agregace k lidským epiteliálním buňkám typu 2. Při této auto-ag-

regaci bakterie vzájemně přiléhají k sobě do typické konfigurace „skládaných cihel“ (Obr. 2) (Greenwood, 2012; Kaper et al., 2004; Nataro & Kaper, 1998).



Obr. 2: EAEC přiléhající k HEp-2 buňkám (Navarro-Garcia et al., 2010)

EIEC vyvolává nejčastěji vodnaté průjmy a zánětlivé kolitidy, vzácně úplavici. Je geneticky podobná rodu *Shigella*, mají také společné důležité virulenční faktory. Liší se pouze v některých biochemických testech. Stejně jako u EHEC stačí malé množství buněk k vyvolání onemocnění. Skrze sliznici tlustého střeva se dostanou až k epitelíálním buňkám a endocytózou do buňky, kde způsobují lýzi vakuoly (Greenwood, 2012; Kaper et al., 2004).

DAEC způsobuje průjmová onemocnění, obvykle u dětí. Její typickou vlastností je difúzní adherence na lidské epitelíální buňky typu 2 a asi tři čtvrtiny kmenů této skupiny produkují fimbriální adhesin F1845 (Kaper et al., 2004).

3.3 Extraintestinální patogenní *E. coli*

Extraintestinální patogenní *E. coli* se dělí do několika skupin. Nejobsáhlejší skupina zahrnuje kmeny způsobující infekce močového traktu

(UPEC, z angl. uropathogenic *E. coli*). Další kmeny ExPEC vyvolávají například novorozenecké meningitidy (NMEC, z angl. neonatal meningitis *E. coli*), sepse (SEPEC, z angl. sepsis-associated *E. coli*), infekce dýchacích cest a ran (Sarowska et al., 2019; Votava, 2003).

UPEC je nejčastějším původcem infekcí spojených s močovými cestami. Vyskytují se častěji u žen než u mužů, především z důvodu kratší a širší močové trubice a tím způsobenému snadnějšímu přístupu bakterií k močovému měchýři. U mužů je nejčastější predispozicí k infekci močových cest zvětšení prostaty. Riziko infekce vzniká také při lékařských zákrocích, jako je katetrizace a cystoskopie močového měchýře nebo při sexuálním styku (Greenwood, 2012).

Kmeny způsobující tyto infekce pochází obvykle ze střeva pacienta, kde nepůsobí škodlivě. Mají ovšem virulenční geny, které způsobují onemocnění, pokud se bakterie dostane do močových cest (Donnenberg, 2013; Kaper et al., 2004).

NMEC způsobuje meningitidu u novorozenců, a to především v prvních 90 dnech života. Spolu se streptokoky ze skupiny B patří mezi nejčastější původce tohoto onemocnění. Po prodělání nemoci mohou přetrvávat neurologické následky, jako je ztráta sluchu, opožděný vývoj či kognitivní poruchy. Novorozenecká meningitida patří stále mezi choroby s vysokou úmrtností. Důležitým krokem pro vypuknutí novorozenecké meningitidy je proniknutí NMEC do centrálního nervového systému skrze hematoencefalické bariéry. Tato bariéra slouží k oddělení mozkové tkáně a cévního systému a skládá se z mozkových mikrovaskulárních endoteliálních buněk, bazální laminy, zakončení astrocytů a pericytů. Aby byla bakterie schopná průniku skrze hematoencefalické bariéry, musí mít vyvinuty specifické virulenční faktory, jako jsou proteiny Ibe, OmpA, CNF1 nebo FimH. Tyto faktory jsou schopny reagovat s receptory na povrchu mozkových endoteliálních buněk a pomocí transmembránových proteinů proniknout do buňky. Příkladem tohoto transmembránového proteinu je Caspr1, na který se váže protein IbeA (Ouchenir et al., 2017; Zhao et al., 2018).

SEPEC vyvolává sepsi u novorozenců i dospělých lidí. Sepse je závažná reakce hostitele na infekci, která může vést až k selhání orgánů. Bakterie způsobující sepsi musí mít virulenční faktory, které způsobují rezistenci nebo destrukci hostitelského obranného systému. (Ananias & Yano, 2008)

3.4 Patogenní *E. coli* pro zvířata

Obecně se nejčastěji u zvířat vyskytují patogenní kmeny *E. coli* patřící do fylogenetické skupiny B2. Kromě zemědělských zvířat, jako jsou prasata či drůbež, napadají ExPEC i volně žijící či domácí zvířata.

3.4.1 Ptačí patogenní *E. coli*

Zvláštní skupinou jsou kmeny *E. coli*, které jsou patogenní pro ptáky. Skupina APEC je fylogeneticky blízce příbuzná ExPEC, se kterou dokonce sdílí některé společné virulenční geny (Sarowska et al., 2019).

APEC způsobuje ptačí kolibacilózu, což je syndrom s několika typickými příznaky. Objevují se například orgánové léze, airsakulitida, perikarditida, perihepatitida a peritonitida. Problém nastává především u chovu drůbeže, kde toto onemocnění způsobuje celosvětově významné ztráty (Ewerst et al., 2003).

3.4.2 Prasečí patogenní *E. coli*

U prasat se objevují intestinální i extraintestinální kmeny *E. coli*. Mezi intestinální patří například enteropatogenní kmeny *E. coli*, které způsobují enterickou kolibacilózu nebo Shiga-toxin produkující *E. coli*. Mezi ExPEC izolovaných z prasat patří ST95, ST354 nebo ST1011. Více než 50 % ExPEC izolátů pocházejících z prasat patří do fylogenetické skupiny A a B1. Onemocnění prasat kolibacilózou způsobuje stejně jako u drůbeže velké ztráty v zemědělství, v posledních letech se její výskyt zvyšuje především v Číně (Zhu et al., 2017).

3.4.3 Patogenní *E. coli* u psů a koček

Také u psů a koček byly nalezeny izoláty vyvolávající extraintestinální onemocnění, například infekce močových cest nebo zánět středního ucha. Příkladem lze uvést ST131, ST167 nebo ST648. Byly zaznamenány také případy, kdy byl ze psa i z jeho majitelů izolován identický multirezistentní kmen *E. coli*. Přenos v tomto případě proběhl pravděpodobně z člověka na psa, jelikož daný izolát vykazoval rezistenci ke karbapenemovým antibiotikům, která se u zvířat nevyskytuje příliš často. Používání tohoto typu antibiotik je navíc ve veterinární praxi zakázáno, proto není

příliš pravděpodobné, že by se u nich rezistence ke karbapenemům vyvinula z důvodu častého používání těchto antibiotik (Grönthal et al., 2018; Marques et al., 2018).

3.4.4 Další zvířecí patogenní *E. coli*

Patogenní kmeny *E. coli* (především Stx produkující *E. coli*) se vyskytují i u dalších hospodářských zvířat, například ovcí, koz či skotu. Zde nastává problém především u nepasterizovaného mléka či nedostatečně tepelně upraveného masa, skrze které může docházet i k přenosu na člověka. (Heredia & García, 2018).

4 Patogenita

Patogenita je definována jako schopnost mikroorganismu vyvolat onemocnění a virulence jako stupeň patogenity. Aby byla patogenita mikroorganismu co největší, musí být splněny určité předpoklady a daný mikroorganismus musí mít vyvinuty mechanismy patogenity. Prvním předpokladem je přenosnost, dalším invazivita a třetí je toxicita patogenu. Důležitým faktorem je také schopnost přežití patogenu v hostitelském organismu (Donnenberg, 2013; Greenwood, 2012; Votava, 2005).

Patogeny dělíme na oportunní a primární. Zatímco oportunní patogeny nevyvolávají onemocnění vždy, pouze při poškození nebo nesprávné funkci imunity a anatomie hostitele, primární patogeny vyvolávají onemocnění i při setkání se zdravým jedincem. Extraintestinální *E. coli* se řadí mezi oportunní patogeny (Greenwood, 2012; Köhler & Dobrindt, 2011).

4.1 Virulenční faktory ExPEC

Extraintestinální patogenní *E. coli* má široké spektrum virulenčních faktorů. Jsou to například toxiny, adheziny, systémy získávání železa, lipopolysacharidy, polysacharidové kapsuly a invaziny, plazmidy a další genetické elementy (Sarowska et al., 2019).

Velká část virulenčních faktorů se nachází na tzv. ostrovech spojených s patogenitou (PAI, z angl. pathogenicity associated islands). PAI se vyskytují v blízkosti genů *pheV*, *pheU* a *asnT* kódující tRNA. Ostrov patogenity v blízkosti *pheV* nese geny pro tvorbu fimbrií, syntézu aerobaktinu, hemolyzinu, kapsuly a dvou autotransportérů. Ostrov patogenity poblíž *pheU* má stejně jako ten u *pheV* geny pro tvorbu fimbrií a receptorů pro siderofory. Třetí ostrov patogenity nacházející se u genu *asnT* obsahuje geny pro yersiniabaktin (Donnenberg, 2013).

4.1.1 Adherence

Adherence je schopnost mikroorganismu pevně přilnout k povrchu epitelu. Tato vlastnost je důležitá zejména pro kmeny UPEC při přilnutí k urotelu (Kaper et al., 2004).

Adherence může být uskutečňována dvěma způsoby. První z nich je pomocí fimbrií či fibril. Fimbrie jsou duté tyčinkovité struktury na povrchu bakteriální buňky asi 5 nm silné a 100 nm dlouhé. Fibrily jsou ještě tenčí, mají 2-4 nm v průměru a jsou dlouhé a pevné nebo pružné. Mechanismus přilnutí v tomto případě spočívá v tom, že konec fimbrie se specificky naváže na receptor na povrchu epitelu, kterým je obvykle uhlovanový zbytek glykoproteinu či glykolipidu. Tím dojde k přilnutí bakterie k buňce. Vysoká specifita vazby mezi fimbriemi bakterie a receptorem buňky je typická pro daný druh bakterie (Kaper et al., 2004; Votava, 2005).

Obecně pro kmeny *E. coli* jsou charakteristické fimbrie typu 1. Významnou roli hrají během infekcí močového traktu, jelikož zprostředkovávají vstup do hostitelské buňky a její následné poškození. Napomáhají také přilnutí a setrvání bakterie na povrchu různých typů tkání močového traktu. Příkladem je proximální tubulus, distální tubulus, sběrný kanálek nebo stěny cév. Fimbrie typu 1 jsou složeny z proteinů FimA, FimF, FimG a FimH. Nejpočetnější je skupina FimA proteinů, ale ty nejsou stěžejní pro virulenci. FimH samotný nebo společně s proteinem vázajícím lipopolysacharidy může stimulovat Toll-like receptor 4 a zahájit tak signální kaskády vedoucí k humorální imunitní odpovědi (Behzadi & Carevic, 2019).

Druhý způsob adherence je pomocí nefimbriálních adhezínů, které je těžké vizualizovat. Některé z nich se vážou na proteiny na povrchu eukaryotických buněk. Příkladem tohoto proteinu je intimin u UPEC či EHEC (Kaper et al., 2004; Votava, 2005).

4.1.2 Toxiny

Toxiny a další efektorové proteiny vylučované bakteriemi spouští a modulují signální transdukční cesty, které ovlivňují základní eukaryotické procesy. Toxiny se vyskytují jak u intracelulární *E. coli*, například u kmenů ETEC či EHEC, tak u extraintestinální *E. coli*, především u UPEC a NMEC (Kaper et al., 2004).

U ETEC se vyskytují dva typy toxinů, tepelně stabilní a tepelně labilní, které zvyšují koncentraci intracelulárních messengerů (např. cAMP, cGMP, Ca²⁺), což vede k sekreci iontů. Kmeny ETEC produkují jeden z těchto dvou toxinů nebo oba zároveň. Další skupinou intestinální *E. coli*, pro kterou jsou charakteristické toxiny, je EHEC. Produkují Shiga

toxin, který štěpí rRNA a narušuje tak syntézu proteinů a ničí intoxikované epiteliální či endoteliální buňky. U EHEC a EPEC se vyskytuje také toxin Cif, který je schopen blokovat dělení buněk v G2/M fázi buněčného cyklu (Kaper et al., 2004).

U ExPEC se vyskytuje velké množství toxinů plnící různé funkce. Mezi ty nejčastější patří cytotoxické nekrotizující faktory 1 a 2, termolabilní hemaglutinin TSH, hemolyzin- α , hemolyzin D a F, sekrenovaný autotransportní toxin SAT, kolonizující proteázy PIC, autotransportní toxin VAT vyvolávající tvorbu vakuol, cytolethal distribuující toxiny CDT, cytolyzin A, plazmidem kódovaný toxin PET, Shigella enterotoxin-1 a arginin sukcinyl-transferáza (Behzadi & Carevic, 2019; Kaper et al., 2004; Sarowska et al., 2019).

Cytotoxický nekrotizující faktor 1 se často vyskytuje u uropatogenních kmenů *E. coli* způsobujících infekce močového traktu. Tento toxin napomáhá vstupu *E. coli* do buňky a působí na aktinový skelet lidských epiteliálních buněk typu 2 a vytváří v nich velké vakuoly. CNF1 může vyvolávat až apoptickou smrt epiteliálních buněk močového měchýře a způsobuje také exfoliaci buněk močového měchýře, což napomáhá lepšímu přístupu bakterií k hlubší tkáni (Behzadi & Carevic, 2019).

Hemolyzin- α (HlyA) je lipoprotein a patří mezi RTX toxiny. Poškozuje buněčnou membránu a způsobuje apoptózu. HlyA může lyzovat erythrocyty a nukleované hostitelské buňky (Behzadi & Carevic, 2019).

Sekrenovaný autotransportní toxin SAT je autotransportér serinové proteázy, který je spojen s pyelonefritickými kmeny *E. coli*. SAT může způsobovat cytopatický efekt vedoucí k poškození hostitelské tkáně. Je také schopen usnadnit vstup pyelonefritických kmenů do krevního oběhu (Behzadi & Carevic, 2019; Sarowska et al., 2019).

Cytolethal distribuující toxin CDT poškozuje DNA cílové buňky. Zastavuje buněčný cyklus a zvyšuje patogenitu UPEC. Je složen ze tří proteinů zahrnující CdtA, CdtB a CdtC. CDT má enzymatickou aktivitu podobnou DNáze I a napadá přímo DNA. Většina bakteriálních toxinů napadá buněčnou membránu nebo jiné struktury v cytoplazmě. Poškození DNA vede následně k buněčné smrti (Behzadi & Carevic, 2019).

Toxiny jsou z cytoplazmy bakterií transportovány do hostitelské buňky několika mechanizmy. Například tepelně labilní enterotoxin je vylučován do extracelulárního prostředí sekrečním systémem typu II. Některé toxiny patří do skupiny autotransportérů, což znamená, že jedna jeho část vytváří „ β -barrel“ ve vnější membráně a ten umožňuje druhé

části průchod do extracelulárního prostoru. Další skupinou jsou auto-transportní serinové proteázy Enterobacteriaceae, produkovány kmeny DAEC a UPEC. Sekreční systém typu III se vyskytuje u EPEC, EHEC a EIEC. Je to složitý systém více než 20 proteinů tvořících aparát „jehly a stříkačky“, který zprostředkovává vstup efektorových proteinů do hostitelské buňky. Sekreční mechanismus typu I má hemolyzin- α u UPEC a používá TolC k exportu z buňky, čímž způsobuje lýzi buňky. Sekreční systém typu IV nebyl u patogenní *E. coli* popsán (Kaper et al., 2004).

4.1.3 Systémy získávání železa

Stejně jako v lidském organismu hraje železo významnou roli také v bakteriální buňce. *E. coli* využívá železo k transportu a uchování kyslíku, syntéze DNA, transportu elektronů a při metabolismu peroxidů. Při jeho nedostatku ztrácí své adaptivní schopnosti v důsledku porušení buněčných kapsul. Bakterie si však vyvinuly mechanismy pro získávání železa v těle hostitele (Terlizzi et al., 2017).

Kmeny ExPEC mají membránové pumpy, které přenáší železo do buňky. Například pumpa FeoAB nebo transportéry SitABCD, Hma a ChuA umožňují absorpci železa přímo z extracelulárního hemu. Další možností pro nepřímý příjem železa jsou specializované systémy fungující na základě tzv. kyvadlového mechanismu, zahrnujícího malé molekuly s vysokou afinitou k iontům železa, zvané siderofory (Sarowska et al., 2019).

Siderofory jsou molekuly chelatující trojmocné železo. Pro kolonizaci močového traktu bakteriemi UPEC je nezbytné využití železa, získaného pomocí sideroforů. U *E. coli* se vyskytují 4 skupiny sideroforů: yersiniabaktin, aerobaktin, enterobaktin a salmochelin. Tyto siderofory jsou produkovány bakteriemi v prostředí s nízkou koncentrací železa a jsou negativně regulovány Fe^{2+} a regulátory vychytávající železo. Zajímavostí je, že se nevyskytují pouze u prokaryot, ale také u hub a rostlin (Terlizzi et al., 2017).

Yersiniabaktin byl původně detekován u *Yersinia pestis*. Je to smíšený typ sideroforu a je rozšířený mezi zástupci čeledi Enterobacteriaceae. Yersiniabaktin má vysokou afinitu k železu a vytváří komplex yersiniabaktin- Fe^{3+} . Molekula železa rozpozná specifický receptor na vnější bakteriální membráně a následně je uvolněna z yersiniabaktinu do cytozolu bakterie. Má také schopnost bránit bakteriální buňky před imunitní reakcí hostitele (Sarowska et al., 2019; Terlizzi et al., 2017).

Aerobaktin váže Fe^{3+} nejlépe v kyselém prostředí a jeho nejvyšší produkce je při nízkých hodnotách pH. Tento siderofor odebírá Fe^{3+} z hostitelských proteinů vázajících železo a je absorbován skrz vnější membránový receptorový protein. Aerobaktin se skládá ze dvou molekul lyzinu a jednoho citrátu katalyzovaného enzymem aerobaktin syntáza. Stejně jako salmochelin je kódován virulenčními plazmidy CoIV a CoIBM. Aerobaktin má oproti enterobaktinu vyšší efektivitu při zachycování železa (Sarowska et al., 2019; Terlizzi et al., 2017).

Enterobaktin se nachází prakticky ve všech *E. coli*, a to jak patogenních, tak komenzálních. Je méně rozpustný a méně stabilní než aerobaktin, ale má vyšší afinitu k železu. Železo je z enterobaktinu uvolněno skrze hydrolýzu sideroforu. Enterobaktin umožňuje UPEC kolonizovat prostředí s nízkou koncentrací železa, jako je právě močový trakt. Limitací tohoto sideroforu je, že může být inaktivován hostitelskými proteiny (např. sérum albuminu a siderokalinu). Enterobaktin a salmochelin je syntetizován také dalšími patogenními střevními bakteriemi, např. *Salmonella* spp. nebo *Klebsiella* spp. (Sarowska et al., 2019; Terlizzi et al., 2017).

Salmochelin, jak již název napovídá, byl poprvé objeven u bakterie *Salmonella* spp. U ExPEC se salmochelin vyskytuje často a je označován jako charakteristický faktor virulence. Je kódován genovým klastrem *iroBCDEN* umístěným na virulenčních plazmidech CoIV a CoIBM nebo na PAI. *IroB* je jediný gen s glykosyltransferázovou aktivitou, která je nezbytná pro produkci salmochelinu, jelikož salmochelin je glykosylovaný derivát enterobaktinu. Glykosylací se mění jeho vlastnosti z hydrofobních na hydrofilní, což zvyšuje virulenci ExPEC. Dále díky glykosylaci enterobaktinu není salmochelin rozpoznán siderokalinem, a tudíž není zastižen hostitelským imunitním systémem (Sarowska et al., 2019; Terlizzi et al., 2017).

4.1.4 Kapsula

Kapsula se skládá především z polysacharidů a její primární funkcí je ochránit bakterie před vnějšími nepříznivými podmínkami. Kapsula poskytuje ochranu před fagocytózou a baktericidním účinkem hostitele, zahrnující také antimikrobiální rezistenci a účinky antiséra (Sarowska et al., 2019).

U kmenů ExPEC se vyskytuje specifická struktura polysacharidových kapsulí, umožňující napodobování složek hostitelské tkáně, čímž

ztěžuje rozpoznání bakterie imunitním systémem. Některé kmeny *E. coli* jsou schopny exprimovat kapsulární K1 antigen, který je spojován s výskytem novorozenecké sepse. K1 antigen je kódován genem *neuC*, přičemž za tvorbu kapsulí K1 je zodpovědných celkem 14 *kps* operonů. Proteiny potřebné pro translokaci polymeru z místa syntézy na povrch buňky jsou kódovány genem *kpsMTII*. Na základě výsledků studií, zabývajících se genotypizací kmenů NMEC, bylo zjištěno, že všechny izoláty mají schopnost napadat endoteliální buňky lidského mozku a více než 70 % z nich nese geny *kapsII*, *K1*, *neuC*, *iucC* a *sit*. NMEC mají také schopnost tvorby biofilmu (Sarowska et al., 2019; Terlizzi et al., 2017).

5 Typizace *E. coli*

Typizační metody by měly v případě bakterií umožnit rychlé a přesné stanovení patogenu, jeho evoluční historii, zdatnost a patogenní potenciál. Metod typizace *E. coli* je několik (např. zařazení do sérotypů, fylogenetických skupin nebo sekvenčních typů) a s postupným rozvojem technologií se dále vyvíjejí (Dale & Woodford, 2015; Köhler & Dobrindt, 2011).

V současnosti se nejčastěji využívají metody založené na sekvenaci DNA, které zařazují izoláty do jednotlivých sekvenčních typů. Roku 1977 byla publikována sekvenační metoda podle Sangera, tzv. metoda sekvenace první generace, která zahrnovala fluorescenční značení molekul a využití kapilární elektroforézy. Pomocí automatizace těchto procesů bylo docíleno analýzy více vzorků současně. Nevýhodou však bylo omezení sekvenace na 1000 bazí. Další vývoj se tedy zaměřil na vytvoření efektivnějších metod pro sekvenování dlouhých částí DNA (např. celých chromozomů) (Kwong et al., 2015; Moraes & Góes, 2016).

5.1 Sérotypizace

V 70. letech minulého století se začala využívat sérotypizace na základě přítomnosti či nepřítomnosti antigenů pro somatické lipopolysacharidy (O), bičinky (H) a kapsuli (K). Bylo popsáno již více než 200 O-antigenů, 50 H-antigenů a 80 K-antigenů. K-antigeny se dále dělí do 2 skupin (I a II), dříve označovaných jako A a L. Některé typy antigenů se u *E. coli* nevyskytují náhodně, ale jsou častěji spojovány s určitým typem onemocnění (Greenwood, 2012; Sarowska et al., 2019).

5.2 Multilokusová enzymatická elektroforéza

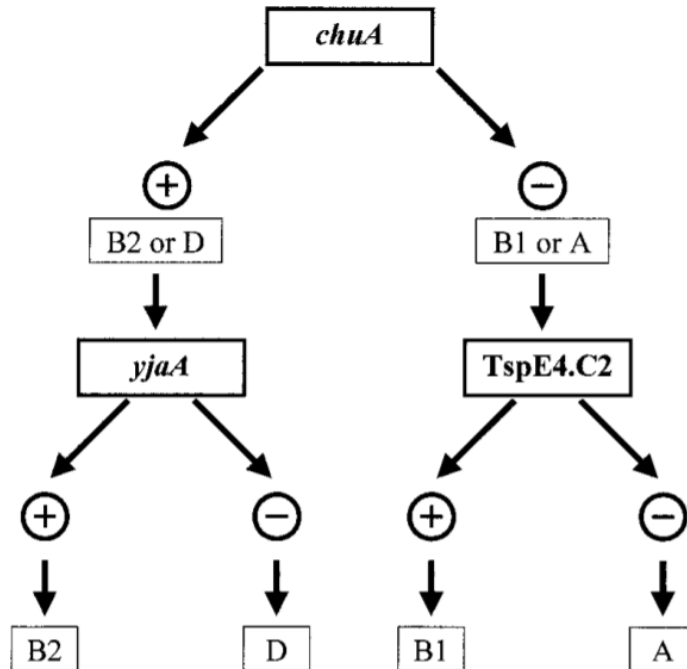
Bakteriální typizace MLEE (z angl. multi-locus enzyme electrophoresis) funguje na principu měření elektroforetické mobility enzymů. Na jejím základě byla vytvořena referenční sbírka 72 kmenů *E. coli* označována jako ECOR (z angl. *E. coli* reference). Několik kmenů pocházelo i ze zvířat a byly zahrnuty jak patogenní (UPEC), tak komenzální formy. Díky následné analýze byly rozlišeny 4 hlavní fylogenetické skupiny: A, B1, B2 a

D. MLEE byla také prospěšná při zařazení ExPEC do skupin B2 a D a IPEC do skupin A a B1. Oproti skupinám A a B1 se skupiny B2 a D vyznačují také častějším výskytem a větší diverzitou ve virulenci (Clermont et al., 2011; Chaudhuri & Henderson, 2012; Köhler & Dobrindt, 2011; Le Gall et al., 2007).

MLEE se s vývojem nových sekvenačních metod postupně přestala používat, jelikož data vycházející z MLEE nejsou pro fylogenetickou analýzu ideální. Enzymy s nízkou sekvenční podobností totiž mohou vykazovat obdobnou elektroforetickou mobilitu. Mnohem vhodnější jsou proto nukleotidové a aminokyselinové sekvence, protože poskytují informace o charakteru několika lokusů a není příliš pravděpodobné, že by podléhaly konvergenci (Chaudhuri & Henderson, 2012).

5.3 Multiplexní PCR

Roku 2000 se pro typizaci *E. coli* začala využívat metoda tzv. triplexní PCR, která je mnohem rychlejší, jednodušší a levnější než MLEE. Touto metodou zjišťujeme přítomnost či nepřítomnost genů *chuA*, *yjaA* a DNA fragmentu TSPE4.C2. Gen *chuA* se vyskytuje u skupin B2 a D, ale nenajdeme jej u skupin A a B1. K rozlišení mezi skupinami B2 a D slouží gen *yjaA*, který se vyskytuje u B2, ale ne u skupiny D a DNA fragment TSPE4.C2 je přítomný u izolátů skupiny B1, ne u izolátů ze skupiny A (Obr. 3) (Dale & Woodford, 2015; Chaudhuri & Henderson, 2012).



Obr. 3: Zařazení *E. coli* do fylogenetické skupiny (Clermont et al., 2000)

Díky této metodě můžeme *E. coli* rozřadit do 4 základních fylogenetických skupin. V současnosti však víme, že existuje minimálně 7 fylogenetických skupin pro *E. coli*, a to A, B1, B2, C, D, E, F. Z toho důvodu byla metoda triplex PCR vylepšena přidáním genu *arpA*, čímž se změnila na quadplex PCR, která společně s PCR specifickou pro dvě alely (pro fyloskupiny C a E) umožnila vymezení všech sedmi fyloskupin (Clermont et al., 2015; Turrientes et al., 2014).

Multiplexní PCR se používá v mikrobiologických epidemiologických laboratořích při rutinním zařazení *E. coli* do fylogenetických skupin (Turrientes et al., 2014).

5.4 Multilokusová sekvenční typizace

V současnosti je jednou z nejpoužívanějších metod pro typizaci *E. coli* multilokusová sekvenční typizace, která zahrnuje sekvenaci vybraných „housekeeping“ genů na bakteriálním chromozomu. Sekvenuje se 5–8

těchto genů, nejčastěji však 7. Tato metoda umožnila podrobnější analýzu linií ExPEC a zařazuje izoláty do sekvenčních typů (ST), které jsou definovány jako izoláty s identickými alelickými profily a do klonálních komplexů (CC) definovaných jako skupiny nejméně 3 sekvenčních typů, které se od sebe liší o méně než 1 alelu ze 7 (Dale & Woodford, 2015).

„Housekeeping geny“ se používají především proto, že jsou pod silnou purifikační selekcí a pozorované variace budou pravděpodobně selektivně neutrální. Problémem při využití MLST pro fylogenetické studie je, že získané výsledky jsou silně ovlivněny volbou genů použitých pro MLST schéma, které nemusí být reprezentativní pro celkový genom. Některé geny se mohou překrývat s místy, kde je častější výskyt homologní rekombinace (Chaudhuri & Henderson, 2012).

Pro *E. coli* existují 3 databáze/schéματα MLST, které staví na rozdílných kombinacích genů, a společný mají pouze gen *icd*. První databáze, EcMLST, vytvořená Thomase Whittmanem (Michigan State University), byla určena především pro EPEC. Zbylé dvě se nezaměřují na žádnou konkrétní skupinu *E. coli*. Jednu z nich vytvořili Sylvain Brisse a Erick Denamur (Pasteur Institute), druhou vytvořil Marek Achtman (Warwick Medical School). Právě Achtmanovo schéma je pro *E. coli* tím nejpoužívanějším. Zaměřuje se na kombinaci genů *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* a *recA* (Clermont et al., 2015).

Pomocí MLST analýzy lze odvodit klonální linie ExPEC s vysokou virulencí, ale není možné je jasně odlišit od nepatogenní *E. coli*. To potvrzuje myšlenku, že kmeny ExPEC jsou fakultativní patogeny a mají původ právě u komenzálních kmenů. MLST poskytuje data také o tom, že fylogenetická skupina B2 reprezentuje nejstarší evoluční linii v rámci druhu (Köhler & Dobrindt, 2011).

5.5 CH typizace

Roku 2012 Weissman et al. popsali novou metodu zvanou CH typizace. V jejich studii je popisováno schéma sekvenční typizace dvou lokusů *E. coli*, které využívá 489 nukleotidový fragment *fimH* (kódující fimbrie typu 1) a 469 nukleotidový *fumC* fragment, jenž se používá ve standardní MLST. Tento přístup poskytuje více haplotypů než standardní 7-lokusová MLST, rozděluje velké skupiny ST do několika klonálních podskupin a v rámci ST rozlišuje různé ekotypy a patotypy. Kromě toho specifické

CH profily odpovídají specifickým ST nebo komplexům ST s 95 % přesností, což umožňuje predikci profilů MLST (Dale & Woodford, 2015; Weissman et al., 2012).

CH typizace zřejmě nenahradí MLST při fylogenetických studiích, ale má značné výhody, zejména při vymezení klonů v rámci ST. Má také nižší náklady, proto může být využita při provedení předběžných studií u větších sbírek klinických vzorků (Dale & Woodford, 2015).

5.6 Celogenomové sekvenování

WGS (z angl. whole genome sequencing) poskytuje nejpřesnější výsledky pro charakterizaci kmenů a pro epidemiologické a fylogenetické analýzy. Poskytuje obrovské množství sekvencí genomu, a to díky veřejným i soukromým projektům po celém světě a je významné nejen pro sekvenaci bakteriálních genomů, ale také toho lidského (Dale & Woodford, 2015).

Zkoumá přítomnost či nepřítomnost jednotlivých genů a nabízí definitivní a semikvantitativní srovnání mezi izoláty, např. skrze srovnávací studie s jednonukleotidovým polymorfismem (Dale & Woodford, 2015).

Celogenomové sekvenování patří mezi metody sekvenování nové generace (NGS, z angl. next-generation sequencing), které sekvenují nukleotidy rychleji a levněji než výše zmíněné Sangerovo sekvenování. NGS poskytuje větší prostupnost dat s nižšími náklady. Na rozdíl od sekvenování první generace, NGS nevyžaduje bakteriální klonovací postup a přípravu knihovny pro sekvenování v bezbuněčném systému. NGS zpracovává miliony sekvenčních reakcí paralelně a detekce bazí je prováděna cyklicky a souběžně. Díky těmto vlastnostem je celogenomové sekvenování prováděno v krátkém časovém období. Pro vývoj a mapování genomu z relativně krátkých čtení musely být vyvinuty nové srovnávací algoritmy (Park & Kim, 2016).

Velký význam má také interpretace dat pomocí bioinformatických softwarů a databází, které poskytly vědcům nové příležitosti na poli genomiky. Technologiemi NGS se zabývá několik společností, mezi ty nejznámější patří například Roche, Life Technologies či Illumina (Park & Kim, 2016).

WGS se používá čím dál častěji, díky snižujícím se nákladům na provedení této metody. Předpokládá se, že postupem času nahradí i MLST a

další metody založené na PCR, ale z důvodu standardizace se nomenklatura ST odvozená z dobře zavedených schémat MLST pravděpodobně zachová (Clermont et al., 2015; Dale & Woodford, 2015).

Celogenomové sekvenování nám napomáhá rozšířit znalosti o infekčních chorobách a klinické mikrobiologii. Tato metoda se nejčastěji používá ve zdravotnických laboratořích, referenčních laboratořích a laboratořích pro kontrolu nemocničních infekcí. WGS je také významným krokem pro vznik personalizované medicíny a pro předvídání, prevenci, diagnostiku a léčbu onemocnění (Kwong et al., 2015).

6 Antimikrobiální látky a rezistence

Pojem antibiotika byl poprvé použit Selmanem Waksmanem roku 1941 a vyjadřoval jakoukoliv malou molekulu produkovanou mikroby, která potlačovala růst dalších mikrobů. Antibiotika přirozeně produkují některé bakterie a fungi. Používají se k léčbě či prevenci bakteriálních infekcí a mají několik mechanismů působení, pomocí kterých inhibují či potlačují růst bakterií. Postupem času se začaly vyrábět semisyntetické deriváty a termín „antibiotika“ byl nahrazen „antimikrobiálními látkami“, které zahrnují přírodní, semisyntetické i syntetické látky schopné inhibice mikrobů a způsobující jejich apoptózu (Clardy et al., 2009; Kourkouta, 2018).

Rezistence na antibiotika je definována jako schopnost bakterie odolávat antimikrobiálními látkám. Je vyjádřena pomocí minimální koncentrace antibiotika, která je potřebná k inhibici bakteriálního růstu. Mechanismy rezistence jsou zakódovány v bakteriálním chromozomu či mimo chromozom, na mobilních genetických elementech (např. plazmidech, transpozonech, inzerčních sekvencích). Mobilní genetické elementy jsou významné především při intercelulárním přenosu rezistence (Babakhani & Oloomi, 2018; Brauner et al., 2016).

6.1 Historie objevu antibiotik

S objevem antibiotik se medicína vyvíjela rychleji kupředu a vznikaly i nové obory. V současnosti jsou antimikrobiální látky široce využívány nejen v lékařství, ale také v zemědělství jako látky podporující či potlačující růst (Aminov, 2010).

Za počátek studia antimikrobiálních látek se považují 90. léta 19. století, kdy Rudolf Emmerich a Oscar Löw popsali první antibiotikum, pyokyanázu, pocházející z *Pseudomonas aeruginosa*. Dalším milníkem při objevu antimikrobiálních látek je lék Salvarsan, působící proti syfilis, který představil roku 1909 Paul Ehrlich. Historicky nejvýznamnější objev ale učinil až Alexandr Fleming roku 1928, a to objev penicilinu, produktu fungi *Penicillium* spp. Fleming zkoumal baktericidní účinek penicilinu na mikroorganismy a zjistil, že ovlivňuje stafylokoky a obecně grampozitivní patogeny. Až několik let po Flemingově objevu, roku 1946, dokázali vědci z Oxfordské univerzity produkovat penicilin stabilní a

v dostatečném množství pro klinickou léčbu onemocnění (Aminov, 2010; Clardy et al., 2009; Kourkouta, 2018).

Dále byl roku 1932 firmou Bayer objeven první sulfonamid a na přelomu 40. a 50. let minulého století byl objeven streptomycin a tetracyklin. V současnosti známe více než 100 antimikrobiálních látek s rozdílnými mechanizmy účinku (Kourkouta, 2018).

6.2 Mechanizmy působení antimikrobiálních látek

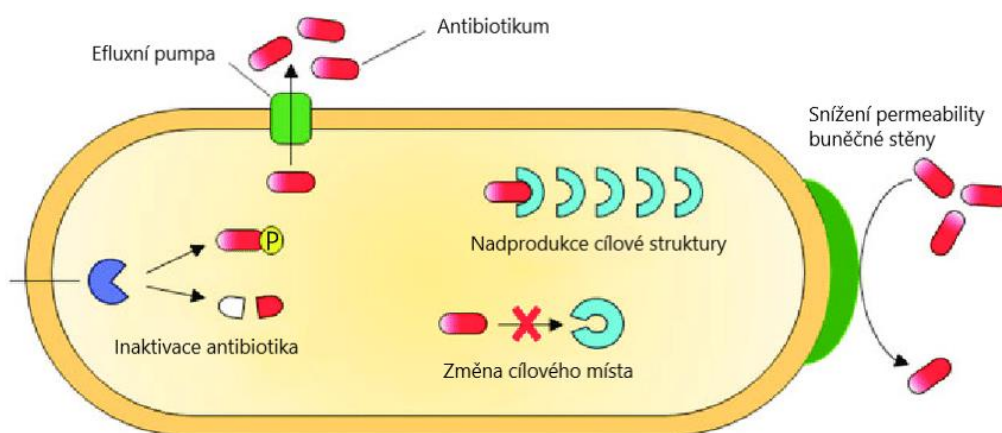
Antibiotika působí na 3 základní struktury buňky, buněčnou stěnu, nukleové kyseliny a ribozomy. Některé působí také na buněčnou membránu nebo na určité metabolické dráhy (Ebimieowei & Ibemologi, 2016; Kapoor et al., 2017).

Antibiotika působící na peptidoglykan, který je součástí bakteriální buněčné stěny, zabraňují jeho syntéze, což mohou realizovat dvěma způsoby. Tím prvním je zablokování funkce transpeptidáz, enzymů vytvářejících v peptidoglykanu vazby a druhým je navázání substrátových molekul na konce peptidových řetězců (Beneš, 2018; Kapoor et al., 2017).

Důležitou funkcí pro přepis genetické informace mají enzymy topoizomerázy a právě na ně se zaměřují antibiotika působící na nukleové kyseliny. Po přerušení jejich funkcí zůstává DNA v několika místech rozmotána a přerušena, což narušuje stabilitu celé buňky a vede k její smrti. Příkladem antibiotika z této skupiny jsou fluorochinolony, které působí na topoizomerázu II, neboli DNA-gyrázu, která přestřihává DNA a jako jediná ji dokáže pomocí postupného otáčení sbalit. Fluorochinolon se po rozpojení DNA naváže na její volné konce a znemožní topoizomeráze DNA opět spojit (Beneš, 2018; Kapoor et al., 2017).

6.3 Mechanizmy rezistence ExPEC k antimikrobiálním látkám

Bakterie mají několik mechanismů, jak se přizpůsobit účinkům antibiotik. Je to například změna cílových míst enzymů tvořících peptidoglykan, zapojení efluxních pump, omezení propustnosti buněčné stěny nebo počtu porinů či tvorba účinných enzymů inaktivujících antibiotika fosforylací nebo hydrolyticky (např. β -laktamázy). U ExPEC je nejčastějším mechanismem rezistence tvorba β -laktamáz (Obr. 4) (Beneš, 2018).



Obr. 4: Mechanizmy antibiotické rezistence (Grönthal et al., 2018, upraveno)

6.3.1 β -laktamázy a jejich klasifikace

β -laktamázy jsou enzymy vylučované bakteriemi jako nejčastější obranný mechanismus proti β -laktamovým antibiotikům. β -laktamová antibiotika se dělí do pěti skupin: peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, monobaktamy a inhibitory β -laktamáz. Inaktivují bakteriální enzymy DD-peptidázy (neboli proteiny vázající penicilin – PBP), které spojují postranní peptidové řetězce v buněčné stěně (Beneš, 2018).

Pro klasifikaci β -laktamáz se v současnosti nejčastěji používá třídění dle Amblera. Podle uspořádání aktivního centra β -laktamáz se dělí do 4 skupin (A-D). Třída A, C a D zahrnuje serinové proteázy (nejvýznamnější složka katalytického děje v aktivním centru je serin). Ve třídě B jsou metalo- β -laktamázy (enzymy se zinečnatým iontem ve středu molekuly) (Beneš, 2018).

Do třídy A patří širokospektré β -laktamázy (ESBL, z angl. extended spectrum β -lactamases) typu TEM, SHV nebo CTX-M, které hydrolyzují především peniciliny a cefalosporiny 3. generace. Součástí této skupiny jsou také karbapenemázy (KPC, GES, SME). Třída B zahrnuje metalo- β -laktamázy (např. VIM, IMP), které štěpí všechna β -laktamová antibiotika, včetně karbapenemů. Třída C sdružuje AmpC cefamycinázy, hydrolyzující cefalosporiny 3. generace, cefamyciny (cefoxitin) ale působí i na některé peniciliny. Třída D soustřeďuje ESBL (OXA-1, OXA-9), ESBL typu OXA (OXA-2, OXA-10) a karbapenemázy (OXA-48, OXA-23, OXA-24, OXA-

58). Tyto enzymy rozkládají především oxacilin, ale i ampicilin, cefalotin, peniciliny a cefalosporiny 3. generace (Beneš, 2018; Pfeifer et al., 2010).

6.3.1.1 Širokospektré β -laktamázy

Širokospektré β -laktamázy jsou enzymy hydrolyzující především cefalosporiny (3. i 4. generace), peniciliny, monobaktamy a také antibiotika s oxyiminovou skupinou v postranním řetězci (cefotaxim, ceftriaxon, cefprozid, ceftizoxim, aztreonam). Nejsou schopné hydrolyzovat cefamyciny a karbapenemy a zároveň jsou inhibovány inhibitory β -laktamáz, mezi které patří kyselina klavulanová, sulbaktam a tazobaktam (Beneš, 2018; J. Pitout, 2012).

ESBL se nejčastěji vyskytují právě u *E. coli* a *Klebsiella pneumoniae*, ale najdeme je i u dalších zástupců čeledi Enterobacteriaceae. Většina ESBL izolovaných z klinického materiálu mezi 80. – 90. lety 20. století byly typy TEM a SHV, které se původně vyvinuly z enzymů TEM-1, TEM-2 a SHV-1. Tyto enzymy vznikly mutacemi, které rozšířily jejich substrátovou specifitu (Pfeifer et al., 2010; J. Pitout, 2012).

Dalším typem ESBL jsou CTX-M β -laktamázy, které původně pochází z chromozomálního genu *Kluyvera* spp., ale postupně se rozšířily mezi další kmeny čeledi Enterobacteriaceae včetně *E. coli*. Od začátku 21. století se CTX-M β -laktamázy začaly v důsledku řady nezávislých událostí více šířit a stal se z nich celosvětově nejběžnější typ β -laktamáz. *E. coli* produkující CTX-M obvykle způsobují komunitní infekce močových cest, bakteriemi a nitrobřišní infekce. Riziko představují především kmeny, které jsou rezistentní i vůči dalším antibiotikům jako trimethoprim-sulfamethoxazolu, tetracyklinu, gentamicinu, tobramycinu nebo ciprofloxacinu. V současnosti je nejrozšířenější typ ESBL CTX-M-15, který se vyskytuje celosvětově u významných epidemických klonů (Beneš, 2018; Pfeifer et al., 2010; J. Pitout, 2012).

6.3.1.2 AmpC β -laktamázy

Na chromozomu *E. coli* se nachází gen, který kóduje AmpC β -laktamázy. Těchto β -laktamáz se obvykle produkuje malé množství, protože gen pro AmpC je regulován slabým promotorem a silným atenuátorem. AmpC působí proti penicilinům a cefalosporinům 1.–3. generace a při léčbě infekcí způsobených bakteriemi s těmito enzymy se používají cefalosporiny 4. generace, monobaktamy nebo karbapenemy. AmpC nejsou inhibovány typickými inhibitory β -laktamáz jako kyselina klavulanová,

sulbaktam či tazobaktam. Jako účinné inhibitory se ukázaly boronové kyseliny a kloxacilin (Beneš, 2018; J. Pitout, 2012).

Stejně jako bakterie produkující ESBL jsou AmpC zodpovědné za nozokomiální infekce rozšířené v 80.–90. letech minulého století. Pacienti infikovaní bakterií s AmpC β -laktamázami měli podobné klinické příznaky jako pacienti infikovaní bakteriemi produkující ESBL typu TEM a SHV (J. Pitout, 2012).

Mezi AmpC β -laktamázy patří například CMY-2, FOX-5 nebo DHA-1. Ukázalo se, že CMY-2 enzym, který původně pochází z rodu *Citrobacter* spp., je nejčastěji vyskytující se plazmidem zprostředkovaná cefamycináza u *E. coli*. Izoláty *E. coli* produkující CMY-2 jsou běžné komunitní patogeny způsobující například infekce močových cest (J. Pitout, 2012).

Gen *ampC* se nachází na chromozomu téměř všech enterobakterií. Exprese *ampC* je indukována β -laktamovými antibiotiky, např. cefotaximem. U *E. coli* se vyskytují 2 typy AmpC β -laktamáz, chromozomální a plazmidové. Exprese genů *ampC* umístěných na plazmidu zajišťuje rezistenci u druhů, které nemají gen *ampC* na chromozomu nebo u druhů s nízkou expresí chromozomálního genu (např. *E. coli*). Mezi plazmidové geny *ampC* patří ty, které kódují CMY, MIR, MOX, FOX, DHA nebo ACC. V současnosti jsou u *E. coli* nejčastější CMY a DHA β -laktamázy (Pfeifer et al., 2010).

6.3.1.3 Karbapenemázy

Karbapenemázy představují evolučně velmi staré enzymy, ale v důsledku používání antibiotik vznikly i nové karbapenemázy. Vznikly mutací a následnou změnou v aktivním centru β -laktamáz. Rizikem při šíření těchto enzymů je jejich přítomnost na plazmidech, které se snadno přenáší na další bakterie. Léčba kmenů s karbapenemázami je velmi omezená, protože tyto enzymy štěpí kromě karbapenemů i další antibiotické látky (Beneš, 2018).

Mezi karbapenemázy ze třídy A patří SME, IMI, GES a KPC. Enzymy SME jsou spojeny se *Serratia marcescens* a IMI s *Enterobacter cloacae*. GES karbapenemázy byly poprvé popsány u *K. pneumoniae*, ale vyskytují se i u *P. aeruginosa* a *E. coli*. Existuje hned několik variant KPC, ty nejrozšířenější jsou KPC-2 a KPC-3. KPC-2 byl poprvé popsán roku 2001 u *K. pneumoniae*, později byl objeven také u izolátů *Salmonella enteritica*, *K. oxytoca*, *P. aeruginosa* nebo *E. cloacae*. KPC-3 se vyskytuje také u *K. pneumoniae* (Pfeifer et al., 2010).

OXA β -laktamázy byly pojmenovány na základně jejich schopnosti hydrolyzovat oxacilin. Patří sem také oxacilinázy s rozšířeným spektrem pro cefalosporiny, které jsou obvykle odvozeny od ESBL OXA-10 nebo OXA-15. OXA karbapenemázy ze třídy D jsou například OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-51 nebo OXA-58. Původně byly OXA β -laktamázy nalezeny u *P. aeruginosa*, dnes jsou hlášeny i u dalších gram negativních bakterií včetně čeledi Enterobacteriaceae. Skupina OXA β -laktamáz je velmi různorodá, jejich geny se nachází jak na chromozomu, tak i na plazmidech. Tyto geny jsou velmi staré a jejich přesun z chromozomů na plazmidy se udál již před miliony let (Pfeifer et al., 2010).

Metallo- β -laktamázy (MBL) hydrolyzují všechny β -laktamová ATB s výjimkou monobaktamů. Na základě sekvenace DNA se dělí do 3 tříd: B1, B2 a B3. Tyto enzymy neprodukují pouze gramnegativní patogenní bakterie, ale vyskytují se i u bakterií žijících volně v přírodě. Z jednotlivých MBL ze skupiny B1 mají nejvyšší výskyt enzymy IMP a VIM, které původně pochází ze zástupců *P. aeruginosa* a *A. baumannii*. Dnes se však běžně šíří mezi zástupci čeledi Enterobacteriaceae. Většina bakterií produkujících MBL jsou rezistentní i k dalším třídám antibiotik, např. k fluorochinolonům a aminoglykosidům. Několik studií prokázalo, že Enterobacteriaceae produkující MBL byly rozšířené především v oblasti Indie a Pákistánu, ale postupem času se prostřednictvím turismu či cest za lékařskými zákroky do těchto oblastí rozšířily celosvětově (Pfeifer et al., 2010; J. Pitout, 2012).

Do budoucna vyvstává nová hrozba, a to rozšíření rezistence *E. coli* ke karbapenemům, zprostředkované metalo- β -laktamázami (např. enzymy VIM, NDM) nebo serin-karbapenemázami (např. enzymy KPC), které poskytují odolnost vůči většině nebo všem dostupným β -laktamovým antibiotikům (Ebimieowei & Ibemologi, 2016).

6.3.2 Fluorochinolony

Fluorochinolony jsou antibiotika syntetizovaná chemicky. Jejich základ tvoří dva aromatické kruhy a obvykle se odvozují od 4-chinolon-3-karboxylové kyseliny. Fluorochinolony inhibují DNA gyrázu (neboli topoisomerasu II) a topoisomerasu IV, což jsou enzymy regulující změny konformace chromozomu během replikace a transkripce. Navázání fluorochinolonů na tyto enzymy vede k jejich inaktivaci a fragmentaci DNA,

což má za následek buněčnou smrt. Geny pro rezistenci k fluorochinolonom mohou být umístěny na chromozomu nebo na plazmidu (Ebimieowei & Ibemologi, 2016; Redgrave et al., 2014).

6.3.2.1 Rezistence kódovaná chromozomálními geny

Nejčastějším mechanismem rezistence je změna cílového místa (aktivního centra) topoizomerázy, která je umožněna mutací v primární struktuře enzymu. Mutace vzniká v určité oblasti genu, který kóduje podjednotky topoizomeráz. Tato oblast se nazývá QRDR (z angl. quinolone resistance-determining region). Mutace probíhají především u genů *gyrA* a *parC*, jelikož právě tyto geny kódují oblasti, na které se vážou chinolony. U *E. coli* se významné místo QRDR na genu *gyrA* nachází mezi pozicemi aminokyselinových zbytků 67–106, u *parC* je to 63–102. K největšímu zvýšení rezistence dochází při záměně aminokyselinových zbytků na místech Ser83 a Asp87. Čím víc mutací v daných genech proběhne, tím vyšší je také schopnost rezistence k fluorochinolonom (Hooper & Jacoby, 2016).

Další, spíše podpůrný typ rezistence, je snížení počtu molekul chinolonů v bakteriální buňce. Tento mechanismus je uskutečňován snížením počtu porinů (proteinové kanály), případně změnou jejich konformace a snížením permeability buněčné stěny. Počet chinolonů může být regulován také nadprodukcí efluxních pump. Efluxní pumpy se nachází na cytoplazmatické membráně, případně i v buněčné stěně. Fungují na základě aktivního transportu, ke kterému vyžadují energii (Beneš, 2018).

6.3.2.2 Rezistence kódovaná plazmidovými geny

Plazmidem zprostředkovaná chinolonová rezistence (PMQR, z angl. plasmid-mediated quinolone resistance) byla poprvé zaznamenána roku 1998. Na multirezistentních konjugativních plazmidech se mohou nacházet geny *qnr*, kódující Qnr proteiny. Ty jsou schopny vázat se na topoizomerázu II i IV v blízkosti jejich aktivního centra a zabránit tak navázání chinolonů. Qnr proteiny mohou sloužit také jako falešné cíle pro fluorochinolony, které se na ně navážou a už nemohou inhibovat topoizomerázy (Hooper & Jacoby, 2016; Redgrave et al., 2014).

Další mechanismus PMQR využívá efluxní pumpy QepA a OqxAB. QepA byla první objevenou efluxní pumpou zvyšující rezistenci k fluorochinolonom u *E. coli* a řadí se do skupiny MFS. Transport probíhá pomocí protonmotivní síly. OqxAB se řadí do skupiny RDN a transportuje olachindox, který se používá v zemědělství jako podpora růstu prasat.

Později byl prokázán také jeho vliv na rezistenci k ciprofloxacinu, norfloxacinu, chloramfenikolu, trimethoprimu nebo nitrofurantoinu (Hooper & Jacoby, 2016).

Posledním mechanismem rezistence je enzymatické pozměnění fluorochinolonů, které je katalyzováno tzv. bifunkčními enzymy. Tyto enzymy mají dvě aktivní místa nacházející se na jednom proteinu. Příkladem je enzym ACC(6')-Ib-cr, což je bifunkční varianta běžné acetyltransferázy zprostředkovávající rezistenci k aminoglykosidům (např. amikacin, kanamycin a tobramycin) a zároveň i k fluorochinolonům s aminovým dusíkem na piperazinovém kruhu (např. ciprofloxacín a norfloxacín) (Hooper & Jacoby, 2016; Redgrave et al., 2014).

6.4 Mobilní genetické elementy

Genetický materiál bakterií je uložen jako součást hlavního chromozomu nebo v podobě extrachromozomálních molekul DNA. Jako základní mobilní genetické elementy (MGE) označujeme plazmidy, transpozony a bakteriofágy. Řadí se sem ale například i ostrovy patogenity (Leplae et al., 2004).

6.4.1 Plazmidy

Plazmid je genetický element umístěný extrachromozomálně a schopný replikace nezávisle na hlavním chromozomu. V cytoplasmě je uložen obvykle ve více kopiích a obsahuje jeden či více genů (Beneš, 2018; Snustad & Simmons, 2017).

Plazmidy nenesou pro buňku nezbytné geny, ale poskytují jí určitou výhodu v nepříznivých podmínkách. Plazmidové geny kódují například produkci toxinů nebo jiných virulenčních faktorů, rezistenci k antibiotikům a toxickým těžkým kovům atd. Plazmidy jsou díky svým vlastnostem významnou složkou v evoluci bakterií (Bennett, 2008).

E. coli má velké množství plazmidů. Její 3 základní typy jsou F-faktor, R-plazmid a Col-plazmid. F-faktor je známý již od roku 1940, kdy byl poprvé popsán právě u *E. coli*. Kóduje geny pro F-pilusy, což jsou výběžky na povrchu bakterie mající význam během procesu konjugace (Johnson & Nolan, 2009).

R-plazmidy (rezistenční plazmidy) nesou geny pro rezistenci k antimikrobiálním látkám. Stejně jako F-faktory mohou bakterii propůjčovat schopnost konjugace a docílit tak rychlému šíření genů pro rezistenci

k antibiotikům v populaci bakterií. Evoluce R-plazmidů docílila schopnosti rezistence vůči několika antibiotikům současně. Kmenům s touto schopností se říká multirezistentí. R-plazmidy jsou obvykle velké, dokáží kontrolovat rychlost své replikace a počet kopií (Snustad & Simmons, 2017).

U Enterobacteriaceae se často vyskytuje plazmid IncN, který nese gen pro enzym širokospektré β -laktamázy zvaný CTX-M-1. Tento enzym může být kódován i plazmidem Inc11, který zároveň nese geny pro virulenční faktory (např. pili pro adhezi). Plazmid IncK je spojován zase s CTX-M-14. Další geny pro širokospektré β -laktamázy se nachází na plazmidu IncF, který je zároveň jeden z nejrozšířenějších v celé čeledi Enterobacteriaceae (Carattoli, 2013).

Pokud se zaměříme na rezistenci k chinolonům u Enterobacteriaceae, největší roli zde hrají geny umístěné na plazmidech IncN, IncX a malých RCR plazmidech (Carattoli, 2013).

Col-plazmidy (kolicinogenní plzmidy) jsou zodpovědné za zvýšenou produkci látky kolicinu, což poskytuje buňkám s tímto plazmidem výhodu (Johnson & Nolan, 2009).

6.4.2 Transpozony

Transpozony jsou elementy DNA, které se mohou pohybovat buď v rámci jedné molekuly DNA na jiná místa nebo z jedné molekuly DNA na druhou. Tato transpozice je umožněna enzymem transponáza. Transpozony obvykle zůstávají v rámci jednoho genomu po dlouhou dobu a způsobují mutace přesunem na jiné místo v genomu. Dělí se do dvou tříd: třída I (retrotranspozony) a třída II (DNA transpozony). Retrotranspozony se vyskytují spíše u eukaryot, DNA transpozony u eukaryot i prokaryot (Babakhani & Oloomi, 2018).

Specifickou skupinou jsou bakteriální transpozony, obsahující geny pro antibiotickou rezistenci, které se přenáší mezi bakteriemi pomocí plazmidů. Důležitou vlastností těchto transpozonů je schopnost konjugace (Babakhani & Oloomi, 2018).

Bakteriální transpozony jsou rozděleny do 4 skupin: inzerční sekvence (IS), kompozitní transpozony, nekompozitní transpozony (skupiny Tn3) a transpozovatelný fág Mu (Babakhani & Oloomi, 2018).

Inzerční sekvence (IS) jsou nejmenší MGE, neobsahují více než 2500 bp a nachází se na plazmidech, bakteriofázích a kompozitních

transpozonech. IS najdeme nejen u bakterií, ale i u archeí a eukaryot. Jejich přenos mezi bakteriemi způsobuje mimo jiné i šíření genů pro rezistenci k antibiotikům (např. metronidazol, klindamycin, cefamycin, penicilin) (Babakhani & Oloomi, 2018).

Kompozitní transpozony také nesou geny pro rezistenci k antibiotikům a jsou lemovány IS. Při léčbě infekčních onemocnění bývají geny nesené kompozitními transpozony největším rizikem. Dělí se do mnoha skupin, ty nejzávažnější vyskytující se u *E. coli* jsou Tn903, Tn9, Tn10 a Tn5. Tn5 například obsahuje geny pro rezistenci k neomycinu/kanamycinu, bleomycinu a streptomycinu (Babakhani & Oloomi, 2018).

Transpozovatelný fág Mu patří do skupiny Myoviridae a stejně jako ostatní typy transpozonů způsobuje rezistenci k antibiotikům. U *E. coli* byl tento bakteriofág objeven již v 50. letech minulého století. Oproti výše zmiňovaným transpozonům se liší mechanismem přenosu genů, ke kterému dochází během lytického cyklu fága Mu. Fág Mu používá k přenosu a replikaci genomu proteiny MuA, MuB, IHF a HU (Babakhani & Oloomi, 2018).

6.5 Přenos genů u bakterií

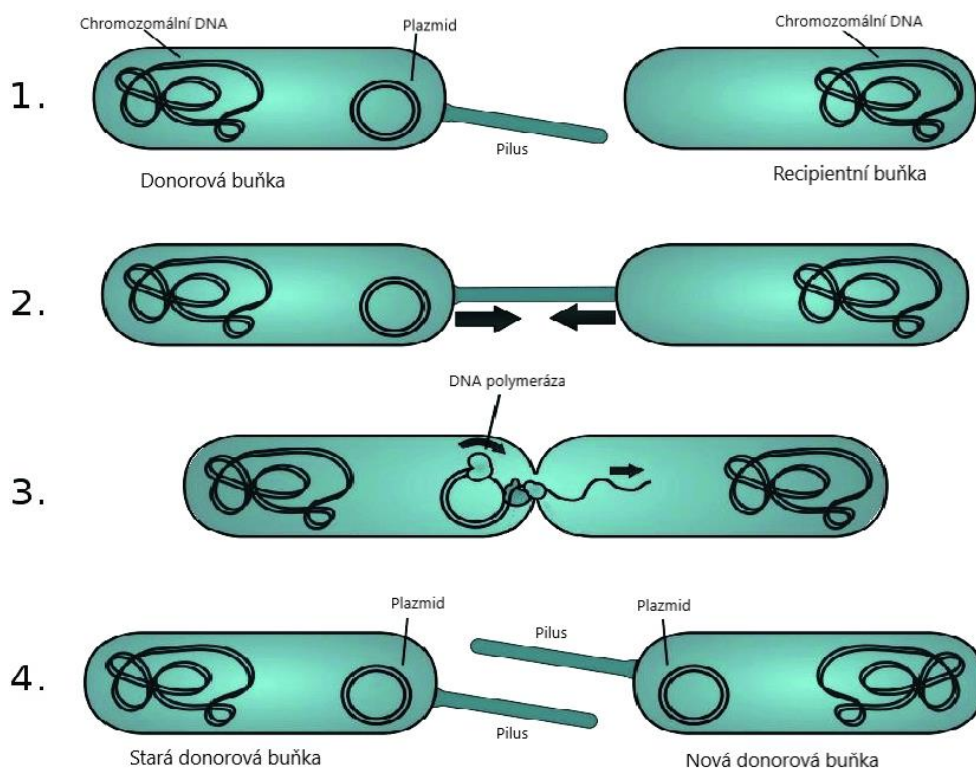
U bakterií se vyskytují 3 procesy horizontálního přenosu DNA z jedné buňky do druhé. Je to konjugace, transdukce a transformace. U *E. coli* za přirozených podmínek nepozorujeme proces transformace, jelikož nemá geny kódující proteiny potřebné pro příjem volné DNA. V laboratorních podmínkách se však povedlo provést transformaci i u *E. coli* (Beneš, 2018; Snustad & Simmons, 2017).

6.5.1 Konjugace

Při konjugaci se během přenosu DNA z donorové buňky do recipientní mezi buňkami tvoří konjugační kanál neboli můstek, kterým prochází plazmid (Obr. 5). Plazmid je před samotným přenosem rozštěpen endonukleázou a replikován. Aby byla bakterie schopna přenosu genů, musí mít F-pilusy, což jsou výrůstky na povrchu bakterie, zprostředkovávající kontakt s recipientní buňkou. F-pilusy kódují geny nacházející se na kružnicové molekule DNA, tzv. F-faktoru (Beneš, 2018; Snustad & Simmons, 2017).

Konjugace je nejvýznamnější proces horizontálního přenosu genů u Enterobacteriaceae. Přenáší se díky ní i velké plazmidy, které nesou geny

pro rezistenci k antibiotikům. Tyto plazmidy mohou být tzv. konjugativní, což znamená, že kódují proteiny potřebné k vytvoření konjugativního kanálu. Tento proces může probíhat i mezi dvěma bakteriemi různého druhu, což ještě více usnadňuje šíření R-plazmidů (Partridge et al., 2018).



Obr. 5: Přenos DNA konjugací (F. Al Marjani, 2015, upraveno)

6.5.2 Transdukce

Další způsob přenosu DNA, nacházející se také u *E. coli*, je transdukce. Byla objevena již roku 1952 a přenos je zde zprostředkováván skrze bakteriofágy. Dělí se na obecnou (nespecifickou) transdukci a specifickou transdukci. U nespecifické transdukce mohou bakteriofágy přenášet jakýkoliv gen z buňky donorové do recipientní. Pro *E. coli* je typický fág P1. Tento proces je však poměrně neúčinný, protože jen velmi malé procento přenesené DNA je rekombinantně začleněno do bakteriálního chromozomu (Beneš, 2018; Snustad & Simmons, 2017).

U specifické transdukce jsou přenášeny pouze určité geny. Nejznámějším zástupcem této skupiny je bakteriofág λ , který u *E. coli* přenáší

dvě sady genů. První jsou geny *gal*, díky kterým může *E. coli* využívat galaktózu jako zdroj energie a druhá skupina jsou geny *bio*, zajišťující syntézu biotinu (Snustad & Simmons, 2017).

6.5.3 Transformace

Transformace byla poprvé objevena roku 1928 u zástupce *Streptococcus pneumoniae*. U tohoto procesu přijímá bakteriální buňka volné molekuly DNA z donorové buňky. K tomu potřebuje geny kódující proteiny potřebné pro tento proces. *E. coli* tyto geny za přirozených podmínek nemá (Beneš, 2018; Snustad & Simmons, 2017).

7 Epidemické linie *E. coli*

Jako epidemické linie ExPEC jsou označovány sekvenční typy, které se za relativně krátkou dobu široce rozšířily a způsobují extraintestinální onemocnění. Jednotlivé sekvenční typy mají společné určité genotypové charakteristiky. Na základě studií z let 1995–2018 můžeme říci, že nejčastěji se vyskytující sekvenční typ ExPEC ve všech geografických regionech je ST131. Četnost dalších sekvenčních typů se může podle místa výskytu lišit. Zastoupení některých ST se mění i v čase, jiné zůstávají konzistentní. Z evropských a severoamerických studií vyplývá podobné rozložení ST, zatímco u afrického a asijského regionu je zastoupení odlišné (Manges et al., 2019).

Pouze několik ST nebo komplexů ST zahrnuje izoláty jednoho patotypu (jsou to především IPEC, *Shigella* spp. nebo nepatogenní *E. coli*). Sekvenční typy extraintestinální patogenní *E. coli* obsahují mimo jiné také nepatogenní kmeny nebo jiné patotypy (Köhler & Dobrindt, 2011).

Aby se daný ST mohl stát epidemicky významným, měl by být distribuován globálně, obsahovat více mechanismů pro antimikrobiální rezistenci, kolonizovat a přetrvávat v organismu více než 6 měsíců, být schopen přenosu mezi hostiteli, zvyšovat svou patogenitu a kondici a měl by působit závažné či opakující se infekce (J. D. D. Pitout & Finn, 2020).

7.1 *E. coli* ST131

Od roku 2000 je ST131 globálně rozšířený multirezistentní klon způsobující komunitní i nemocniční infekce močových cest (je zároveň nejčastějším původcem těchto onemocnění) či infekce krevního řečiště, ale vyskytuje se také v trávicím traktu savců, kde nepůsobí nijak škodlivě. Byl izolován nejen ze zvířecího či lidského organismu, ale také z půdy nebo odpadních vod (Petty et al., 2014; J. D. D. Pitout & Finn, 2020).

Jeho rozšíření a patogenitě mohly přispět plazmidy, genomové ostrovy a mutace. Stále však neznáme konkrétní mechanismus, jak tento ST dosáhl v relativně krátkém časovém období tak velkého úspěchu ve srovnání s jinými, často více patogenními a rezistentními, epidemickými liniemi (J. D. D. Pitout & Finn, 2020).

V současnosti je zodpovědný za podstatnou část infekcí ExPEC spojených s rezistencí k antimikrobiálním látkám, především k β -laktamům a fluorochinolonům (Riley, 2014).

7.1.1 Fylogeneze

Tento sekvenční typ patří do fylogenetické skupiny B2. Nejčastěji se ST131 vyskytuje jako sérotyp O25b:H4, dále byly hlášeny sérotypy O16:H5, NT:H4 a O157 (Riley, 2014).

Na základě analýzy jedno-nukleotidového polymorfizmu je ST131 dále rozdělen do tří skupin („clades“) A, B a C, vytvořených především podle alely *fimH*. Operon *fim* kóduje fimbrie, které patří mezi virulenní faktory *E. coli* a slouží k přichycení k hostitelské tkáni. Gen *fimH* rozpoznává a zprostředkovává připojení k manóзовým receptorům hostitelské tkáně. Tento gen je velmi variabilní, jelikož se nachází v oblasti vysoké rekombinace a různé alely silně korelují s populačními subtypy ST131 (Petty et al., 2014; J. D. D. Pitout & Finn, 2020).

Skupina A je charakterizována alelou *fimH41* a je nejvíce rozmanitá. Má také různé varianty genů *gyrA* a *parC*, které jsou zodpovědné za rezistenci vůči fluorochinolonům. Skupina B je podobná skupině C a je typická pro své alely *fimB*, *fimH22* a konzistentní varianty genů *gyrA* a *parC*. Skupina C je charakteristická alelou *fimH30* a alelami pro fluorochinolonomou rezistenci *gyrA1AB* a *parC1aAB* (Petty et al., 2014; J. D. D. Pitout & Finn, 2020).

V rámci skupiny C jsou nejrozšířenější podskupiny H30-R (neboli C1) a H30-Rx (neboli C2). Obě mají gen *fimH30* kódující fimbriální adhezín 1. Bylo zjištěno, že ST131 s genem *fimH* zahrnuje až 70 % izolátů *E. coli* rezistentních k fluorochinolonům. Linie s *fimH* se objevila na začátku 21. století a začala se rapidně rozšiřovat mezi lety 2005–2010. Většina kmenů linie *fimH30* má velmi podobnou strukturu genomu, což naznačuje jejich původ z jediného předka. Podskupiny H30-R a H30-Rx jsou významné především kvůli jejich vysoké míře rezistence k antibiotikům. Obě podskupiny vykazují rezistenci k fluorochinolonům, H30-R ale na rozdíl od H30-Rx neobsahuje geny *bla*_{CTX-M-15}. Mezi kmeny s genem *fimH30* tedy najdeme podskupiny těch nejvíce citlivých linií H30 (fluorochinolony citlivé a CTX-M negativní), přes více rezistentní H30-R (fluorochinolony rezistentní a CTX-M negativní), až po nejvíce rezistentní linii H30-Rx (fluorochinolony rezistentní a CTX-M pozitivní). Mezi ExPEC je tedy šíření ST131 s genem *fimH* zodpovědné za zvýšenou prevalenci fluorochinolon rezistentních a CTX-M pozitivních linií (Mathers et al., 2015; J. D. D. Pitout & Finn, 2020).

7.1.2 Virulence

ST131 exprimuje několik virulenčních genů, většinou typických pro ExPEC: *iha* (adhezin-siderofor) a *fimH* (adheziny), *sat* (toxin), *fyuA/irp2* a *iutA/iucD* (systémy pro fiderofory), *kpsM II* (kapsula typu 2), *usp* (uropatogenický specifický protein), *traT* (gen související se sérovou rezistencí), *ompT* (proteáza vnější membrány) a *malX* (marker ostrovu patogenity) (Riley, 2014).

Některé virulenční faktory nemají pouze funkci vyvolání infekce. Například u bakteriálních kmenů osidlujících tlusté střevo mohou sloužit k lepší adaptaci na toto prostředí, jako *fimH* sloužící k přichycení k hostitelské tkáni. Schopnost virulence ST131 je obecně spíše zaměřena na perzistenci v hostiteli, než na vyvolání onemocnění (J. D. D. Pitout & Finn, 2020).

7.1.3 Rezistence k antimikrobiálním látkám

Roku 2008 byl ST131 označen za hlavní klon spojený s šířením rezistence CTX-M-15 ESBL, kódovaný plazmidovým genem *bla_{CTX-M-15}*. Kromě CTX-M-15 se u ST131 vyskytují v menší míře i CTX-M-3, CTX-M-14 nebo CTX-M-27. Je rezistentní také vůči fluorochinolonům, a to díky mutacím v genech *gyrA* a *parC*, nacházejících se na chromozomu. Byly zaznamenány také případy ST131 rezistentní k aminoglykosidům, trimethoprim-sulfamethoxazolu i karbapenemům (mají enzymy metallo- β -laktamázy a karbapenemázy OXA a KPC), což ještě více omezuje léčbu infekcí způsobených ST131. Izoláty produkující karbapenemázy však zatím nebyly rozšířeny v širokém měřítku, jako to je u izolátů s *bla_{CTX-M-15}* (Petty et al., 2014; J. D. D. Pitout & Finn, 2020; Riley, 2014).

Plazmidy jsou nedílnou součástí evoluce ST131. Plazmidy spojené s ST131 jsou převážně ze skupiny IncF, které mají obvykle délku větší než 100 kb, mají nízký počet kopií a nesou geny virulence či antimikrobiální rezistence. Úspěšnost IncF pramení v jeho stabilní interakci s hostitelem. Plazmidy IncF najdeme nejčastěji u čeledi Enterobacteriaceae. Vyskytují se na něm inzerční sekvence, např. IS26, které poskytují geny antibiotické rezistence *bla_{CTX-M-15}*, *catB4*, *bla_{OXA-1}* a *aac(6')Ib-cr*, které zvyšují rezistenci k cefalosporinům, chloramfenikolu, oxacilinu a aminoglykosidům. Další plazmidy u ST131 jsou IncA/C, L/M a N. Geny pro rezistenci k ESBL jsou často i na transpozomech, např. Tn1999 (J. D. D. Pitout & Finn, 2020).

7.2 *E. coli* ST69

Poprvé byl ST69 izolován roku 1999 z člověka. Způsobuje spíše komunitní infekce močových cest a krevního řečiště. Ženy zahrnuté ve studii zabývající se infekcemi močových cest způsobené ST69 uváděly častější cestování, větší spotřebu syrového masa a masa neošetřeného antibiotiky, avokáda, zeleninové šťávy, bio mléčných výrobků či pití vody z vodovodu, oproti kontrolní skupině. Tyto faktory bývají negativně spojeny s infekcemi močového traktu vyvolané ST69. ST69 byl identifikován i u zvířecích rezervoárů (Fibke et al., 2019; Riley, 2014).

Při srovnání genomů ST69, ST73, ST95 a ST131 bylo identifikováno 22 oblastí o velikosti 335 bp až 26,5 kb, které jsou pro daný ST jedinečné. Většina těchto oblastí (13/22) byla vysoce konzervovaná v genomu. Zároveň se liší v citlivosti vůči antibiotikům (Doumith et al., 2015).

7.2.1 Fylogeneze

ST69 řadíme do fylogenetické skupiny D, ale byly zde zařazeny některé izoláty i ze skupin B1, B2, E a F. U ST69 se vyskytuje hned několik sérotypů: O11, O15, O17, O44, O73, O77, O86, O125ab a O25b (Hojabri et al., 2019; Riley, 2014).

U ST69 je významná klonální skupina A (CgA), která vyvolává infekce močových cest a krevního řečiště. Kmeny CgA od svého objevení postupně získávají nové geny vyvolávající antimikrobiální rezistenci. V současnosti se u nich vyskytují β -laktamázy (především ESBL), ale i karbapenamázy (Hammad et al., 2019).

7.2.2 Virulence

Virulenční faktory jsou u tohoto sekvenčního typu oproti ostatním odlišné. ST69 se řadí mezi skupiny s nižším obsahem virulenčních faktorů (má jich i méně než výše popisovaný ST131), a to jak v rámci adhesinů, toxinů (nevyskytuje se u nich autotransportní toxin VAT ani CNF1), sideroforů či kapsulárních antigenů (Hojabri et al., 2019).

Vyskytují se u něj alely *F10* a *F16 papA*, alela *papGII*, *sfa/focDE* (fimbrie S a FIC), *focG* (adhezín fimbrie FIC), *iha*, *hlyD*, *cnfI*, *fyuA*, *iutA*, *iroN*, *malX*, *afa/dra* (adheziny vázající Dr antigeny), *cdtB* a *KI kpsMT* (Riley, 2014).

V posledních studiích zabývající se ST69 je často diskutován sekreční systém typu III (T3SS), který napomáhá při vyvolání infekce v hostiteli. T3SS je složen ze dvou prvků, vysoce konzervovaného multiproteinového strukturního komplexu, vytvářející kanál mezi bakteriální a hostitelskou buňkou a efektorovými proteiny, které jsou kanálem translokovány. Geny kódující T3SS se nachází na ostrovech patogenity a geny kódující efektorové proteiny jsou rozšířeny v rámci genomu bakterie a liší se mezi jednotlivými druhy (Fox et al., 2020).

Kromě T3SS byl popsán i druhý typ, vyskytující se u *E. coli*, který se nazývá *E. coli* T3SS2 (ETT2). Přítomnost genů kódujících ETT2 u patogenních izolátů ST69 naznačuje, že má význam při infekci, jeho přesná funkce však není známa. U ST131 se ETT2 nevyskytuje, což pravděpodobně souvisí s tím, že ST69 patří do jiné fylogenetické skupiny. ETT2 je proto typický spíše pro skupinu D, kde se zachoval i v poměrně konzervované formě, což značí zachování selekčního tlaku v rámci ST69. Tlak na udržení ETT2 mohl vzniknout z důvodu poskytnutí selektivní výhody při kolonizaci střev a při následné infekcích močových cest (Fox et al., 2020).

7.2.3 Rezistence k antimikrobiálním látkám

Většina izolátů ST69 je multirezistentní, produkují nejčastěji geny pro rezistenci k trimethoprim-sulfamethoxazolu nebo k amoxicilinu. Výskyt ST69 exprimující ESBL není příliš častý, ale u některých izolátů se objevují např. ESBL CTX-M a TEM (Fibke et al., 2019; Hojabri et al., 2019; Riley, 2014).

Rezistence k trimethoprim-sulfamethoxazolu byla vybudována pravděpodobně v důsledku častého používání tohoto antibiotika. U ST69 je často detekován gen *traT* kódující protein TraT, který je zodpovědný za vývoj rezistence k sérum s baktericidní aktivitou (Hojabri et al., 2019).

U izolátů patřících do ST69 se vyskytují plazmidy ze skupin IncHI2, které nesou geny pro rezistenci ke kolistinu (*mcr-1*), aminoglykosidům (*aadA1* a *aadA2*), fenikolu (*cmlA1* a *floR*), sulfonamidům (*sul3*) a tetracyklinu (*tet(A)*). Další plazmidy kódují rezistenci k β -laktamům, například rezistenci zprostředkovanou beta-laktamázou TEM-1 (Hammad et al., 2019).

Rezistence ke kolistinu byla objevena již u několika ST *E. coli* po celém světě. ST69 rezistentní ke kolicinu se objevuje v potravinách (především

v tepelně neupravených), např. v nezpracovaném sýru. Kolistin se používá běžně ve veterinární medicíně k prevenci a léčbě infekcí vyvolaných Enterobacteriaceae. Přidává se i do krmiv pro podporu zdravého vývoje hospodářských zvířat. V některých zemích (např. Egypt) se používá kolistin nekontrolovaně, což má za následek zvýšení rezistence k tomuto antibiotiku u zvířat a následný možný přenos na člověka (Hammad et al., 2019).

7.3 *E. coli* ST95

První izolace tohoto sekvenčního typu proběhla již roku 1941, mezi epidemické linie ExPEC se však zařazuje poměrně nově. Způsobuje novorozenecké meningitidy, infekce močových cest či sepse. V rámci ST95 najdeme i několik izolátů vyvolávajících ptačí kolibacilózu. Kolibacilóza může být kontrolována antimikrobiálními látkami, ale rezidua těchto látek v potravinách jsou problém. Izoláty z ST95 se vyskytují nejen ve formě úspěšných extraintestinálních patogenů, ale kolonizují i střevní trakt. Z prostředí je izolován jen výjimečně, např. z rostlin nebo odpadních vod (Manges et al., 2019; Mora et al., 2013; Raven et al., 2019; Riley, 2014).

7.3.1 Fylogeneze

ST95 patří do fylogenetické skupiny B a má sérotypy O1:K1:H7, O2:K1:H7, O18:K1:H7, O45:K1:H7. V rámci ST95 najdeme různorodé skupiny, vyskytuje se zde například skupina OMP6 se sérotypem O18:K1:H7, který kóduje P fimbrie a hemolyzin. OMP6 se spojuje s novorozeneckou meningitidou i s infekcemi močového traktu. Další skupinou je OMP9 se stejným sérotypem O18:K1:H7, který ale nekóduje P fimbrie ani hemolyzin a je spojován pouze s novorozeneckou meningitidou (Riley, 2014; Weissman et al., 2012).

7.3.2 Virulence

Jeho typickými virulenčními geny jsou *fimH*, *fimAvMTJ8*, *papG II*, *iucD*, *iroN*, *kpsM II-KI*, *cvaC*, *iss*, *traT*, *malX*, *usp* a *tsh*. S novorozeneckými meningitidami jsou spojovány sérotypy s K1 kapsulou. Izoláty ST95 způsobují také ptačí kolibacilózu, a to jak u domácích, tak i u volně žijících ptáků (Riley, 2014).

Izoláty ze séroskupiny O45:K1:H7 se podílí na vzniku závažných lidských onemocněních, jako je novorozenecká meningitida. Rostoucí prevalence séroskupiny O45 je však zaznamenána i u ptačích patogenních *E. coli*. Od 90. let minulého století vykazuje O45:K1:H7 úspěšnou perzistenci u lidí i u ptáků. Drůbež by tedy mohla sloužit jako rezervoár ST95 *E. coli* (Mora et al., 2013).

U ptáků bylo celosvětově zaznamenáno několik séroskupin *E. coli*, které mají souvislost s lidskými extraintestinálními onemocněními. Právě drůbež by mohla být zdrojem živočišné potravy, která je nejvíce spojována s lidskými ExPEC (Mora et al., 2013).

O45:K1:H7 vykazuje malou genetickou variabilitu mezi izoláty ze zvířat i člověka, což podporuje jejich genetickou příbuznost. Gen *tsh*, přítomný častěji u ptáků má vysokou virulenci. Díky sekvenaci několika izolátů ze skupiny APEC a ExPEC bylo stanoveno, že některé geny se objevují častěji u lidských ExPEC, jiné zase u APEC a skupina genů je stejná pro obě skupiny (Jørgensen et al., 2019; Mora et al., 2013).

7.3.3 Rezistence k antimikrobiálním látkám

U tohoto sekvenčního typu nacházíme relativně nízkou frekvenci výskytu multirezistentních izolátů, což může být zdůvodněno tím, že ST95 nadále prochází selekcí v rámci rezistence k antimikrobiálním látkám. ST95 nám také dokazuje, že multirezistence není nezbytná k tomu, aby se některý z kmenů *E. coli* stal pandemický (Riley, 2014).

Z výsledků evropské studie zaměřující se na sérotyp O45:K1:H7 vyplývá, že kolem 40 % izolátů je citlivých ke všem nejpoužívanějším antibiotikům. Nejčastěji se vyskytuje rezistence na kyselinu nalidixovou, ampicilin, tikarcilin, piperacilin a trimethoprim-sulfamethoxazol. Rezistentní kmeny se vyskytují jak u lidských, tak i u ptačích izolátů. U séroskupiny O45:K1:H7 příliš často nenacházíme ESBL, pouze u některých izolátů byly prokázány geny *bla*_{TEM} (Mora et al., 2013).

7.4 Další ST *E. coli*

7.4.1 *E. coli* ST393

V letech 1986–1987 se v Londýně rozšířily komunitní infekce močových cest, infekce krevního řečiště, meningitidy či endokarditidy způsobené multirezistentní *E. coli*. Později bylo zjištěno, že se jedná právě o ST393,

konkrétně sérotyp O15:K52:H1. Po této události byl sérotyp O15:K52:H1 izolován z nemocničních i komunitních infekcí v Dánsku, Španělsku a dalších zemích západní Evropy a také v několika státech USA (Riley, 2014).

ST393 patří do fylogenetické skupiny D a je to jeden z prvních sekvencovaných typů *E. coli* způsobujících komunitní rozšíření infekcí ExPEC. ST393 je geograficky rozšířený a v některých částech Evropy se vyskytuje jako predominantní klonální linie ExPEC. Mezi jeho typické virulenní geny patří: *iha* (adhezin-siderofor), *fimH* (fimbrie typ 1), *fyuA* (yersiniabaktin receptor) *iutA* (aerobaktin receptor) a *kpsM II* (kapsula ze skupiny 2). Od roku 1975 do 2006 se rezistenční skóre ST393 zvyšovalo v průměru o 2,8 antimikrobiálních léčiv za 10 let (Blanco et al., 2011; Riley, 2014).

7.4.2 *E. coli* ST73

ST73 patří do fylogenetické skupiny B2 a do sérotypu O6:H1. Jeho virulenní geny jsou *papC*, *papEF*, *papG*, *sfa/foc*, *fimH*, *hra*, *hlyA*, *cnf1*, *pic*, *vat*, *iroN*, *fyuA*, *kpsM II*, *ups* a *ompT* (Riley, 2014).

Je častým původcem komunitních i nemocničních infekcí močového měchýře a krevního řečiště. Exprimuje CTX-M-15 ESBL. Kromě člověka byl ST73 společně s ST372 nejčastějším izolátem z psů. Podobnost genotypu a většiny virulenních faktorů u izolátů z lidí, koček i psů naznačuje, že u něj dochází k mezidruhovému přenosu (Riley, 2014; Valat et al., 2020).

8 Závěr

Výskyt epidemických klonálních linií extraintestinální patogenní *E. coli* je stále častější. Problém nastává především u těch, které kromě vysoké míry virulence mají i vysoký počet genů pro rezistenci k antibiotikům přenášejících se i do dalších bakterií. Nejčastější cestou horizontálního přenosu genů pro rezistenci je u *E. coli* konjugace, která zprostředkovává příjem plazmidů. Právě na nich se nejčastěji přenáší geny pro antibiotickou rezistenci.

Mechanismů rezistence k antibiotikům je hned několik, ExPEC využívá nejčastěji enzymy, které inhibují antibiotikum. To jsou například karbapenemázy nebo β -laktamázy, konkrétně jejich podskupina širokospektré β -laktamázy. Jejich šířením se nám stále zužuje spektrum antibiotik, které můžeme proti infekci nasadit. V některých případech je nezbytné udělat mikrobiologická vyšetření, protože nasazení neúčinného antibiotika může prodloužit infekce vyvolané rezistentními liniemi ExPEC.

Rozšíření těchto sekvenčních typů je problém také v zemědělství. Některé sekvenční typy totiž mohou vyvolávat kolibacilózu u ptáků, která vede k úhynu zvířete. Problém nastává u farem s drůbeží, kde může způsobit značné ztráty.

Současný výzkum je zaměřen primárně na ST131, který je globálně nejrozšířenější a nese spoustu genů pro rezistenci k antibiotikům. Epidemické linie extraintestinální *E. coli* jsou problematikou zasahující do mnoha odvětví, proto je třeba se zabývat i nadále jejich výzkumem napříč všemi sekvenčními typy.

Použité zdroje

- Aminov, R. I. (2010). A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Frontiers in Microbiology*, 1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
- Ananias, M., & Yano, T. (2008). Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41(10), 877–883. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2008001000008>
- Babakhani, S., & Oloomi, M. (2018). Transposons: The agents of antibiotic resistance in bacteria. *Journal of Basic Microbiology*, 58(11), 905–917. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800204>
- Behzadi, P., & Carevic, B. (2019). *Microbiology of Urinary Tract Infections: Microbial Agents and Predisposing Factors*. BoD – Books on Demand.
- Beneš, J. (2018). *Antibiotika systematika, vlastnosti, použití* (1.). Grada Publishing, a.s.
- Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153(S1), S347–S357. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707607>
- Blanco, J., Mora, A., Mamani, R., López, C., Blanco, M., Dahbi, G., Herrera, A., Blanco, J. E., Alonso, M. P., García-Garroto, F., Chaves, F., Orellana, M. Á., Martínez-Martínez, L., Calvo, J., Prats, G., Larrosa, M.

- N., González-López, J. J., López-Cerero, L., Rodríguez-Baño, J., & Pascual, Á. (2011). National survey of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(9), 2011–2021.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkr235>
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., & Balaban, N. Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*, 14(5), 320–330.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34>
- Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6), 298–304.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001>
- Clardy, J., Fischbach, M., & Currie, C. (2009). The natural history of antibiotics. *Current biology : CB*, 2009(11), R437–R441.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.04.001>
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555–4558.
<https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>
- Clermont, O., Gordon, D., & Denamur, E. 2015. (2015). Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and

the correspondence among schemes. *Microbiology*, 161(5), 980–988. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000063>

Clermont, O., Olier, M., Hoede, C., Diancourt, L., Brisse, S., Keroudean, M., Glodt, J., Picard, B., Oswald, E., & Denamur, E. (2011). Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(3), 654–662. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.005>

Dale, A. P., & Woodford, N. (2015). Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *Journal of Infection*, 71(6), 615–626. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.09.009>

Donnenberg, M. S. (2013). *Escherichia coli Pathotypes and Principles of Pathogenesis* (2.).

Doumith, M., Day, M., Ciesielczuk, H., Hope, R., Underwood, A., Reynolds, R., Wain, J., Livermore, D. M., & Woodford, N. (2015). Rapid Identification of Major *Escherichia coli* Sequence Types Causing Urinary Tract and Bloodstream Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(1), 160–166. <https://doi.org/10.1128/JCM.02562-14>

Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventré, A., Elion, J., Picard, B., & Denamur, E. (2001). Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology*, 147(6), 1671–1676. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-6-1671>

Ebimieowei, E., & Ibemologi, A. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 90–101.

Ewerst, C., Janssen, T., & Wieler, L. H. (2003). [Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)]. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 116(9–10), 381–395. <https://europepmc.org/article/med/14526468>

F. Al Marjani, M. (2015). *Short course in Bacterial Genetics*.

Fibke, C. D., Croxen, M. A., Geum, H. M., Glass, M., Wong, E., Avery, B. P., Daignault, D., Mulvey, M. R., Reid-Smith, R. J., Parmley, E. J., Portt, A., Boerlin, P., & Manges, A. R. (2019). Genomic Epidemiology of Major Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Lineages Causing Urinary Tract Infections in Young Women Across Canada. *Open Forum Infectious Diseases*, 6(ofz431). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz431>

Fox, S., Goswami, C., Holden, M., Connolly, J. P. R., Mordue, J., O'Boyle, N., Roe, A., Connor, M., Leanord, A., & Evans, T. J. (2020). A highly conserved complete accessory *Escherichia coli* type III secretion system 2 is widespread in bloodstream isolates of the ST69 lineage. *Scientific Reports*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61026-x>

- Greenwood, D. (Ed.). (2012). *Medical microbiology: A guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control* (18th ed). Churchill Livingstone.
- Grönthal, T., Österblad, M., Eklund, M., Jalava, J., Nykäsenoja, S., Pekkanen, K., & Rantala, M. (2018). Sharing more than friendship – transmission of NDM-5 ST167 and CTX-M-9 ST69 *Escherichia coli* between dogs and humans in a family, Finland, 2015. *Eurosurveillance*, *23*(27). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.27.1700497>
- Hammad, A. M., Hoffmann, M., Gonzalez-Escalona, N., Abbas, N. H., Yao, K., Koenig, S., Allué-Guardia, A., & Eppinger, M. (2019). Genomic features of colistin resistant *Escherichia coli* ST69 strain harboring mcr-1 on IncHI2 plasmid from raw milk cheese in Egypt. *Infection, Genetics and Evolution*, *73*, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.021>
- Heredia, N., & García, S. (2018). Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Animal Nutrition*, *4*(3), 250–255. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.006>
- Hojabri, Z., Mirmohammadkhani, M., Darabi, N., Arab, M., & Pajand, O. (2019). Characterization of antibiotic-susceptibility patterns and virulence genes of five major sequence types of *Escherichia coli* isolates cultured from extraintestinal specimens: A 1-year surveillance study from Iran. *Infection and Drug Resistance*, *12*, 893–903. <https://doi.org/10.2147/IDR.S199759>

- Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2016). Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(9).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025320>
- Chaudhuri, R. R., & Henderson, I. R. (2012). The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.01.005>
- Johnson, T. J., & Nolan, L. K. (2009). Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(4), 750–774.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-09>
- Jørgensen, S. L., Stegger, M., Kudirkienė, E., Lilje, B., Poulsen, L. L., Ronco, T., Pires Dos Santos, T., Kiil, K., Bisgaard, M., Pedersen, K., Nolan, L. K., Price, L. B., Olsen, R. H., Andersen, P. S., & Christensen, H. (2019). Diversity and Population Overlap between Avian and Human *Escherichia coli* Belonging to Sequence Type 95. *mSphere*, 4(1). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00333-18>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). *Pathogenic Escherichia coli* | *Nature Reviews Microbiology*. nature.
https://www.nature.com/articles/nrmicro818?type=access_denied
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of*

Anaesthesiology, Clinical Pharmacology, 33(3), 300–305.

https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15

Köhler, C.-D., & Dobrindt, U. (2011). What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *International Journal of Medical Microbiology*, 301(8), 642–647.

<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.006>

Kourkouta, L. (2018). *History of Antibiotics*. 2018, xxxx–xxxx.

Kwong, J. C., Mccallum, N., Sintchenko, V., & Howden, B. P. (2015).

Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology*, 47(3), 199–210.

<https://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000235>

Le Gall, T., Clermont, O., Gouriou, S., Picard, B., Nassif, X., Denamur, E., & Tenailon, O. (2007). Extraintestinal Virulence Is a Coincidental By-Product of Commensalism in B2 Phylogenetic Group *Escherichia coli* Strains. *Molecular Biology and Evolution*, 24(11), 2373–2384. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm172>

Leplae, R., Hebrant, A., Wodak, S. J., & Toussaint, A. (2004). ACLAME: A CLAssification of Mobile genetic Elements. *Nucleic Acids Research*, 32(suppl_1), D45–D49.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkh084>

Maltby, R., Leatham-Jensen, M. P., Gibson, T., Cohen, P. S., & Conway, T. (2013). Nutritional Basis for Colonization Resistance by Human Commensal *Escherichia coli* Strains HS and Nissle 1917 against *E.*

coli O157:H7 in the Mouse Intestine. *PLOS ONE*, 8(1), e53957.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053957>

Manges, A. R., Geum, H. M., Guo, A., Edens, T. J., Fibke, C. D., & Pitout, J. D.

D. (2019). Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(3).

<https://doi.org/10.1128/CMR.00135-18>

Marques, C., Belas, A., Franco, A., Aboim, C., Gama, L. T., & Pomba, C.

(2018). Increase in antimicrobial resistance and emergence of major international high-risk clonal lineages in dogs and cats with urinary tract infection: 16 year retrospective study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(2), 377–384.

<https://doi.org/10.1093/jac/dkx401>

Mathers, A., Peirano, G., & Pitout, J. (2015). The Role of Epidemic Re-

sistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Clinical microbiology reviews*, 28, 565–591.

<https://doi.org/10.1128/CMR.00116-14>

Mayer, F. (2015). Role of Elongation Factor EF-Tu in Bacterial Cytoske-

letons—Mini Review and Update. *Swift Journal of Medicine and Medical Sciences, Vol. 1 (2)*, 06–011. [https://www.researchgate.net/publication/281551443_Role_of_Elonga-](https://www.researchgate.net/publication/281551443_Role_of_Elongation_Factor_EF-Tu_in_Bacterial_Cytoskeletons_-_Mini_Review_and_Update)

[tion_Factor_EF-Tu_in_Bacterial_Cytoskeletons_-_Mini_Review_and_Update](https://www.researchgate.net/publication/281551443_Role_of_Elongation_Factor_EF-Tu_in_Bacterial_Cytoskeletons_-_Mini_Review_and_Update)

- Mora, A., Viso, S., López, C., Alonso, M. P., García-Garrote, F., Dabhi, G., Mamani, R., Herrera, A., Marzoa, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Moulin-Schouleur, M., Schouler, C., & Blanco, J. (2013). Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1:H7-B2-ST95 in humans. *Veterinary Microbiology*, *167*(3), 506–512. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.08.007>
- Moraes, F., & Góes, A. (2016). A decade of human genome project conclusion: Scientific diffusion about our genome knowledge. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, *44*(3), 215–223. <https://doi.org/10.1002/bmb.20952>
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). *Diarrheagenic Escherichia coli*. *11*, 61.
- Navarro-Garcia, F., Elias, W. P., Flores, J., & Okhuysen, P. C. (2010). Enteroreggregative *Escherichia coli*. In *Pathogenic Escherichia coli in Latin America* (s. 48–64).
- Ouchenir, L., Renaud, C., Khan, S., Bitnun, A., Boisvert, A.-A., McDonald, J., Bowes, J., Brophy, J., Barton, M., Ting, J., Roberts, A., Hawkes, M., & Robinson, J. L. (2017). The Epidemiology, Management, and Outcomes of Bacterial Meningitis in Infants. *Pediatrics*, *140*(1). <https://doi.org/10.1542/peds.2017-0476>
- Park, S. T., & Kim, J. (2016). Trends in Next-Generation Sequencing and a New Era for Whole Genome Sequencing. *International Neurology Journal*, *20*(Suppl 2), S76-83. <https://doi.org/10.5213/inj.1632742.371>

- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4).
<https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Petty, N. K., Zakour, N. L. B., Stanton-Cook, M., Skippington, E., Totsika, M., Forde, B. M., Phan, M.-D., Moriel, D. G., Peters, K. M., Davies, M., Rogers, B. A., Dougan, G., Rodriguez-Baño, J., Pascual, A., Pitout, J. D. D., Upton, M., Paterson, D. L., Walsh, T. R., Schembri, M. A., & Beatson, S. A. (2014). Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(15), 5694–5699.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1322678111>
- Pfeifer, Y., Cullik, A., & Witte, W. (2010). Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(6), 371–379.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.04.005>
- Pitout, J. (2012). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00009>
- Pitout, J. D. D., & Finn, T. j. (2020). The evolutionary puzzle of *Escherichia coli* ST131. *Infection, Genetics and Evolution*, 81, 104265. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104265>
- Rasko, D. A., Rosovitz, M. J., Myers, G. S. A., Mongodin, E. F., Fricke, W. F., Gajer, P., Crabtree, J., Sebaihia, M., Thomson, N. R., Chaudhuri, R.,

- Henderson, I. R., Sperandio, V., & Ravel, J. (2008). The Pangenome Structure of *Escherichia coli*: Comparative Genomic Analysis of *E. coli* Commensal and Pathogenic Isolates. *Journal of Bacteriology*, *190*(20), 6881–6893.
<https://doi.org/10.1128/JB.00619-08>
- Raven, K. E., Ludden, C., Gouliouris, T., Blane, B., Naydenova, P., Brown, N. M., Parkhill, J., & Peacock, S. J. (2019). Genomic surveillance of *Escherichia coli* in municipal wastewater treatment plants as an indicator of clinically relevant pathogens and their resistance genes. *Microbial Genomics*, *5*(5).
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000267>
- Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2014). Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*, *22*(8), 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>
- Riley, L. W. (2014). Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*, *20*(5), 380–390. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12646>
- Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugła-Ploskonska, G., & Choroszy-Krol, I. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: Recent reports. *Gut Pathogens*, *11*(1), 10.
<https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>

- Sedláček, I. (2007). *Taxonomie prokaryot* (1. vyd.). Masarykova univerzita.
- Snustad, D. P., & Simmons, M. J. (2017). *Genetika* (2.). Masarykova univerzita.
- Soutar, C. D., & Stavrínides, J. 2020. (2020). Phylogenetic analysis supporting the taxonomic revision of eight genera within the bacterial order Enterobacterales. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(12), 6524–6530.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004542>
- Terlizzi, M. E., Gribaudo, G., & Maffei, M. E. (2017). UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01566>
- Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., Calteau, A., Chiappello, H., Clermont, O., Cruveiller, S., Danchin, A., Diard, M., Dossat, C., Karoui, M. E., Frapy, E., Garry, L., Ghigo, J. M., Gilles A. M., Johnson J., Bouguéneq Ch., Lescat, M., Mangenot, S., Martinez-Jéhann, V., Matic, I., Nassif, X., Oztas, S., Petit, M. A., Pichon Ch., Rouy, Z., Ruf, C. S, Schneider, D., Tourret, J., Vacherie, B., Vallenet, D., Médigue, C., Rocha, E., Denamur, E. (2009). Organised Genome Dynamics in the *Escherichia coli* Species Results in Highly

- Diverse Adaptive Paths. *PLOS Genetics*, 5(1), e1000344.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000344>
- Turrientes, M.-C., González-Alba, J.-M., Campo, R. del, Baquero, M.-R., Cantón, R., Baquero, F., & Galán, J. C. (2014). Recombination Blurs Phylogenetic Groups Routine Assignment in *Escherichia coli*: Setting the Record Straight. *PLOS ONE*, 9(8), e105395.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105395>
- Valat, C., Drapeau, A., Beurlet, S., Bachy, V., Boulouis, H.-J., Pin, R., Cazeau, G., Madec, J.-Y., & Haenni, M. (2020). Pathogenic *Escherichia coli* in Dogs Reveals the Predominance of ST372 and the Human-Associated ST73 Extra-Intestinal Lineages. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00580>
- Votava, M. (2003). *Lékařská mikrobiologie speciální*. NEPTUN.
- Votava, M. (2005). *Lékařská mikrobiologie obecná* (2. vyd.). NEPTUN.
- Weissman, S. J., Johnson, J. R., Tchesnokova, V., Billig, M., Dykhuizen, D., Riddell, K., Rogers, P., Qin, X., Butler-Wu, S., Cookson, B. T., Fang, F. C., Scholes, D., Chattopadhyay, S., & Sokurenko, E. (2012). High-Resolution Two-Locus Clonal Typing of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5), 1353–1360. <https://doi.org/10.1128/AEM.06663-11>
- Zhao, W.-D., Liu, D.-X., Wei, J.-Y., Miao, Z.-W., Zhang, K., Su, Z.-K., Zhang, X.-W., Li, Q., Fang, W.-G., Qin, X.-X., Shang, D.-S., Li, B., Li, Q.-C., Cao, L., Kim, K. S., & Chen, Y.-H. (2018). Caspr1 is a host receptor

for meningitis-causing *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 9(1), 2296. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04637-3>

Zhu, Y., Dong, W., Ma, J., Yuan, L., Hejair, H. M. A., Pan, Z., Liu, G., & Yao, H. (2017). Characterization and virulence clustering analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from swine in China. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0975-x>