

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 *Escherichia coli*: 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 *Escherichia coli*; 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

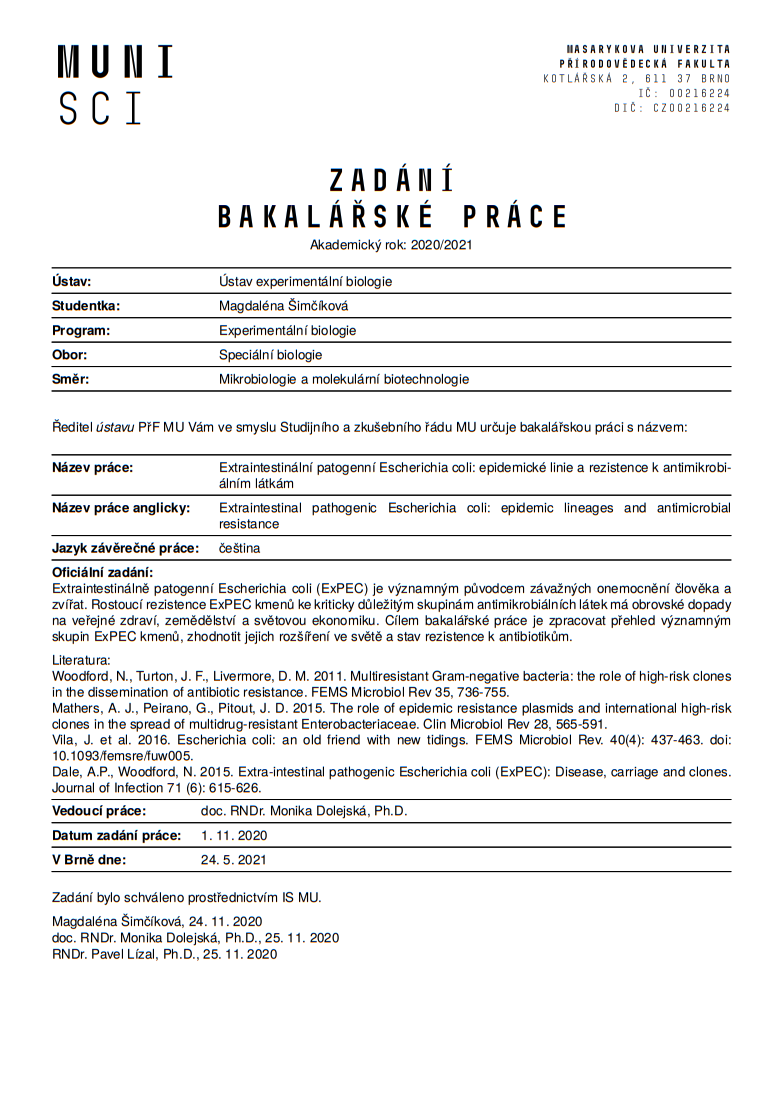
Keywords: extraintestinal *Escherichia coli*; pathogen; antibiotics; typing methods; sequence types

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 mechanizmy, 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 resistence to antimicrobials in *E. coli* and presents important epidemic lines of *E. coli*, for example, currently the most widespread ST131 worldwide.



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 zkratek 13

1 Úvod 15

2 Charakteristika *E. coli* 16

2.1 Taxonomie a rozšíření 16

2.2 Morfologie 16

2.3 Fyziologické a biochemické vlastnosti 17

2.4 Genom 18

3 Dělení *E. coli* podle patogenity a místa výskytu 19

3.1 Komenzální *E. coli* 19

3.2 Intestinální patogenní *E. coli* 19

3.3 Extraintestinální patogenní *E. coli* 21

3.4 Patogenní *E. coli* pro zvířata 23

3.4.1 Ptačí patogenní *E. coli* 23

3.4.2 Prasečí patogenní *E. coli* 23

3.4.3 Patogenní *E. coli* u psů a koček 23

3.4.4 Další zvířecí patogenní *E. coli* 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 *E. coli* 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 Mechanizmy působení antimikrobiálních látek 38

6.3 Mechanizmy 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 *E. coli* 49

7.1 *E. coli* ST131 49

7.1.1 Fylogeneze 50

7.1.2 Virulence 51

7.1.3 Rezistence k antimikrobiálním látkám 51

7.2 *E. coli* ST69 52

7.2.1 Fylogeneze 52

7.2.2 Virulence 52

7.2.3 Rezistence k antimikrobiálním látkám 53

7.3 *E. coli* ST95 54

7.3.1 Fylogeneze 54

7.3.2 Virulence 54

7.3.3 Rezistence k antimikrobiálním látkám 55

7.4 Další ST *E. coli* 55

7.4.1 *E. coli* ST393 55

7.4.2 *E. coli* ST73 56

8 Závěr 57

Použité zdroje 58

Seznam obrázků

[Obr. 1: *E. coli* s bičíky (F) a pili (P) (Mayer, 2015) 17](#_Toc72809552)

[Obr. 2: EAEC přiléhající k HEp-2 buňkám (Navarro-Garcia et al., 2010) 21](#_Toc72809553)

[Obr. 3: Zařazení *E. coli* do fylogenetické skupiny (Clermont et al., 2000) 33](#_Toc72809554)

[Obr. 4: Mechanizmy antibiotické rezistence (Grönthal et al., 2018, upraveno) 39](#_Toc72809555)

[Obr. 5: Přenos DNA konjugací (F. Al Marjani, 2015, upraveno) 47](#_Toc72809556)

Seznam pojmů a zkratek

APEC – aviární patogenní

CNF1 – cytotoxický nekrotizující faktor 1

DAEC – difúzně–adherentní

EAEC – enteroagregativní

EHEC – enterohemoragická

EIEC – enteroinvazivní

EPEC – enteropatogenní

ESBL – širokospektré β-laktamázy (z angl. extended spectrum β-lastamases)

ETEC – enterotoxigenní

ExPEC – extraintestinální patogenní

HEp-2 – lidské epiteliální buňky typu 2

HUS – hemolyticko-uremický syndrom

IPEC – intestinální patogenní

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 – vyvolávající novorozeneckou meningitidu (z angl. neonatal meningitis )

PAI – ostrovy spojené s patogeniou (z angl. pathogenicity associated islands)

PBP – Proteiny vázající penicilin (z angl. penicillin-binding protein)

SEPEC – vyvolávající sepse (z angl. sepsis-associated )

ST – sekvenční typ

Stx – Shiga toxin

UPEC – uropatogenní

WGS – celogenomové sekvenování (z angl. whole genome sequencing)

# Úvod

Bakterie Escherichia coli byla pojmenována podle svého objevitele, Theodora Eschericha (185–1911), mikrobiologa a pediatra. V roce 1884 začal studovat přirozenou mikroflóru střeva u novorozenců a změny v ní krátce po narození. Během svého výzkumu objevil a popsal bakterii, která se začala kolonizovat v střevech novorozenců již několik hodin po porodu. Tuto bakterii původně nazval Bacterium coli commune a později byla přejmenována na Escherichia coli.

Escherichia coli se stala velmi populární a často používanou bakterií v biologii díky své schopnosti rychlého růstu a snadného kultivování. Je také široce dostupná, protože neškodné kmeny E. coli běžně žijí v lidském střevě jako součást normální mikroflóry. Z těchto důvodů byla na začátku 20. století označena za modelový organismus pro studium mikrobiologie a genetiky.

Neškodná forma E. coli je přítomna u lidí a dalších savců jako běžná mikroflóra a obvykle nezpůsobuje žádná onemocnění, s výjimkou imunokompromitovaných jedinců. Nicméně některé kmeny této bakterie jsou patogenní a mohou způsobovat různá onemocnění střev i mimo střeva.

Extraintestinální patogenní kmeny E. coli mají také rostoucí odolnost vůči antimikrobiálním látkám. Nejčastěji se vyskytují širokospektrální β-laktamázy, které zprostředkovávají rezistenci proti několika běžně užívaným antibiotikům. Hlavním rizikovým faktorem jsou karbapenemázy, které vedle karbapenemů také vyvolávají rezistenci vůči všem β-laktamovým antibiotikům a často i fluorochinolonům. Geny odpovědné za rezistenci k antibiotikům se liší mezi jednotlivými epidemickými liniemi extraintestinální E. coli, které jsou globálně rozšířené a způsobují infekce močových cest, krevního řečiště a meningitidu u novorozenců.

Cílem této bakalářské práce je shrnutí dostupných informací o extraintestinální E. coli. Práce se zaměřuje na patogenitu, mechanismy virulence, stručný přehled onemocnění způsobených E. coli a popisuje metody pro její typizaci. Také se zabývá mechanismy rezistence vůči antibiotikům, které jsou nejčastěji přítomné u extraintestinální E. coli. V poslední části jsou shrnuty poznámky o některých významných sekvencích této bakterie.

# Charakteristika *E. coli*

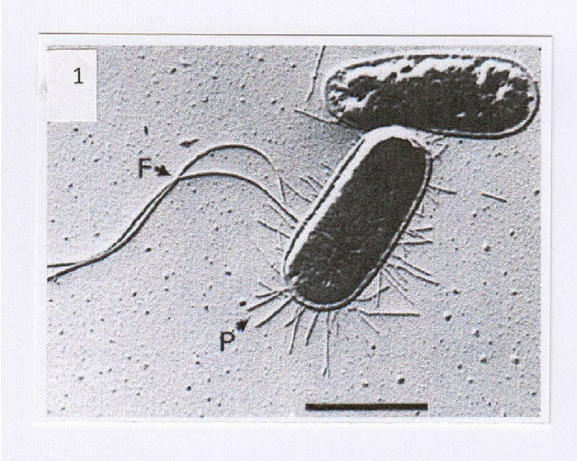
## Taxonomie a rozšíření

Escherichia coli patří taxonomicky do rodu Escherichia, který je součástí čeledi Enterobacteriaceae, řádu Enterobacterales, třídy Gammaproteobacteria a kmene Proteobacteria. Zástupci čeledi Enterobacteriaceae jsou rozšíření po celém světě a vyskytují se v půdě, vodě, ovoci, zelenině, zrnech, rostlinách, červech, hmyzu, zvířatech až po člověka. Jsou velmi rozmanití vzhledem k jejich ekologii a patogenitě. Tito zástupci čeledi způsobují intestinální onemocnění, především průjmová onemocnění, ale také extraintestinální onemocnění, jako jsou meningitidy, infekce močových cest, respiračního traktu a ran (Sedláček, 2007; Soutar & Stavrinides, 2020).

## Morfologie

Escherichia coli je jednobuněčná bakterie ve tvaru rovné tyčinky a vyskytuje se buď samostatně nebo ve dvojicích. Některé kmeny, zejména extraintestinální, jsou obklopeny polysacharidovou kapsulou (Greenwood, 2012; Sedláček, 2007).

Většina kmenů Escherichia coli je pohyblivá díky bičíkům umístěným po obvodu buňky. Na svém povrchu také má fimbrie, což jsou tenké štětinovité výběžky (viz Obr. 1). Některé typy fimbrií umožňují přichycení k různým typům buněk, například k buňkám střeva nebo urogenitálního traktu. Adheze, tedy schopnost přichycení, je jedním z důležitých prvků patogenity. Na povrchu Escherichia coli se také nacházejí tzv. sex pili, které jsou širší a delší než fimbrie. Hrají důležitou roli při procesu konjugace, což je způsob přenosu genetické informace z donorové buňky do recipientní buňky (Greenwood, 2012; Snustad & Simmons, 2017; Votava, 2005).



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

## Fyziologické a biochemické vlastnosti

Escherichia coli je bakterie, která je fakultativně anaerobní. Barví se gramnegativně, což znamená, že má tenkou vrstvu peptidoglykanu ve své buněčné stěně, na kterou navazuje vrstva lipopolysacharidu. Optimální teplota pro růst E. coli je 37 °C, ale dokáže růst v širokém rozmezí teplot (15–45 °C) (Greenwood, 2012; Sedláček, 2007).

E. coli je oxidáza-negativní, kataláza-pozitivní, metylčerveň-pozitivní a obvykle negativní při testech na citrátový metabolismus. Využívá organické látky jako zdroj energie, a proto je chemoorganotrofní bakterií s respiračním i fermentativním typem metabolismu. Roste na běžných neselektivních médiích a obvykle štěpí jak glukózu, tak laktózu. Na agaru MacConkey vytváří rozsáhlé červené kolonie, zatímco na Endově agaru jsou jeho kolonie nápadně purpurové (Greenwood, 2012; Sedláček, 2007).

## Genom

Na konci 90. let 20. století byl proveden čtení a zveřejnění kompletního genomu E. coli K-12 MG 1655. Velikost chromozomálního genomu E. coli K-12 se pohybuje mezi 4,7–5,2 Mb a může se lišit u různých kmenů. Průměrný obsah G+C činí přibližně 50,8 % a počet kódujících genů je kolem 4700 (Touchon et al., 2009).

V genomu E. coli jsou také zakódovány vlastnosti patogenity a virulence. Nicméně nebyl identifikován žádný specifický gen pro extraintestinální onemocnění. Z toho vyplývá, že extraintestinální virulence je výsledkem kombinace několika genů současně. Tyto informace podporují hypotézu, že extraintestinální virulence je vedlejším efektem komenzalismu (Touchon et al., 2009).

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

Escherichia coli kmeny lze rozdělit na patogenní a komenzální. Patogenní kmeny se dále dělí do dvou skupin podle místa jejich výskytu - intestinální a extraintestinální. Existuje také speciální skupina kmenů patogenních pro zvířata (Donnenberg, 2013).

## Komenzální *E. coli*

Escherichia coli kmeny lze rozdělit na patogenní a komenzální. Patogenní kmeny se dále dělí do dvou skupin podle místa jejich výskytu - intestinální a extraintestinální. Existuje také speciální skupina kmenů patogenních pro zvířata (Donnenberg, 2013).

3.1 Komenzální Escherichia coli

Komenzální kmeny se nacházejí v intestinálním traktu lidí a dalších obratlovců a nejsou pro hostitelský organismus škodlivé. S anaerobními mikroorganismy v mikrobiomu hostitele mohou navazovat mutualistické vztahy. Tato vzájemná výhodnost spočívá v tom, že anaerobní mikroorganismy rozkládají složité polysacharidy na jednoduché monosacharidy, které Escherichia coli využívá pro svůj růst. Naopak, Escherichia coli přispívá k vytvoření anaerobního prostředí, protože jako fakultativně anaerobní bakterie spotřebovává kyslík. Některé studie také naznačují, že komenzální kmeny Escherichia coli mohou sloužit jako bariéra proti infekci patogeny (Maltby et al., 2013).

Komenzální kmeny se vyskytují v různých fylogenetických skupinách, ale nejčastěji jsou zařazovány do skupin A, B1 a B2 (Rasko et al., 2008).

Z několika studií vyplývá, že patogenní kmeny Escherichia coli se pravděpodobně vyvinuly z komenzálních kmenů získáním virulenčních operonů, které se nachází mimo chromozom (například na plazmidech nebo bakteriofázích) nebo prostřednictvím mutací v bakteriálním chromozomu. Komenzální kmeny se také mohou stát patogenními prostřednictvím náhodných mutací v jejich genomu. Faktory virulence se pravděpodobně původně vyvinuly u extraintestinálních patogenních Escherichia coli, aby podporovaly kolonizaci střev komenzální Escherichia coli a umožňovaly její přežití v normálním střevním prostředí (Duriez et al., 2001; Köhler & Dobrindt, 2011).

## Intestinální patogenní *E. coli*

Intestinální patogenní Escherichia coli nejčastěji způsobuje průjmová onemocnění. Kmeny intestinální patogenní Escherichia coli se dělí do šesti základních a dobře studovaných skupin:

EPEC (enteropatogenní Escherichia coli)

EHEC (enterohemoragická Escherichia coli)

ETEC (enterotoxigenní Escherichia coli)

EAEC (enteroagregativní Escherichia coli)

EIEC (enteroinvazivní Escherichia coli)

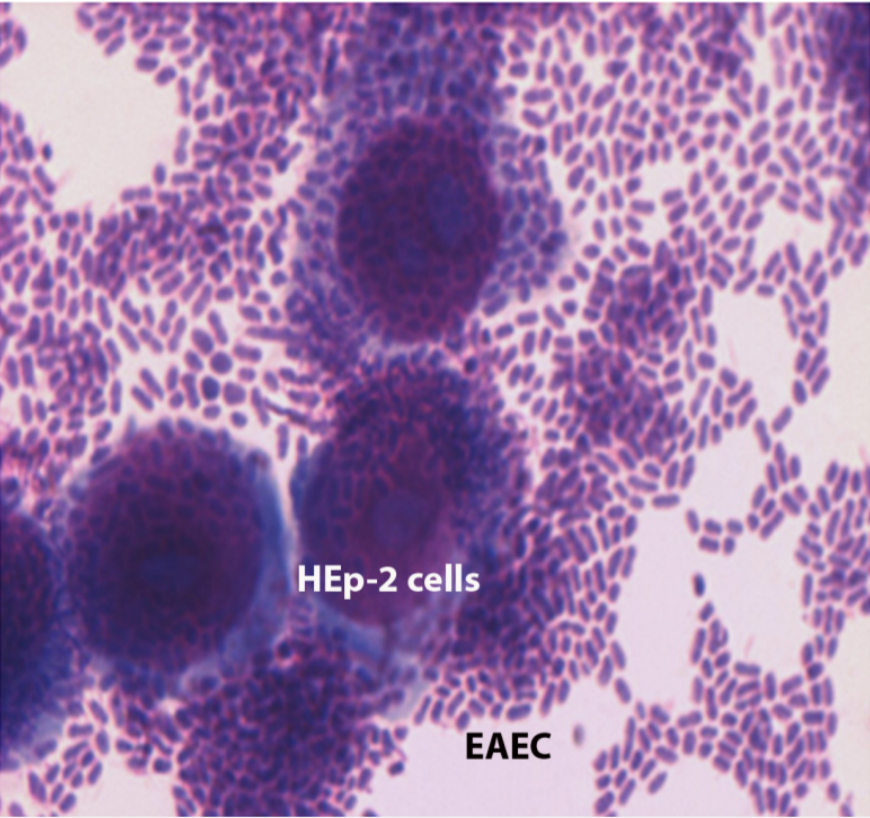
DAEC (difúzně adherentní Escherichia coli) (Kaper et al., 2004)

Kmeny EPEC způsobují průjmy, zejména u dětí, což je zvláště významný problém v rozvojových zemích. Mechanismus patogeneze byl dlouho neznámý, ale v současné době je tento patotyp jedním z nejvíce prozkoumaných ve srovnání s ostatními patogenními Escherichia coli. Charakteristickým rysem těchto kmenů je schopnost způsobit změny v cytoskeletu po přichycení na střevní epiteliální buňky (Greenwood, 2012; Kaper et al., 2004).

EHEC je především zodpovědná za krvácivé průjmy, kolitidy a hemolyticko-uremický syndrom (HUS). K rozvoji infekce postačuje pouze několik málo buněk (<100), a přenos může nastat například po požití nedostatečně tepelně upraveného masa, nepasterizovaného mléka nebo neumyté zeleniny (např. ředkviček). Hlavním virulenčním faktorem EHEC je Shiga toxin (Stx), který štěpí rRNA a tím inhibuje syntézu proteinů. Tento toxin je produkován v tlustém střevě a prostřednictvím krevního oběhu se dostává do ledvin, kde poškozuje renální endoteliální buňky a vyvolává produkci cytokinů a chemokinů. To vede ke vzniku zánětu v ledvinách, který může vyústit až v hemolyticko-uremický syndrom. HUS se projevuje hemolytickou anémií, trombocytopenií a v některých případech akutním selháním ledvin. Produkce Shiga toxinu byla zjištěna také u dalších skupin Escherichia coli (Donnenberg, 2013; Greenwood, 2012; Kaper et al., 2004).

ETEC způsobuje vodnaté průjmy, zejména u dětí a turistů v rozvojových zemích. Tito kmeny kolonizují sliznici tenkého střeva a produkují dva typy enterotoxinů - tepelně labilní a tepelně stabilní. Dalším patogenním znakem je přítomnost fimbrií, které jsou specifické pro dané hostitele a umožňují snadnější přichycení na povrchu tenkého střeva. Je také zajímavé, že tepelně stabilní enterotoxin třídy "a" inhibuje proliferaci rakovinných buněk tlustého střeva (Donnenberg, 2013; Greenwood, 2012; Kaper et al., 2004).

EAEC způsobuje perzistentní průjmy u dětí i dospělých a vyskytuje se jak ve vyspělých, tak v rozvojových zemích. Tyto kmeny neprodukují tepelně labilní ani tepelně stabilní enterotoxiny, ale mají schopnost tzv. autoagregace k lidským epiteliálním buňkám typu 2. Při tomto procesu se bakterie navzájem přilepí do charakteristické 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 nejčastěji způsobuje vodnaté průjmy a záněty tlustého střeva, vzácně také úplavici. Geneticky je podobná rodu Shigella a sdílí některé důležité virulenční faktory. Odlišuje se pouze v některých biochemických testech. Stejně jako u EHEC postačuje malé množství buněk k rozvoji onemocnění. Kmeny EIEC se dostávají skrze sliznici tlustého střeva a endocytózou pronikají do epiteliálních buněk, kde způsobují lyzi vakuol (Greenwood, 2012; Kaper et al., 2004).

DAEC způsobuje průjmová onemocnění, obvykle u dětí. Jejím typickým znakem je difuzní adheze na lidské epiteliální buňky typu 2 a asi tři čtvrtiny kmenů této skupiny produkují fimbriální adhezin F1845 (Kaper et al., 2004).

## Extraintestinální patogenní *E. coli*

Extraintestinální patogenní E. coli se dělí do několika skupin. Nejob-sáhlejší skupina zahrnuje kmeny způsobující infekce močového traktu (UPEC, z angl. uropathogenic E. coli). Další kmeny ExPEC vyvolávají na-příklad novorozenecké meningitidy (NMEC, z angl. neonatal meningitis E. coli), sepse (SEPEC, z angl. sepsis-associated E. coli), infekce dýcha-cích cest a ran (Sarowska et al., 2019; Votava, 2003).

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

Kmeny způsobující tyto infekce pochází obvykle ze střeva pacien-ta, kde nepůsobí škodlivě. Mají ovšem virulenční geny, které způsobují onemocnění, pokud se bakterie dostane do močových cest (Don-nenberg, 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 novo-rozenecké 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 hemato-encefalické 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 sepse u novorozenců i dospělých lidí. Sepse je zá-nětlivá 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)

## Patogenní *E. coli* pro zvířata

Patogenní kmeny Escherichia coli se nejčastěji vyskytují u zvířat, přičemž patří do fylogenetické skupiny B2. Tyto kmeny napadají nejen zemědělská zvířata, jako jsou prasata a drůbež, ale také volně žijící a domácí zvířata.

### Ptačí patogenní *E. coli*

Existuje skupina Escherichia coli, která je patogenní pro ptáky. Tato skupina, nazývaná APEC, je fylogeneticky blízce příbuzná extraintestinálním patogenním kmenům E. coli a sdílí s nimi některé virulenční geny (Sarowska et al., 2019).

APEC způsobuje ptačí kolibacilózu, která se projevuje několika typickými příznaky. Mezi ně patří orgánové léze, airsakulitida, perikarditida, perihepatitida a peritonitida. Toto onemocnění představuje významnou ekonomickou ztrátu v chovech drůbeže po celém světě (Ewers et al., 2003).

### Prasečí patogenní *E. coli*

U prasat se vyskytují jak intestinální, tak extraintestinální kmeny Escherichia coli. Mezi intestinální kmeny patří například enteropatogenní kmeny E. coli, které způsobují enterickou kolibacilózu nebo produkují Shiga toxin. Mezi extraintestinální kmeny, které byly izolovány u prasat, patří ST95, ST354 a ST1011. Více než 50 % izolátů extraintestinálních patogenních kmenů E. coli (ExPEC) u prasat patří do fylogenetické skupiny A a B1. Kolibacilóza u prasat způsobuje značné ztráty v zemědělství, a v posledních letech se její výskyt zvýšil, zejména v Číně (Zhu et al., 2017).

### Patogenní *E. coli* u psů a koček

U psů a koček byly také nalezeny izoláty Escherichia coli, které způsobují extraintestinální onemocnění, jako jsou infekce močových cest nebo záněty středního ucha. Příklady těchto izolátů zahrnují ST131, ST167 a ST648. Byly také zaznamenány případy, kdy byl nalezen identický multirezistentní kmen E. coli u psa a jeho majitele. Přenos v těchto případech pravděpodobně proběhl z člověka na psa, protože izolát prokázal rezistenci vůči karbapenemovým antibiotikům, která se v veterinární praxi běžně nepoužívají. Používání těchto antibiotik u zvířat je navíc omezeno, a proto není pravděpodobné, že by se rezistence na karbapenemy vyvinula kvůli jejich častému používání u zvířat (Grönthal et al., 2018; Marques et al., 2018).

### Další zvířecí patogenní *E. coli*

Patogenní kmeny Escherichia coli, zejména ty produkující Shiga toxin, se vyskytují i u dalších hospodářských zvířat, jako jsou ovce, kozy a skot. V případě těchto zvířat představuje riziko zejména konzumace nepasterizovaného mléka nebo nedostatečně tepelně upraveného masa, které může vést k přenosu na člověka (Heredia & García, 2018).

# Patogenita

Patogenita je charakterizována jako schopnost mikroorganismu vyvolat onemocnění, zatímco virulence se odkazuje na míru této patogenity. Aby byla patogenita mikroorganismu co nejvyšší, musí být splněny určité podmínky a mikroorganismus musí vyvinout mechanismy patogenity. Prvním z těchto podmínek je schopnost přenosu, druhým je invazivita a třetím je toxicita patogenu. Důležitým faktorem je také schopnost patogenu přežít v hostitelském organismu (Donnenberg, 2013; Greenwood, 2012; Votava, 2005).

Patogeny jsou rozdělovány na oportunní a primární. Oportunní patogeny nevyvolávají onemocnění vždy, pouze v případě poškození nebo narušení imunity a anatomie hostitele. Na druhou stranu, primární patogeny vyvolávají onemocnění i u zdravého jedince. Extraintestinální E. coli je považována za oportunní patogen (Greenwood, 2012; Köhler & Dobrindt, 2011).

## Virulenční faktory ExPEC

Extraintestinální patogenní E. coli je vybavena širokým arzenálem virulenčních faktorů, které umožňují její patogenitu. Těmito faktory jsou například toxiny, adheziny, systémy pro získávání železa, lipopolysacharidy, polysacharidové kapsuly, invaziny, plazmidy a další genetické elementy (Sarowska et al., 2019).

Mnoho z těchto virulenčních faktorů je umístěno na tzv. ostrovech spojených s patogenitou (PAI, z angl. pathogenicity associated islands). Tyto PAI se nacházejí v blízkosti genů pheV, pheU a asnT, které kódují tRNA. Ostrov patogenity poblíž genu pheV obsahuje geny pro tvorbu fimbrií, syntézu aerobaktinu, hemolysinu, kapsuly a dvou autotransportérů. Ostrov patogenity poblíž genu pheU obsahuje geny pro tvorbu fimbrií a receptory pro siderofory, stejně jako ostrov patogenity u genu asnT, který obsahuje geny pro yersiniabaktin (Donnenberg, 2013).

### Adherence

Adherence je schopnost mikroorganismů pevně se připojit k povrchu epitelu. Tato vlastnost je zejména důležitá pro kmeny UPEC při přichycení k urotelu (Kaper et al., 2004).

Existují dva hlavní způsoby, jak mikroorganismy provádějí adherence. Prvním z nich je pomocí fimbrií nebo fibril. Fimbrie jsou duté tyčinkovité struktury na povrchu bakteriální buňky, které mají přibližně 5 nm v průměru a 100 nm délky. Fibrily jsou ještě tenčí, mají průměr 2-4 nm a mohou být pevné nebo pružné. Při tomto mechanismu adherence se konec fimbrie specificky váže na receptor na povrchu epitelu, který obvykle obsahuje uhlovodíkový zbytek glykoproteinu nebo glykolipidu. Tím se dosáhne přichycení bakterie k buňce. Tato specifická vazba mezi fimbriemi bakterie a buňkovým receptorem je charakteristická pro daný druh bakterie (Kaper et al., 2004; Votava, 2005).

Pro kmeny E. coli jsou typické fimbrie typu 1. Ty hrají významnou roli při infekcích močového traktu, protože umožňují vstup do hostitelských buněk a následné jejich poškození. Také přispívají k přichycení a setrvání bakterií na povrchu různých tkání močového traktu, jako je proximální tubulus, distální tubulus, sběrný kanálek nebo stěny cév. Fimbrie typu 1 se skládají z proteinů FimA, FimF, FimG a FimH. Skupina proteinů FimA je nejpočetnější, ale není klíčová pro virulenci. Protein FimH, sám nebo ve spojení s proteinem vázajícím lipopolysacharidy, může stimulovat Toll-like receptor 4 a spustit signální kaskády vedoucí k humorální imunitní odpovědi (Behzadi & Carevic, 2019).

Druhý způsob adherence je prostřednictvím nefimbriálních adhezinů, které je obtížné vizualizovat. Některé z těchto adhezinů se vážou na proteiny na povrchu eukaryotických buněk. Příkladem takového adhezinu je intimin u UPEC a EHEC (Kaper et al., 2004; Votava, 2005).

### Toxiny

Toxiny a další efektorové proteiny, které jsou vylučovány bakteriemi, spouštějí a modulují signální transdukční dráhy ovlivňující základní procesy eukaryotických buněk. Toxiny se vyskytují jak u intracelulárních E. coli, jako je případ kmenů ETEC a EHEC, tak u extraintestinálních E. coli, zejména UPEC a NMEC (Kaper et al., 2004).

Kmeny ETEC produkují dva typy toxinů, tepelně stabilní a tepelně labilní, které zvyšují koncentraci intracelulárních druhů poselů (např. cAMP, cGMP, Ca2+), čímž dochází k sekreci iontů. Kmeny ETEC produkují jeden z těchto toxinů nebo oba zároveň. Další skupinou intestinálních E. coli, pro které jsou typické toxiny, jsou EHEC. Tyto kmeny produkují Shiga toxin, který štěpí rRNA a narušuje syntézu proteinů, a tím ničí epiteliální nebo endoteliální buňky. U EHEC a EPEC se vyskytuje také toxin Cif, který blokuje buněčné dělení v G2/M fázi buněčného cyklu (Kaper et al., 2004).

ExPEC má širokou škálu toxinů, které plní různé funkce. Mezi nejčastější patří cytotoxické nekrotizující faktory 1 a 2, termolabilní hemaglutinin TSH, hemolysin-α, hemolysin D a F, sekretovaný autotransportní toxin SAT, proteázy kolonizující PIC, autotransportní toxin VAT, který způsobuje tvorbu vakuol, cytolethal distribuující toxin 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 je často přítomen u uropatogenních kmenů E. coli, které způsobují infekce močového traktu. Tento toxin pomáhá E. coli vstoupit do buňky a působí na aktinový skelet lidských epiteliálních buněk typu 2, vytváří velké vakuoly. CNF1 může vyvolávat až apoptotickou smrt epiteliálních buněk močového měchýře a také způsobuje exfoliaci buněk močového měchýře, což usnadňuje pronikání bakterií do hlubších tkání (Behzadi & Carevic, 2019).

Hemolysin-α (HlyA) je lipoprotein a patří do skupiny RTX toxinů. Poškozuje buněčnou membránu a způsobuje apoptózu. HlyA může lyzovat erytrocyty a jiné hostitelské buňky s jádrem (Behzadi & Carevic, 2019).

Sekretovaný 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 virulenci UPEC. CDT je složen ze tří proteinů, které zahrnují CdtA, CdtB a CdtC. CDT má enzymatickou aktivitu podobnou DNáze I a přímo napadá DNA. Většina bakteriálních toxinů napadá buněčnou membránu nebo jiné struktury v cytoplazmě. Poškození DNA pak vede k buněčné smrti (Behzadi & Carevic, 2019).

Toxiny jsou transportovány z cytoplazmy bakterií do hostitelských buněk několika mechanismy. Například tepelně labilní enterotoxin je vylučován do extracelulárního prostoru prostřednictvím sekrečního systému typu II. Některé toxiny patří do skupiny autotransportérů, kde jedna část vytváří "β-barrel" ve vnější membráně a umožňuje průchod druhé části do extracelulárního prostoru. Další skupinou jsou autotransportní serinové proteázy Enterobacteriaceae, které produkují kmeny DAEC a UPEC. Sekreční systém typu III se vyskytuje u EPEC, EHEC a EIEC. Jedná se o složitý systém více než 20 proteinů tvořících "jehlu a stříkačku", který umožňuje vstup efektorových proteinů do hostitelské buňky. Hemolysin-α u UPEC využívá sekreční mechanismus typu I a využívá TolC k exportu z buňky, čímž způsobuje lyzi buňky. Zatím nebyl popsán sekreční mechanismus typu IV u patogenních E. coli (Kaper et al., 2004).

### Systémy získávání železa

Stejně jako v lidském těle, i v bakteriálních buňkách hraje železo důležitou roli. E. coli využívá železo pro transport a uchování kyslíku, syntézu DNA, elektronový transport a metabolismus peroxidů. Pokud je nedostatek železa, bakterie ztrácí svou adaptabilitu v důsledku porušení buněčných kapsul. Nicméně bakterie vyvinuly mechanismy pro získávání železa v hostitelském organismu (Terlizzi et al., 2017).

Kmeny ExPEC disponují membránovými pumpy, které přenášejí železo do buňky. Například pumpa FeoAB nebo transportéry SitABCD, Hma a ChuA umožňují přímou absorpci železa z extracelulárního hemu. Další možností nepřímého příjmu železa jsou specializované systémy, které fungují na základě tzv. kyvadlového mechanismu a zahrnují malé molekuly s vysokou afinitou k iontům železa nazývané siderofory (Sarowska et al., 2019).

Siderofory jsou molekuly, které vážou trojmocné železo. Pro kolonizaci močového traktu E. coli je pro bakterie UPEC nezbytné využití železa, který je získán pomocí sideroforů. U E. coli se vyskytují čtyři skupiny sideroforů: yersiniabaktin, aerobaktin, enterobaktin a salmochelin. Tyto siderofory jsou produkovány bakteriemi v prostředí s nízkou koncentrací železa a jsou negativně regulovány přítomností Fe2+ a železem vázajícími regulátory. Je zajímavé, že siderofory nejsou přítomny pouze u prokaryot, ale také u hub a rostlin (Terlizzi et al., 2017).

Yersiniabaktin byl původně objeven u Yersinia pestis. Jedná se o hybridní typ sideroforu, který se vyskytuje mezi členy čeledi Enterobacteriaceae. Yersiniabaktin má vysokou afinitu k železu a vytváří komplexy s železem jako yersiniabaktin-Fe3+. Molekula železa je rozpoznána specifickým receptorem na vnější bakteriální membráně a poté je uvolněna z yersiniabaktinu do cytoplazmy bakterie. Má také schopnost chránit bakteriální buňky před imunitní reakcí hostitele (Sarowska et al., 2019; Terlizzi et al., 2017).

Aerobaktin nejlépe váže Fe3+ v kyselém prostředí a jeho produkce je nejvyšší při nízkém pH. Tento siderofor odebírá Fe3+ z hostitelských železem vázajících proteinů a je absorbován prostřednictvím vnější membránové receptorové molekuly. Aerobaktin se skládá ze dvou molekul lysinu a jedné molekuly citrátu, které jsou katalyzovány enzymem aerobaktin-syntázou. Stejně jako salmochelin je kódován virulenčními plazmidy CoIV a CoIBM. Aerobaktin je efektivnější než enterobaktin při zachytávání železa (Sarowska et al., 2019; Terlizzi et al., 2017).

Enterobaktin se téměř vyskytuje ve všech E. coli, včetně patogenních i komensálních kmenů. Je méně rozpustný a méně stabilní než aerobaktin, ale má vyšší afinitu k železu. Železo je uvolňováno z enterobaktinu hydrolýzou sideroforu. Enterobaktin umožňuje UPEC kolonizovat prostředí s nízkou koncentrací železa, jako je močový trakt. Limitací tohoto sideroforu je, že může být inaktivován hostitelskými proteiny (např. sérovým albuminem a siderokalinem). Enterobaktin a salmochelin jsou také syntetizovány dalšími patogenními střevními bakteriemi, jako jsou Salmonella spp. nebo Klebsiella spp. (Sarowska et al., 2019; Terlizzi et al., 2017).

Salmochelin, jak již název naznačuje, byl poprvé objeven u bakterie Salmonella spp. Vyskytuje se často u kmenů ExPEC a je považován za charakteristický virulenční faktor. Je kódován genovým klastrém iroBCDEN, který je přítomen na virulenčních plazmidech CoIV a CoIBM nebo na PAI. Gen iroB je jediný s glykosyltransferázovou aktivitou, která je nezbytná pro produkci salmochelinu, protože salmochelin je glykosylovaný derivát enterobaktinu. Glykosylací se mění jeho vlastnosti z hydrofobních na hydrofilní, což zvyšuje virulenci ExPEC. Díky glykosylaci enterobaktinu není salmochelin rozpoznáván siderokalinem a uniká tak imunitnímu systému hostitele (Sarowska et al., 2019; Terlizzi et al., 2017).

### Kapsula

Kapsula je složena převážně z polysacharidů a její hlavní funkcí je ochrana bakterií před nepříznivými vnějšími podmínkami. Hraje klíčovou roli při ochraně před fagocytózou, účinky baktericidních faktorů hostitele a také poskytuje antimikrobiální rezistenci a odolnost vůči antisérům (Sarowska et al., 2019).

Kmeny ExPEC vykazují specifickou strukturu polysacharidových kapsulí, která jim umožňuje napodobovat složky tkání hostitele a tím znesnadňuje rozpoznání bakterií imunitním systémem. Některé kmeny E. coli jsou schopny produkovat kapsulární antigen K1, který je spojen s novorozeneckou sepse. Gen neuC je zodpovědný za tvorbu K1 kapsulí a existuje celkem 14 kps operonů, které se podílejí na jejich syntéze. Proteiny, které umožňují přenos polymeru z místa syntézy na povrch buňky, jsou kódovány genem kpsMTII. Studie genotypizace NMEC kmenů ukázaly, 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 také projevují schopnost vytvářet biofilm (Sarowska et al., 2019; Terlizzi et al., 2017).

# Typizace *E. coli*

Typizační metody by měly v případě bakterií umožnit rychlé a přesné stanovení patogenu, jeho evoluční historii, zdatnost a patogenní poten-ciál. Metod typizace E. coli je několik (např. zařazení do sérotypů, fylo-genetických 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 mo-lekul 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).

## Sérotypizace

V sedmdesátých letech minulého století se začala používat sérotypizace E. coli, která se zakládá na identifikaci přítomnosti nebo nepřítomnosti antigenních struktur somatických lipopolysacharidů (O), bičíků (H) a kapsulí (K). Bylo popsáno více než 200 O-antigenů, 50 H-antigenů a 80 K-antigenů. K-antigeny se dělí do dvou skupin (I a II), které byly dříve označovány jako A a L. Některé typy antigenů nevyskytují u E. coli náhodně, ale jsou častěji spojovány s určitými typy onemocnění (Greenwood, 2012; Sarowska et al., 2019).

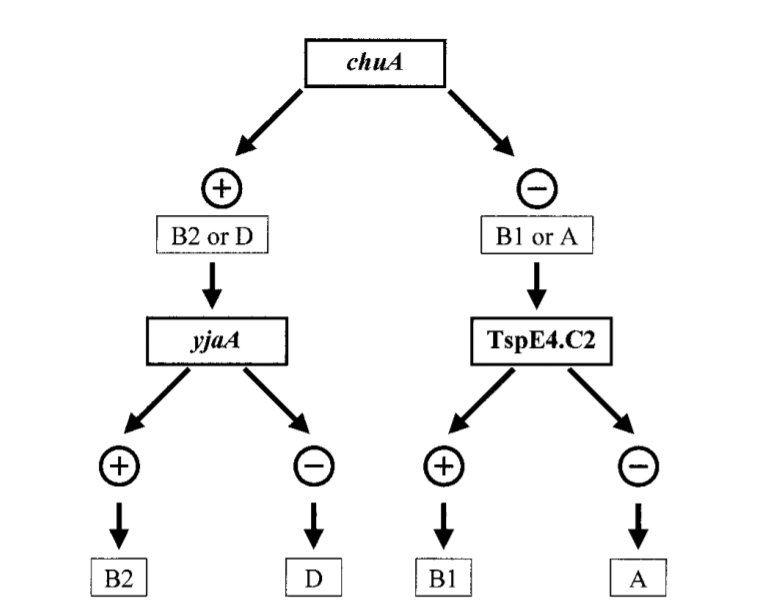
## Multilokusová enzymatická elektroforéza

Bakteriální typizace MLEE (multi-locus enzyme electrophoresis) funguje na principu měření elektroforetické mobility enzymů. Na základě této metody byla vytvořena referenční sbírka 72 kmenů E. coli označovaná jako ECOR (E. coli reference). Několik kmenů pocházelo také ze zvířat a zahrnovalo jak patogenní formy (UPEC), tak komenzální formy. Analyzováním dat byly identifikovány 4 hlavní fylogenetické skupiny: A, B1, B2 a D. MLEE byla také užitečná při zařazování ExPEC do skupin B2 a D a IPEC do skupin A a B1. Skupiny B2 a D se oproti skupinám A a B1 vyznačují častějším výskytem a větší diverzitou v oblasti virulence (Clermont et al., 2011; Chaudhuri & Henderson, 2012; Köhler & Dobrindt, 2011; Le Gall et al., 2007).

S rozvojem nových sekvenačních metod se MLEE postupně přestala používat, protože data získaná pomocí MLEE nejsou ideální pro fylogenetickou analýzu. Enzymy s nízkou sekvenční podobností mohou vykazovat podobnou elektroforetickou mobilitu. Proto jsou nukleotidové aminokyselinové sekvence mnohem vhodnější, protože poskytují informace o několika lokusech a jsou méně pravděpodobné, že by byly ovlivněny konvergencí (Chaudhuri & Henderson, 2012).

## Multiplexní PCR

V roce 2000 byla pro typizaci E. coli zavedena metoda zvaná triplex PCR, která je rychlejší, jednodušší a levnější než MLEE. Tato metoda detekuje přítomnost nebo nepřítomnost genů chuA, yjaA a fragmentu DNA TSPE4.C2. Gen chuA je přítomen u skupin B2 a D, ale nenachází se ve skupinách A a B1. Gen yjaA slouží k rozlišení mezi skupinami B2 a D, přičemž je přítomen u skupiny B2, ale ne u skupiny D. DNA fragment TSPE4.C2 je přítomný u izolátů skupiny B1, ale ne u izolátů 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 je možné rozdělit E. coli do čtyř základních fylogenetických skupin. Nicméně v současnosti víme, že existuje alespoň sedm fylogenetických skupin E. coli: A, B1, B2, C, D, E, F. Z tohoto důvodu byla metoda triplex PCR vylepšena přidáním genu arpA, čímž se stala quadruplex PCR. Spolu s PCR specifickou pro dvě alely (pro fylogrupy C a E) umožňuje tato metoda identifikovat všechny sedm fylogenetických skupin (Clermont et al., 2015; Turrientes et al., 2014).

Multiplexní PCR je běžně používaná v mikrobiologických epidemiologických laboratořích pro rutinní zařazování E. coli do fylogenetických skupin (Turrientes et al., 2014).

## Multilokusová sekvenční typizace

V současnosti je metoda multilokusové sekvenční typizace (MLST) jednou z nejčastěji používaných metod pro typizaci E. coli. Tato metoda zahrnuje sekvenování vybraných "housekeeping" genů na bakteriálním chromozomu. Obvykle se sekvenuje 5-8 těchto genů, přičemž nejčastěji se používá 7. MLST umožňuje detailní analýzu linií ExPEC a zařazení izolátů do sekvenčních typů (ST), které jsou definovány jako izoláty s identickými alelickými profily, a do klonálních komplexů (CC), které zahrnují nejméně 3 sekvenční typy lišící se o méně než 1 alelu ze 7 (Dale & Woodford, 2015).

"Housekeeping" geny se používají především proto, že jsou pod silným výběrem, a tak pozorované varianty pravděpodobně budou selektivně neutrální. Při použití MLST pro fylogenetické studie existuje problém s volbou genů 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/schémata MLST, které se liší kombinacemi genů. Společným genem všech tří je gen icd. První databáze, nazvaná EcMLST, byla vytvořena Thomasem Whittmanem (Michigan State University) a zaměřuje se především na EPEC. Ostatní dvě databáze nejsou zaměřeny na žádnou konkrétní skupinu E. coli. Jednu z nich vytvořili Sylvain Brisse a Erick Denamur (Pasteur Institute) a druhou vytvořil Marek Achtman (Warwick Medical School). Achtmanovo schéma je nejčastěji používané pro E. coli. Zahrnuje geny adk, fumC, gyrB, icd, mdh, purA a recA (Clermont et al., 2015).

MLST analýza umožňuje identifikovat klonální linie ExPEC s vysokou virulencí, ale není schopná jasně rozlišit mezi patogenními a nepatogenními kmeny E. coli. To podporuje myšlenku, že kmeny ExPEC jsou fakultativními patogeny a mají svůj původ v komenzálních kmenech. MLST také poskytuje informace o tom, že fylogenetická skupina B2 představuje nejstarší evoluční linii uvnitř druhu (Köhler & Dobrindt, 2011).

## CH typizace

V roce 2012 Weissman et al. popsal novou metodu nazvanou CH typizace. Tato metoda zahrnuje sekvenční typizaci dvou lokusů E. coli, konkrétně 489nukleotidového fragmentu fimH (kódujícího fimbrie typu 1) a 469nukleotidového fragmentu fumC, který se používá ve standardní MLST. Tento přístup poskytuje více haplotypů než standardní 7-locusová MLST, umožňuje rozdělení velkých skupin ST na různé klonální podskupiny a rozlišuje různé ekotypy a patotypy v rámci ST. Navíc specifické CH profily korespondují s konkrétními ST nebo skupinami ST s přesností 95 %, což umožňuje predikci profilů MLST (Dale & Woodford, 2015; Weissman et al., 2012).

CH typizace pravděpodobně nenahradí MLST při fylogenetických studiích, ale má několik výhod, zejména při identifikaci klonů uvnitř ST. Má také nižší náklady, a proto může být použita pro předběžné studie větších souborů klinických vzorků (Dale & Woodford, 2015).

## Celogenomové sekvenování

Celogenomové sekvenování (WGS) poskytuje nejpřesnější výsledky pro charakterizaci kmenů a pro epidemiologické a fylogenetické analýzy. Tato metoda generuje obrovské množství genomických sekvencí díky veřejným i soukromým projektům po celém světě. WGS má význam nejen pro sekvenování bakteriálních genomů, ale také lidského genomu (Dale & Woodford, 2015).

WGS zkoumá přítomnost nebo nepřítomnost jednotlivých genů a umožňuje definitivní a semikvantitativní porovnání mezi izoláty, například pomocí studií jednonukleotidových polymorfismů (Dale & Woodford, 2015).

Celogenomové sekvenování patří mezi metody sekvenování nové generace (NGS), které sekvenují nukleotidy rychleji a levněji než tradiční Sangerova sekvenace. NGS poskytuje vyšší průtok dat s nižšími náklady. Na rozdíl od Sangerovy sekvenace, NGS nevyžaduje klonování bakteriálního genomu a přípravu knihovny pro sekvenování v bakteriálních buňkách. NGS zpracovává miliony sekvenčních reakcí paralelně a detekce bází je prováděna cyklicky a současně. Díky těmto vlastnostem je celogenomové sekvenování prováděno v krátkém časovém horizontu. Pro zpracování krátkých čtecích sekvencí na úrovni genomu byly vyvinuty nové srovnávací algoritmy (Park & Kim, 2016).

Důležitou součástí je interpretace dat pomocí bioinformatických softwarů a databází, které poskytují vědcům nové možnosti v oblasti genomiky. Technologie NGS jsou vyvíjeny několika společnostmi, mezi nejznámější patří Roche, Life Technologies a Illumina (Park & Kim, 2016).

WGS se čím dál častěji používá díky poklesu nákladů na tuto metodu. Očekává se, že s postupem času nahradí MLST a další metody založené na PCR. Nicméně z důvodu standardizace je pravděpodobné, že nomenklatura ST odvozená z dobře zavedených MLST schémat zůstane zachována (Clermont et al., 2015; Dale & Woodford, 2015).

Celogenomové sekvenování přispívá k rozšíření poznatků o infekčních chorobách a klinické mikrobiologii. Tato metoda je široce využívána ve zdravotnických laboratořích, referenčních laboratořích a laboratořích pro kontrolu nemocničních infekcí. WGS představuje významný krok směrem k personalizované medicíně a umožňuje predikci, prevenci, diagnostiku a léčbu onemocnění (Kwong et al., 2015).

# Antimikrobiální látky a rezistence

Termín "antibiotika" byl poprvé použit Selmanem Waksmanem v roce 1941 a označoval malé molekuly produkované mikroorganismy, které potlačují růst jiných mikroorganismů. Antibiotika se přirozeně vyskytují u některých bakterií a hub. Používají se k léčbě a prevenci bakteriálních infekcí a mají různé mechanismy účinku, kterými inhibují nebo potlačují růst bakterií. S časem se začaly vyrábět také polosyntetické deriváty a termín "antibiotika" byl nahrazen výrazem "antimikrobiální látky", který zahrnuje přírodní, polosyntetické i syntetické látky schopné inhibice mikroorganismů a způsobení jejich apoptózy (Clardy et al., 2009; Kourkouta, 2018).

Rezistence vůči antibiotikům je definována jako schopnost bakterie odolávat antimikrobiálním látkám. Vyjadřuje se minimální koncentrací antibiotika potřebnou k inhibici růstu bakterií. Mechanismy rezistence jsou kódovány buď v bakteriálním chromozomu nebo mimo něj na mobilních genetických elementech (například plazmidech, transpozomech, inzerčních sekvencích). Mobilní genetické elementy mají zvláštní význam při přenosu rezistence mezi buňkami (Babakhani & Oloomi, 2018; Brauner et al., 2016).

## Historie objevu antibiotik

Objev antibiotik přispěl k rychlému rozvoji medicíny a vzniku nových oborů. V současnosti se antimikrobiální látky široce využívají nejen v lékařství, ale také v zemědělství jako látky podporující nebo potlačující růst (Aminov, 2010).

Za počátek studia antimikrobiálních látek se považuje 90. léta 19. století, kdy Rudolf Emmerich a Oscar Löw poprvé popsali antibiotikum nazvané pyokyanáza, které pochází z Pseudomonas aeruginosa. Dalším milníkem v objevu antimikrobiálních látek byl lék Salvarsan, účinný proti syfilisu, který roku 1909 představil Paul Ehrlich. Nejvýznamnější objev v historii provedl Alexandr Fleming v roce 1928, kdy objevil penicilin, který je produktem houb Penicillium spp. Fleming studoval baktericidní účinek penicilinu na mikroorganismy a zjistil, že působí proti stafylokokům a obecně proti gram-pozitivním patogenům. Několik let po Flemingově objevu, v roce 1946, dokázali vědci z Oxfordské univerzity produkovat stabilní penicilin v dostatečném množství pro klinické použití (Aminov, 2010; Clardy et al., 2009; Kourkouta, 2018).

Roku 1932 byl také objeven první sulfonamid firmou Bayer, a na přelomu 40. a 50. let minulého století byly objeveny streptomycin a tetracyklin. V současnosti je známo více než 100 antimikrobiálních látek s různými mechanismy účinku (Kourkouta, 2018).

## Mechanizmy působení antimikrobiálních látek

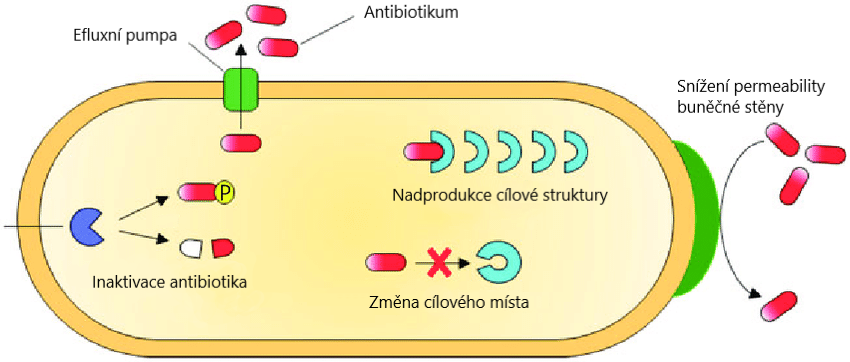
Antibiotika působí na tři základní struktury buňky - buněčnou stěnu, nukleové kyseliny a ribozomy. Některá antibiotika také ovlivňují buněčnou membránu nebo specifické metabolické dráhy (Ebimieowei & Ibemologi, 2016; Kapoor et al., 2017).

Antibiotika působící na peptidoglykan, který je součástí bakteriální buněčné stěny, zabraňují jeho syntéze. To mohou provést dvěma způsoby. Prvním způsobem je blokování transpeptidáz, enzymů produkujících vazby v peptidoglykanu, a druhým způsobem je navázání substrátových molekul na konce peptidových řetězců (Beneš, 2018; Kapoor et al., 2017).

Enzymy topoisomerázy hrají důležitou roli při přepisu genetické informace, a právě na ně se zaměřují antibiotika působící na nukleové kyseliny. Tyto antibiotika narušují funkci topoisomeráz, což vede k rozvázání a přerušení DNA na několika místech, což narušuje stabilitu buňky a vede k její smrti. Příkladem antibiotik z této skupiny jsou fluorochinolony, které ovlivňují topoizomerázu II (DNA-gyrázu), enzym zodpovědný za odvíjení a svinování DNA. Po rozvázání DNA se fluorochinolon váže na její volné konce a znemožňuje topoizomeráze opětovně spojit DNA (Beneš, 2018; Kapoor et al., 2017).

## Mechanizmy rezistence ExPEC k antimikrobiálním látkám

Bakterie mají různé mechanismy, jak se přizpůsobit účinkům antibiotik. Patří sem změna cílových míst enzymů, které tvoří peptidoglykan, aktivační pumpy pro vypuzování antibiotik z buňky, omezení propustnosti buněčné stěny nebo počtu porinů a produkce enzymů, které inaktivují antibiotika fosforylací nebo hydrolytickým štěpením (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)

### β-laktamázy a jejich klasifikace

Bakterie vylučují β-laktamázy jako nejčastější obranný mechanismus proti β-laktamovým antibiotikům. β-laktamová antibiotika se dělí do pěti skupin: peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, monobaktamy a inhibitory β-laktamáz. Tyto antibiotika inaktivují bakteriální enzymy DD-peptidázy (proteinů vázajících penicilin - PBP), které spojují postranní peptidové řetězce v buněčné stěně (Beneš, 2018).

Pro klasifikaci β-laktamáz se nejčastěji používá třídění dle Amblera. Podle uspořádání aktivního centra se β-laktamázy dělí do 4 skupin (A-D). Třída A, C a D zahrnuje serinové proteázy, kde serin hraje klíčovou roli. V třídě B se nacházejí metalo-β-laktamázy s iontem zinku ve středu molekuly (Beneš, 2018).

Širokospektré β-laktamázy patří do třídy A a hydrolyzují zejména cefalosporiny 3. generace a peniciliny. Mezi ně patří také karbapenemázy. Třída B zahrnuje metalo-β-laktamázy, které rozkládají všechna β-laktamová antibiotika, včetně karbapenemů. Třída C zahrnuje AmpC cefamycinázy, které hydrolyzují cefalosporiny 3. generace, ale také některé peniciliny. Třída D zahrnuje ESBL (rozšířené spektrum β-laktamáz) a karbapenemázy. Tyto enzymy rozkládají zejména oxacilin, ale také ampicilin, cefalotin, peniciliny a cefalosporiny 3. generace (Beneš, 2018; Pfeifer et al., 2010).

#### Širokospektré β-laktamázy

Širokospektré β-laktamázy hydrolyzují především cefalosporiny 3. a 4. generace, peniciliny, monobaktamy a antibiotika obsahující oxyiminovou skupinu v postranním řetězci (například cefotaxim, ceftriaxon, ceftazidim, ceftizoxim, aztreonam). Tyto enzymy nehydrolyzují cefamyciny a karbapenemy a jsou inhibovány běžnými inhibitory β-laktamáz, jako je kyselina klavulanová, sulbaktam a tazobaktam (Beneš, 2018; J. Pitout, 2012).

ESBL jsou nejčastěji přítomné u E. coli a Klebsiella pneumoniae, ale vyskytují se i u jiných zástupců čeledi Enterobacteriaceae. V 80. až 90. letech 20. století byly nejčastěji izolovány ESBL typu TEM a SHV, které vznikly mutacemi enzymů TEM-1, TEM-2 a SHV-1. Tyto enzymy získaly rozšířenou substrátovou specifitu. Později byly objeveny CTX-M β-laktamázy, původně z chromozomálního genu Kluyvera spp., které se postupně rozšířily mezi dalšími kmeny Enterobacteriaceae, včetně E. coli. CTX-M β-laktamázy se staly nejběžnějším typem β-laktamáz na světě. E. coli produkující CTX-M jsou obvykle zodpovědné za komunitní infekce močových cest, bakteriemií a nitrobřišních infekcí. Některé kmeny jsou rezistentní i vůči dalším antibiotikům, jako je trimethoprim-sulfamethoxazol, tetracyklin, gentamicin, tobramycin nebo ciprofloxacin. Nejrozšířenějším typem ESBL je v současnosti CTX-M-15, který se vyskytuje u významných epidemiologických klonů (Beneš, 2018; Pfeifer et al., 2010; J. Pitout, 2012).

#### AmpC β-laktamázy

Na chromozomu E. coli se nachází gen, který kóduje AmpC β-laktamázy. Tyto β-laktamázy se obvykle producují v malém množství, protože gen pro AmpC je regulován slabým promotorem a silným atenuátorem. AmpC β-laktamázy působí proti penicilinům a cefalosporinům 1. až 3. generace, a při léčbě infekcí způsobených bakteriemi produkujícími tyto enzymy se používají cefalosporiny 4. generace, monobaktamy nebo karbapenemy. AmpC β-laktamázy nejsou inhibovány běžnými β-laktamázovými inhibitory, jako je kyselina klavulanová, sulbaktam nebo tazobaktam. Jako účinné inhibitory se ukázaly boronové kyseliny a kloxacilin (Beneš, 2018; J. Pitout, 2012).

Podobně jako bakterie produkující ESBL, i AmpC β-laktamázy jsou zodpovědné za nozokomiální infekce, které se rozšířily ve 80. a 90. letech minulého století. Pacienti infikovaní bakteriemi s AmpC β-laktamázami měli podobné klinické příznaky jako pacienti infikovaní bakteriemi produkujícími ESBL typu TEM a SHV (J. Pitout, 2012).

Mezi AmpC β-laktamázy patří například CMY-2, FOX-5 nebo DHA-1. Ukázalo se, že enzym CMY-2, který původně pochází z rodu Citrobacter spp., je nejčastěji přenášen plazmidem a způsobuje cefamycinázu u E. coli. Izoláty E. coli produkující CMY-2 jsou běžnými komunitními patogeny, které například způsobují infekce močových cest (J. Pitout, 2012).

Gen ampC se nachází na chromozomu téměř ve všech enterobakteriích. Exprese genu ampC je indukována β-laktamovými antibiotiky, například cefotaximem. U E. coli existují dva typy AmpC β-laktamáz, chromozomální a plazmidové. Exprese plazmidových genů ampC zajišťuje rezistenci u druhů, které nemají gen ampC na chromozomu nebo u druhů s nízkou expresí chromozomálního genu (například E. coli). Mezi plazmidové geny ampC patří CMY, MIR, MOX, FOX, DHA a ACC. V současnosti jsou nejčastěji zjištěny CMY a DHA β-laktamázy u E. coli (Pfeifer et al., 2010).

#### Karbapenemázy

Karbapenemázy jsou enzymy evolučně velmi staré, avšak v důsledku používání antibiotik vznikly i nové varianty těchto enzymů. Tyto mutace a změny v aktivním centru β-laktamáz představují riziko jejich šíření, zejména pokud se nacházejí na plazmidech, které se snadno přenášejí na další bakterie. Léčba karbapenemázovými kmeny je velmi omezená, protože tyto enzymy dokážou rozkládat nejen karbapenemy, ale i další typy antibiotik (Beneš, 2018).

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

OXA β-laktamázy byly pojmenovány podle jejich schopnosti hydrolyzovat oxacilin. Mezi ně patří také oxacilinázy s rozšířeným spektrem pro cefalosporiny, které obvykle vycházejí z ESBL OXA-10 nebo OXA-15. OXA karbapenemázy ze třídy D zahrnují OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-51 a OXA-58. Původně byly OXA β-laktamázy nalezeny u P. aeruginosa, ale dnes jsou hlášeny také u dalších gramnegativních bakterií včetně čeledi Enterobacteriaceae. Skupina OXA β-laktamáz je velmi různorodá, přičemž geny těchto enzymů se nacházejí jak na chromozomech, tak i na plazmidech. Tyto geny jsou velmi staré a jejich přenos z chromozomů na plazmidy se odehrál před miliony let (Pfeifer et al., 2010).

Metallo-β-laktamázy (MBL) dokáží hydrolyzovat všechny β-laktamové antibiotika s výjimkou monobaktamů. Na základě sekvence DNA se dělí do tří tříd: B1, B2 a B3. Tyto enzymy nejsou produkované pouze gramnegativními patogenními bakteriemi, ale vyskytují se také u bakterií, které žijí volně v přírodě. Nejčastějšími MBL z třídy B1 jsou enzymy IMP a VIM, které původně pocházely z P. aeruginosa a A. baumannii. Nicméně se nyní běžně šíří mezi zástupci čeledi Enterobacteriaceae. Většina bakterií produkujících MBL je také rezistentní vůči dalším třídám antibiotik, jako jsou fluorochinolony a aminoglykosidy. Několik studií prokázalo, že bakterie Enterobacteriaceae produkující MBL byly nejvíce rozšířené v oblasti Indie a Pákistánu, ale s časem se rozšířily po celém světě prostřednictvím cestování nebo lékařských zákroků (Pfeifer et al., 2010; J. Pitout, 2012).

V budoucnosti představuje novou hrozbu rozšíření rezistence E. coli vůči karbapenemům prostřednictvím metalo-β-laktamáz (například enzymy VIM, NDM) nebo serin-karbapenemáz (například enzymy KPC), které poskytují odolnost většině nebo všem dostupným β-laktamovým antibiotikům (Ebimieowei & Ibemologi, 2016).

### Fluorochinolony

Fluorochinolony jsou synteticky vytvořená antibiotika. Mají strukturu sestávající z dvojice aromatických kruhů a obvykle jsou odvozeny od 4-chinolon-3-karboxylové kyseliny. Jejich mechanismus účinku spočívá v inhibici DNA gyrázy a topoizomerázy IV, což jsou enzymy zodpovědné za regulaci konformace chromozomu během procesu replikace a transkripce. Fluorochinolony se vážou na tyto enzymy, což vede k jejich inaktivaci a fragmentaci DNA, což nakonec vede ke smrti buňky. Geny odpovědné za rezistenci vůči fluorochinolonům mohou být umístěny buď na chromozomu nebo na plazmidu (Ebimieowei & Ibemologi, 2016; Redgrave et al., 2014).

#### Rezistence kódovaná chromozomálními geny

Nejběžnějším mechanismem rezistence je změna cílového místa (aktivního centra) topoizomerázy způsobená mutací v primární struktuře enzymu. Mutace se obvykle vyskytují v oblasti genu, který kóduje podjednotky topoizomeráz. Tato oblast je známá jako QRDR (quinolone resistance-determining region). Mutace se nejčastěji vyskytují v genech gyrA a parC, které kódují místa, na která se vážou chinolony. U E. coli je důležitou oblastí QRDR genu gyrA místo mezi aminokyselinovými zbytky 67–106, u parC je to 63–102. Významný nárůst rezistence k fluorochinolonům nastává při substituci aminokyselinových zbytků na pozicích Ser83 a Asp87. Čím více mutací v těchto genech proběhne, tím vyšší je rezistence k fluorochinolonům (Hooper & Jacoby, 2016).

Další, spíše podpůrný mechanismus rezistence, spočívá ve snížení množství fluorochinolonů v buňce. Tento mechanismus může být způsoben snížením počtu porinů (proteinové kanály) nebo změnou jejich konformace a snížením permeability buněčné stěny. Množství fluorochinolonů v buňce může být také ovlivněno nadprodukcí efluxních pump. Efluxní pumpy se nacházejí na cytoplazmatické membráně nebo v buněčné stěně a fungují na principu aktivního transportu, který vyžaduje energii (Beneš, 2018).

#### Rezistence kódovaná plazmidovými geny

Plazmidem zprostředkovaná rezistence vůči chinolonům (PMQR - plasmid-mediated quinolone resistance) byla poprvé popsána v roce 1998. Geny qnr, které kódují proteiny Qnr, se nacházejí na multirezistentních konjugativních plazmidech. Tyto proteiny jsou schopné vázat se na topoizomerázy II a IV v blízkosti jejich aktivního centra a bránit tak vázání chinolonů. Qnr proteiny mohou také sloužit jako falešné cíle pro fluorochinolony, které se vážou na ně a již nemohou inhibovat topoizomerázy (Hooper & Jacoby, 2016; Redgrave et al., 2014).

Dalším mechanismem PMQR je použití efluxních pump QepA a OqxAB. QepA byla první objevenou efluxní pumpou, která zvyšuje rezistenci vůči fluorochinolonům u E. coli a patří do skupiny MFS (Major Facilitator Superfamily). Transport je zde zprostředkován protonovým gradientem. OqxAB patří do skupiny RND (Resistance-Nodulation-Division) a transportuje olachindox, který se běžně používá jako růstový promotér v zemědělství u prasat. Později bylo zjištěno, že tento transportér také způsobuje rezistenci vůči ciprofloxacinu, norfloxacinu, chloramfenikolu, trimethoprimu a nitrofurantoinu (Hooper & Jacoby, 2016).

Posledním mechanismem rezistence je enzymatická modifikace fluorochinolonů, kterou katalyzují tzv. bifunkční enzymy. Tyto enzymy mají dvě aktivní místa na jednom proteinu. Příkladem je enzym ACC(6´)-Ib-cr, což je bifunkční varianta acetyltransferázy, která zprostředkovává rezistenci vůči aminoglykosidům (jako například amikacin, kanamycin a tobramycin) a zároveň i vůči fluorochinolonům obsahujícím aminový dusík na piperazinovém kruhu (například ciprofloxacin a norfloxacin) (Hooper & Jacoby, 2016; Redgrave et al., 2014).

## Mobilní genetické elementy

Genetický materiál bakterií může být uložen jako součást hlavního chromozomu nebo jako extrachromozomální DNA. Mezi základní mobilní genetické elementy (MGE) patří plazmidy, transpozony a bakteriofágy, avšak sem se řadí také ostrovy patogenity (Leplae et al., 2004).

### Plazmidy

Plazmidy jsou genetické elementy lokalizované mimo hlavní chromozom a jsou schopné samostatné replikace. V cytoplazmě bakterií se obvykle vyskytují v několika kopiích a obsahují jeden nebo více genů (Beneš, 2018; Snustad & Simmons, 2017).

Plazmidy nenesou geny nezbytné pro přežití buňky, ale poskytují ji určité výhody za nepříznivých podmínek. Geny na plazmidech mohou například kódovat produkci toxinů, virulenčních faktorů, rezistenci vůči antibiotikům nebo těžkým kovům apod. Díky těmto vlastnostem plazmidy představují důležitou složku evoluce bakterií (Bennett, 2008).

E. coli má velký počet různých plazmidů. Mezi tři základní typy plazmidů patří F-plazmid, R-plazmid a Col-plazmid. F-plazmid je známý již od roku 1940, kdy byl poprvé objeven právě u E. coli. Obsahuje geny pro F-pily, které jsou výběžky na povrchu bakterie a hrají důležitou roli při procesu konjugace (Johnson & Nolan, 2009).

R-plazmidy (rezistenční plazmidy) nesou geny pro rezistenci vůči antimikrobiálním látkám. Podobně jako F-plazmidy mohou přenášet konjugaci a rychle šířit geny pro rezistenci v populaci bakterií. Evoluce R-plazmidů vedla k rozvoji rezistence vůči více antimikrobiálním látkám současně. Kmeny s touto schopností se nazývají multirezistentní. R-plazmidy jsou obvykle velké, schopné kontrolovat rychlost replikace a počet kopií (Snustad & Simmons, 2017).

V čeledi Enterobacteriaceae je často přítomen plazmid IncN, který nese gen pro širokospektrou β-laktamázu nazvanou CTX-M-1. Tento enzym může být také kódován plazmidem IncI1, který zároveň nese geny pro virulenční faktory, jako jsou adhezní pili. Plazmid IncK je spojován s CTX-M-14. Další geny pro širokospektrou β-laktamázu se nacházejí na plazmidu IncF, který je jedním z nejrozšířenějších plazmidů v celé čeledi Enterobacteriaceae (Carattoli, 2013).

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

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

### 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). Re-trotranspozony se vyskytují spíše u eukaryot, DNA transpozony u eu-karyot i prokaryot (Babakhani & Oloomi, 2018).

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

Bakteriální transpozony jsou rozděleny do 4 skupin: inzerční sek-vence (IS), kompozitní transpozony, nekompozitní transpozony (sku-piny 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 neseny 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 mechanizmem 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).

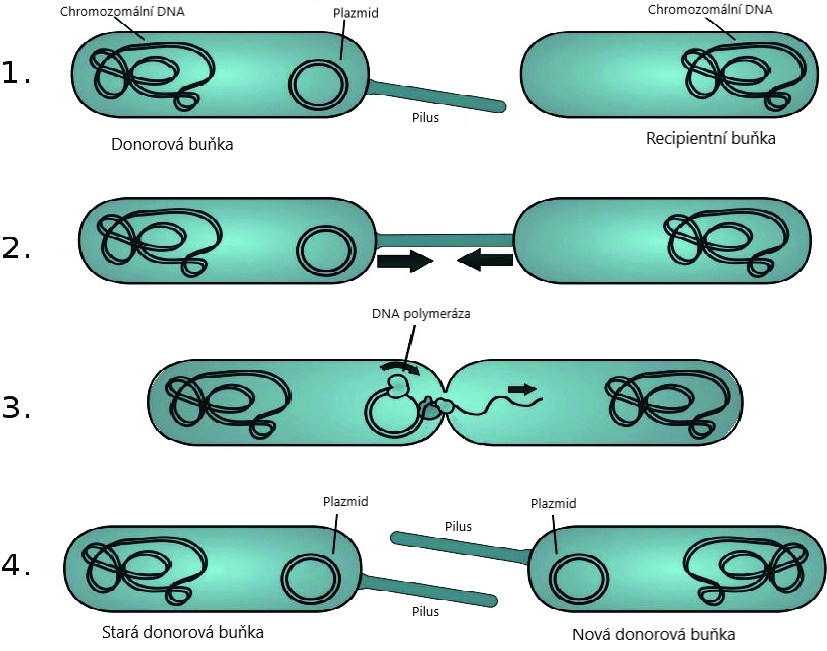
## Přenos genů u bakterií

U bakterií se vyskytují tři procesy horizontálního přenosu DNA z jedné buňky do druhé: konjugace, transdukce a transformace. U E. coli není přirozeně pozorován proces transformace, protože nemá geny kódující proteiny potřebné pro příjem volné DNA. Nicméně v laboratorních podmínkách byla transformace úspěšně provedena i u E. coli (Beneš, 2018; Snustad & Simmons, 2017).

### Konjugace

Konjugace je proces, při kterém se přenáší DNA z donorové buňky do recipientní buňky prostřednictvím konjugačního kanálu nebo můstku (Obr. 5). Plazmid je před samotným přenosem rozštěpen endonukleázou a replikován. Pro úspěšný přenos genů musí být bakterie schopna vytvořit F-pilusy, což jsou výběžky na povrchu bakterie umožňující kontakt s recipientní buňkou. F-pilusy obsahují geny na kružnicové molekule DNA známé jako F-faktor (Beneš, 2018; Snustad & Simmons, 2017).

Konjugace je nejvýznamnějším procesem horizontálního přenosu genů u Enterobacteriaceae. Tímto procesem jsou přenášeny i velké plazmidy obsahující geny pro rezistenci vůči antibiotikům. Tyto plazmidy mohou být konjugativní, což znamená, že kódují proteiny nezbytné pro tvorbu konjugačního kanálu. Konjugace může probíhat mezi bakteriemi různých druhů, což ještě více usnadňuje šíření R-plazmidů (Partridge et al., 2018).



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

### Transdukce

Dalším způsobem přenosu DNA, který je přítomen i u E. coli, je transdukce. Transdukce byla objevena již v roce 1952 a přenos se uskutečňuje pomocí bakteriofágů. Rozlišujeme obecnou (nespecifickou) transdukci a specifickou transdukci. Při nespecifické transdukci mohou bakteriofágy přenášet jakýkoliv gen z donorové buňky do recipientní buňky. Typickým příkladem u E. coli je fág P1. Tento proces je však relativně neefektivní, protože jen malé procento přenesené DNA je rekombinováno s bakteriálním chromozomem (Beneš, 2018; Snustad & Simmons, 2017).

U specifické transdukce jsou přenášeny pouze určité geny. Nejznámějším příkladem této skupiny je bakteriofág λ, který u E. coli přenáší dvě sady genů. První sada genů je gal, které umožňují E. coli využívat galaktózu jako zdroj energie, a druhá sada genů je bio, které zajišťují syntézu biotinu (Snustad & Simmons, 2017).

### Transformace

Transformace byla poprvé objevena v roce 1928 u Streptococcus pneumoniae. Při tomto procesu přijímá bakteriální buňka volné molekuly DNA z donorové buňky. K provedení tohoto procesu potřebuje geny kódující proteiny nutné pro transformaci. E. coli tyto geny za přirozených podmínek nemá (Beneš, 2018; Snustad & Simmons, 2017).

# Epidemické linie *E. coli*

Epidemické linie ExPEC jsou označeny jako sekvenční typy, které se rychle rozšířily a způsobují extraintestinální onemocnění. Tyto sekvenční typy mají společné genotypové charakteristiky. V období 1995–2018 byl nejčastěji se vyskytujícím sekvenčním typem ExPEC ve všech geografických oblastech ST131. Frekvence dalších sekvenčních typů se může lišit v závislosti na místě výskytu. Určité sekvenční typy se mohou měnit časem, zatímco jiné zůstávají stabilní. Evropské a severoamerické studie ukazují podobné rozložení ST, zatímco v africkém a asijském regionu je rozložení odlišné (Manges et al., 2019).

Pouze několik sekvenčních typů nebo komplexů ST zahrnuje izoláty jednoho patotypu, například IPEC, Shigella spp. nebo nepatogenní E. coli. Sekvenční typy extraintestinální patogenní E. coli mohou obsahovat také nepatogenní kmeny nebo jiné patotypy (Köhler & Dobrindt, 2011).

Pro nějaký sekvenční typ se stane epidemicky významným, musí být distribuován globálně, mít více mechanismů pro antimikrobiální rezistenci, kolonizovat a přetrvávat v organismu déle než 6 měsíců, být schopen přenosu mezi hostiteli, zvyšovat svou patogenitu a vyvolávat závažné nebo opakující se infekce (J. D. D. Pitout & Finn, 2020).

## *E. coli* ST131

ST131 je multirezistentní klon E. coli, který se od roku 2000 šíří globálně a způsobuje komunitní i nemocniční infekce močových cest (nejčastější původce těchto infekcí) a infekce krevního řečiště. Taktéž se vyskytuje v trávicím traktu savců, kde není škodlivý. Byl izolován nejen z lidských a zvířecích organismů, ale také z půdy a odpadních vod (Petty et al., 2014; J. D. D. Pitout & Finn, 2020).

Rozšíření a patogenita ST131 mohou být ovlivněny plazmidy, genomovými ostrovy a mutacemi. Přesný mechanismus, jak tento sekvenční typ dosáhl takového úspěchu ve srovnání s jinými, často patogennějšími a rezistentnějšími epidemickými liniemi, stále není znám (J. D. D. Pitout & Finn, 2020).

V současnosti je ST131 zodpovědný za významnou část infekcí ExPEC spojených s rezistencí vůči antimikrobiálním látkám, zejména β-laktamům a fluorochinolonům (Riley, 2014).

### Fylogeneze

ST131 patří do fylogenetické skupiny B2. Nejčastěji se ST131 vyskytuje jako sérotyp O25b:H4, ale byly zaznamenány i sérotypy O16:H5, NT:H4 a O157 (Riley, 2014).

Na základě analýzy jednonukleotidového polymorfismu je ST131 rozdělen do tří skupin (nazývaných "clades") A, B a C, které jsou definovány především alelou fimH. Operon fim kóduje fimbrie, které patří mezi virulenční faktory E. coli a slouží k přichycení k tkáni hostitele. Gen fimH rozpoznává a usnadňuje připojení k manózovým receptorům hostitelské tkáně. Tento gen je velmi variabilní kvůli vysoké rekombinaci a různé alely jsou silně korelovány s populacemi subtypů ST131 (Petty et al., 2014; J. D. D. Pitout & Finn, 2020).

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

V rámci skupiny C jsou nejrozšířenějšími podskupinami H30-R (také označovanou jako C1) a H30-Rx (také označovanou jako C2). Oba mají gen fimH30 kódující fimbriální adhezin 1. Bylo zjištěno, že ST131 obsahující gen fimH tvoří až 70 % E. coli izolátů rezistentních vůči fluorochinolonům. Linie s fimH se začaly šířit na začátku 21. století a mezi lety 2005–2010 se rychle rozšiřovaly. Většina kmenů fimH30 má velmi podobnou genomovou strukturu, což naznačuje jejich původ z jednoho společného předka. Podskupiny H30-R a H30-Rx jsou významné zejména pro svou vysokou rezistenci vůči antibiotikům. Oba podtypy jsou rezistentní vůči fluorochinolonům, ale H30-R neobsahuje geny blaCTX-M-15, na rozdíl od H30-Rx. Mezi kmeny s genem fimH30 najdeme nejcitlivější linie H30 (citlivé na fluorochinolony a negativní pro CTX-M), přes více rezistentní linie H30-R (rezistentní na fluorochinolony a negativní pro CTX-M) až po nejvíce rezistentní linie H30-Rx (rezistentní na fluorochinolony a pozitivní pro CTX-M). Šíření ST131 s genem fimH mezi ExPEC je zodpovědné za zvýšenou prevalenci rezistence na fluorochinolony a výskyt CTX-M pozitivních linií (Mathers et al., 2015; J. D. D. Pitout & Finn, 2020).

### Virulence

ST131 exprimuje několik virulenčních genů, které jsou typické pro ExPEC: iha (adhezin-siderofor) a fimH (adheziny) sloužící k přichycení, sat (toxin), fyuA/irp2 a iutA/iucD (systémy pro siderofory), kpsM II (kapsula typu 2), usp (uropatogenický specifický protein), traT (související s sérovou rezistencí), ompT (proteáza vnější membrány) a malX (marker ostrova patogenity) (Riley, 2014).

Některé virulenční faktory mají také funkci adaptace k prostředí tlustého střeva u bakteriálních kmenů, jako je například fimH, který slouží k lepší přichycení k hostitelské tkáni. Schopnost virulence ST131 je spíše zaměřena na perzistenci v hostiteli než na vyvolání onemocnění (J. D. D. Pitout & Finn, 2020).

### Rezistence k antimikrobiálním látkám

V roce 2008 byl ST131 označen za hlavní klon spojený se šířením rezistence CTX-M-15 ESBL, který je kódován plazmidovým genem blaCTX-M-15. Kromě CTX-M-15 se u ST131 také v menší míře vyskytují CTX-M-3, CTX-M-14 a CTX-M-27. ST131 je také rezistentní vůči fluorochinolonům díky mutacím v genech gyrA a parC na chromozomu. Byly zaznamenány i případy rezistence ST131 vůči aminoglykosidům, trimethoprim-sulfamethoxazolu a karbapenemům (s přítomností metalo-β-laktamáz a karbapenemáz OXA a KPC), což významně omezuje léčbu infekcí způsobených ST131. Izoláty s produkci karbapenemáz zatím nejsou tak rozšířené jako ty s blaCTX-M-15 (Petty et al., 2014; J. D. D. Pitout & Finn, 2020; Riley, 2014).

Plazmidy hrají důležitou roli v evoluci ST131. Plazmidy spojené s ST131 patří převážně do skupiny IncF, mají obvykle délku větší než 100 kb, nízký počet kopií a nesou geny virulence nebo rezistence vůči antimikrobiálním látkám. Skupina IncF je úspěšná díky stabilní interakci s hostitelem a často se vyskytuje u čeledi Enterobacteriaceae. Na plazmidech IncF se nacházejí inzerční sekvence, například IS26, které přenášejí geny rezistence na antibiotika, jako je blaCTX-M-15, catB4, blaOXA-1 a aac(6´)lb-cr, které zvyšují rezistenci vůči cefalosporinům, chloramfenikolu, oxacilinu a aminoglykosidům. Další plazmidy spojené s ST131 jsou IncA/C, L/M a N. Geny pro rezistenci vůči ESBL se často nacházejí také na transpozonech, například Tn1999 (J. D. D. Pitout & Finn, 2020).

## *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).

### 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 karbapenemázy (Hammad et al., 2019).

### 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* (adhezin 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).

### 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 sérům 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-laktamázouTEM-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).

## *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).

### 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).

### 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).

### 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).

## Další ST *E. coli*

### *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 sekvenčních 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 virulenční 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).

### *E. coli* ST73

ST73 patří do fylogenetické skupiny B2 a do sérotypu O6:H1. Jeho virulenční 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 virulenčních faktorů u izolátů z lidí, koček i psů naznačuje, že u něj dochází k mezidruhovému přenosu (Riley, 2014; Valat et al., 2020).

# 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.

Mechanizmů 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-Garrote, 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., Kudirkiene, 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., & Tenaillon, 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 Resistance 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 Cytoskeletons—Mini Review and Update. *Swift Journal of Medicine and Medical Sciences*, *Vol. 1 (2)*, 06–011. 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). Enteroaggregative *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 Neurourology 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., Bugla-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., & Stavrinides, 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., Chiapello, 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., Bouguénec 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