

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Význam *Escherichia coli* a dalších enterobakterií  
v mikrobiotě kojenců**

**Diplomová práce**

**Bc. Kristýna Knobová**

**Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce:**

**doc. Ing. Věra Neužil Bunešová, Ph.D.**

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Význam *Escherichia coli* a dalších enterobakterií v mikrobiotě kojenců" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21.4.2024

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. Ing. Věře Neužil Bunešové, Ph.D. za vstřícnost, odbornost, trpělivost, cenné rady a ochotu pomoci. Mé poděkování také patří Eugeniu Ingribelli, MSc. a Ahmadu Aminu, MSc. za pomoc a trpělivost při práci v laboratoři. Dále bych také chtěla poděkovat všem členům Katedry mikrobiologie výživy a dietetiky, kteří mi během laboratorní praxe pomáhali. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a přátelům, kteří mi byli oporou po celou dobu studia.

# Význam *Escherichia coli* a dalších enterobakterií v mikrobiotě kojenců

## Souhrn

*Enterobacteriaceae* je čeleď gramnegativních bakterií, které se běžně vyskytují v lidském střevě. I přesto, že mohou způsobovat různá onemocnění v případě porušení rovnováhy tzv. dysbiózy mikrobiomu, hrají u kojenců důležitou roli v jejich zdraví a vývoji. V tomto období je kolonizace bakterií pro vývoj střevní mikrobioty zásadní. Jako komenzální bakterie se podílejí na stimulaci imunitního systému, produkci vitamínů, podpoře trávení a potencionální obraně proti patogenům. Patogenní kmeny enterobakterií mohou způsobit závažná onemocnění, jejichž včasná diagnostika je zásadní pro snížení morbidit a mortality. Znalost charakteristik patogenních enterobakterií a faktorů způsobujících infekci je nezbytná pro prevenci a jejich léčbu.

V této práci byl zpracován literární přehled týkající se významu *Escherichia coli* a dalších taxonů náležících k enterobakteriím v mikrobiotě kojenců a byla provedena analýza kolekce vybraných izolátů enterobakterií. K testování bylo použito 63 izolátů (52 enterobakterií a 11 enterokoků po finální identifikaci), které byly izolovány ze stolice zdravých kojenců a byla u nich známa předběžná identita, morfologie, kultivační charakteristiky a zbarvení na TBX agaru, ze kterého byly původně izolovány. Úspěšné ověření identifikace bylo zaznamenáno u většiny testovaných izolátů, za použití metody MALDI-TOF MS. Výsledky druhové identity nebyly ve všech případech spolehlivé a bylo by tedy vhodné k přesnější identifikaci zařadit i jiné metody. U testovaných izolátů, které zahrnovaly 11 druhů enterobakterií a 3 druhy enterokoků, byla potvrzena fenotypová i genotypová variabilita, kdy k fenotypové charakterizaci izolátů byly zařazeny metody zahrnující: testování hemolytické aktivity,  $\beta$ -glukoronidázové aktivity, produkce indolu a peroxidázy. Pozitivní reakce hemolytické aktivity byla zaznamenána pouze u dvou kmenů *Enterococcus faecalis*. Žluč-aeskulinový agar se potvrdil jako vhodné médium k nárůstu všech testovaných izolátů a stejně tak katalázový test měl velké množství pozitivních výsledků. Za nejspolehlivější test  $\beta$ -glukoronidázové aktivity byl zařazen chromogenní TBX agar a COLI test. Genotypová variabilita byla prokázána fingerprintovou metodou REP-PCR, navíc je díky metodě možné z testování vyřadit do budoucna identické kopie pocházející ze stejných dárců. U 32 kmenů byla testována antimikrobiální aktivita (difúzní metodou) mezi kmeny navzájem i se zařazením probiotických bifidobakterií a laktobacilů, nepodařilo se zaznamenat interakci naznačující antimikrobiální aktivitu. Ta byla zaznamenána pouze při použití kyseliny 3-hydroxypropionové (3-HP), která byla zařazena do testu pro zajímavost. Pro budoucí výzkum je žádoucí rozšířit testovanou kolekci o více kmenů k testovaným druhům a zařadit další metody testování.

**Klíčová slova:** *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae*, kojeneček, mikrobiota, interakce, bifidobakterie, laktobacily

# The importance of *Escherichia coli* and other enterobacteria in the microbiota of infants

## Summary

*Enterobacteriaceae* is a family of gram-negative bacteria commonly found in the human gut. Despite the fact that they can cause various diseases in case of an imbalance of the so-called microbiome dysbiosis, they play an important role in the health and development of infants. During this period, bacterial colonisation is essential for the development of the gut microbiota. As commensal bacteria, they are involved in stimulating the immune system, producing vitamins, supporting digestion, and potentially defending against pathogens. Pathogenic strains of *Enterobacteriaceae* can cause serious diseases, early diagnosis of which is essential to reduce morbidity and mortality. Knowledge of the characteristics of pathogenic *Enterobacteriaceae* and the factors causing infection is essential for prevention and treatment.

This thesis provides a literature review of the importance of *Escherichia coli* and other taxa belonging to *Enterobacteriaceae* in the infant microbiota and analyzes a collection of selected *Enterobacteriaceae* isolates. Sixty-three isolates (52 *Enterobacteriaceae* and 11 Enterococci after final identification) isolated from stool of healthy infants were used for testing and their preliminary identity, culture morphology and staining on TBX agar from which they were originally isolated were known. Successful verification of identification was recorded for most of the isolates tested, using MALDI-TOFMS method. Species identity results were not reliable in all cases, and therefore other methods should be included for more accurate identification. Phenotypic and genotypic variability was confirmed in the isolates tested, which included 11 *Enterobacteriaceae* species and 3 Enterococci species, where phenotypic characterisation of the isolates included methods including: testing for haemolytic activity,  $\beta$ -glucuronidase activity, indole production and peroxidase. Only two strains of *Enterococcus faecalis* showed positive haemolytic activity. Bile-aesculin agar proved to be a suitable medium for the growth of all the isolates tested, and the catalase test likewise recorded a large number of positive results. Chromogenic TBX agar and COLI test were ranked as the most reliable assay for  $\beta$ -glucuronidase activity. Genotypic variability was demonstrated by the REP-PCR fingerprinting method; moreover, the method makes it possible to exclude identical copies from the same donors in the future. Antimicrobial activity was tested for 32 strains (by diffusion method) between strains with each other and with the inclusion of probiotic bifidobacteria and lactobacilli; no interaction indicating antimicrobial activity was observed. This was only observed with 3-hydroxypropionic acid (3-HP), which was included in the test for interest. For future research, it is desirable to expand the tested collection by adding more strains to the tested species and to include additional methods.

**Keywords:** *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae*, an infant, microbiota, interaction, bifidobacteria, lactobacilli

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce.....</b>	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>10</b>
3.1.1 Definice a význam mikrobioty .....	10
3.1.2 Vývoj a složení střevní mikrobioty kojence .....	11
<b>3.2 Čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>.....</b>	<b>14</b>
3.2.1 Taxonomie enterobakterií .....	15
3.2.2 Význam enterobakterií u kojenců.....	16
<b>3.3 Rod <i>Escherichia</i> a <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>17</b>
3.3.1 <i>Escherichia</i> spp.....	17
3.3.2 <i>Escherichia hermanii</i> .....	17
3.3.3 Pozitivní vliv <i>E. coli</i> u kojenců .....	18
3.3.4 Onemocnění způsobené <i>E. coli</i> u kojenců.....	18
3.3.5 Meningitida.....	20
3.3.6 Infekce močových cest.....	21
3.3.7 Enteropatogenní skupiny druhu <i>E. coli</i> .....	23
3.3.8 Probiotický kmen <i>E. coli</i> .....	23
<b>3.4 Rod <i>Enterobacter</i>.....</b>	<b>25</b>
3.4.1 <i>Enterobacter</i> spp.....	25
3.4.2 Vliv rodu <i>Enterobacter</i> u kojenců .....	26
<b>3.5 Další druhy enterobakterií ve střevní mikrobiotě.....</b>	<b>27</b>
3.5.1 <i>Klebsiella</i> spp. ....	27
3.5.2 <i>Citrobacter</i> spp.....	28
3.5.3 Ostatní druhy enterobakterií .....	29
<b>3.6 Další druhy související s prací .....</b>	<b>30</b>
3.6.1 <i>Enterococcus</i> spp. ....	30
<b>3.7 Interakce enterobakterií s kmeny střevní mikrobioty kojence s probiotickým potenciálem.....</b>	<b>30</b>
3.7.1 Bifidobakterie .....	31
3.7.2 Laktobacily.....	32
<b>4 Metodika.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Materiál a metody.....</b>	<b>34</b>
4.1.1 Příprava bakteriálních kultur .....	36
4.1.2 Kontrola čistoty popis morfologie .....	37
4.1.3 Ověření identity testovaných kultur pomocí MALDI-TOF MS.....	37
4.1.3.1 Detekce enzymu $\beta$ -glukoronidázy na chromogenním TBX agaru.....	38

4.1.4	Hemolytická aktivita.....	38
4.1.5	Katalázový test .....	39
4.1.6	COLI TEST.....	39
4.1.7	Žluč-aeskulinový agar – nárůst kolonií a hydrolýza .....	40
4.1.8	REP-PCR.....	40
4.1.8.1	Biochemické testování enzymatické aktivity pomocí API ZYM testu.....	41
4.1.9	Antimikrobiální aktivita – agarová difúzní metoda.....	42
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>MALDI-TOF MS.....</b>	<b>44</b>
5.1.1	Fenotypové charakteristiky testovaných kmenů .....	46
<b>5.2</b>	<b>Antimikrobiální aktivita .....</b>	<b>50</b>
<b>5.3</b>	<b>REP-PCR.....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>57</b>
<b>9</b>	<b>Samostatné přílohy .....</b>	<b>I</b>
<b>9.1</b>	<b>API ZYM.....</b>	<b>I,II</b>

# 1 Úvod

Střevní mikrobiom je zásadním prostředím pro zdravý vývoj jedince. Od narození každého člověka dochází ke kolonizaci bakterií, jejichž zastoupení ve střevním mikrobiomu je závislé na různých faktorech, od způsobu porodu a typu stravy, až po užívání antibiotik. Mikrobiom je u kojence významný nejen z hlediska zajištění výživy v roli trávení a vstřebávání živin, ale také z hlediska regulace imunitního systému a obranyschopnosti organismu. Složení mikrobiomu každého jedince je zcela individuální a v závislosti na zastoupení zdraví prospěšných bakterií má schopnost potlačit rozvoj patogenních mikroorganismů. Tzv. dysbióza neboli narušení rovnováhy střevního mikrobiomu, může vést k řadě zdravotních problémů nejen u kojenců.

*Escherichia coli* je zastoupena ve střevním mikrobiomu od počáteční bakteriální kolonizace. Daný taxon zahrnuje běžné komenzály, ale i kmeny patogenní. Mimoto byly v rámci taxonu *E. coli* izolovány probiotické kmeny. Například *E. coli* Nissle 1917, který je známým probiotikem a má schopnost odolávat patogenním enterobakteriím, včetně patogenní *E. coli*.

Patogenní enterobakterie představují pro kojence riziko závažných onemocnění jako je meningitida, infekce močových cest, sepse, průjemy apod. Zdravý vývoj mikrobiomu kojence lze podpořit především kojením. Mateřské mléko je pro kojence ideální stravou, jelikož obsahuje prebiotika, jejichž schopnost je stimulace růstu prospěšných bakterií v mikrobiomu. V případě, že kojení není z nějakého důvodu možné, je do výživy kojence vhodné zařadit probiotickou suplementaci.

Enterobakterie jsou důležitou součástí střevní mikrobioty kojenců a zastoupením jednotlivých kmenů je ovlivněno následné zdraví jedince. Patogenní kmeny mohou způsobit infekce, které je nutné včas diagnostikovat a léčit. Znalost vlastností enterobakterií a faktorů rizika infekce je důležitá pro ochranu a zdraví kojenců.



## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Bakterie *Escherichia coli* je jednou z nejvíce prozkoumaných bakterií. Jedná se o běžného komezála trávicího traktu živočichů a s tím je spojena i její funkce jakožto indikátora fekálního znečištění. *E. coli* je známa pro její pozitivní vliv a použití jako probiotika (*E. coli* Nissle 1917), ale na druhou stranu daný taxon zahrnuje celou řadu patogenních kmenů. Podobně tomu je i u dalších zástupců enterobakterií vyskytujících se ve střevní mikrobiotě kojenců.

Hypotéza: Očekáváme značnou genotypovou a fenotypovou variabilitu napříč testovanými zástupci enterobakterií. Také předpokládáme, že výskyt *E. coli* a dalších enterobakterií v mikrobiotě kojence může být ovlivněn přítomností dalších komezálů jako jsou bifidobakterie a laktobacily, kdy se bude jednat o interakce na rodové a druhové úrovni.

Cílem této práce bylo zpracovat literární přehled týkající se významu *E. coli* a dalších taxonů náležících k enterobakteriím v mikrobiotě kojenců.

V praktické části provést analýzu kolekce izolátů enterobakterií ze stolice kojenců. Šlo především o fenotypovou charakterizaci izolátů a testování jejich vzájemné interakce a interakce s ostatními prospěšnými komezály. Součástí charakterizace byly metody zahrnující MALDI-TOF MS, fingerprintové metody jako REP-PCR, testování hemolytické aktivity,  $\beta$ -glukoronidázové aktivity, produkce indolu,  $\beta$ -glukosidázové aktivity a peroxidázy.

## 3 Literární rešerše

### 3.1.1 Definice a význam mikrobioty

První mikroskopická pozorování byla provedena Antoniem van Leeuwenhoekem v 17. století, který zkoumal své fekální a orální bakterie. Mezi těmito druhy byly pozorovány významné rozdíly (Mitsuoka, 2014). Dříve používaný pojem „mikroflóra“ dnes již neoznačuje mikrobiální společenstva spojená s člověkem, ale využívá se pouze pro označení mikroskopických rostlin. Slovo „flora“ je latinského původu a v překladu znamená květ/květina. Ve starší vědecké literatuře může být „mikroflóra“ často zaměněna za termín „mikrobiom/mikrobiota“, jelikož se název v průběhu let vyvíjel a nebyl přesně definován (Marchesi & Ravel, 2015). První definice termínu „mikrobiom“ byla stanovena Whippsem a jeho kolegy v roce 1988. Mikrobiální společenstvo bylo definováno jako soubor mikroorganismů žijící dohromady v jedné komunitě v určitém prostředí. Lidský mikrobiom představuje všechny mikroorganismy žijící ve spojení s lidským tělem. Je také popsán jako genom všech mikroorganismů, které žijí ve všech obratlovcích i na nich. Střevní mikrobiom je složen z genomu mikrobů žijících ve střevě, včetně bakterií, archeí, virů a hub. Mikrobiota představuje živé jednotky tvořící mikrobiom. Pojmy „mikro“, „biom“ a „biota“ jsou původem ze starořečtiny a v překladu znamenají: mikro = malý, biom = život, biota = živé organismy ekosystému nebo určité oblasti (Berg et al., 2020). Dále pojem „mikrobiom“ byl popsán Joshuaou Lederbergem v roce 2001 a představoval komunitu komenzálních, symbiotických a patogenních mikroorganismů, které jsou uloženy v tělesném prostoru nebo prostředí. Tato mikrobiální komunita je složena ze 100 bilionů mikrobiálních buněk. Dle Lederberga byl mikrobiom popsán jako souhrn všech mikrobiálních i lidských buněk uložených ve střevě (Hanson & Weinstock, 2016). Termín „mikrobiom“ bývá zaměňován za pojem „metagenom“, který je ale definován jako soubor genomů a genů od živých mikroorganismů (mikrobioty) (Berg et al., 2020).

V trávicím traktu je okolo  $10^{14}$ /ml mikroorganismů tvořící střevní mikrobiotu a jejich hlavní funkce jsou: metabolické, ochranné, strukturální a neurologické. Gastrointestinální trakt je schopen trávit až okolo 85 % sacharidů, 66-95 % bílkovin a tuků. V tlustém střevě se zpracovává 10-30 % energie a zbytek je vylučován stolicí. Střevní mikroby zajišťují enzymy pro další využití sacharidů a také jsou schopny fermentovat vlákninu, což způsobuje uvolňování plynů, mastných kyselin s krátkým řetězcem, organických kyselin a alkoholů. Hlavní producenti mastných kyselin s krátkým řetězcem jsou druhy: *Roseburia*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium* a *Clostridium*. Ochranná funkce trávicího traktu je důležitá z hlediska imunitního systému, strukturální, kdy zajišťuje rovnováhu, nepropustnost střev a pevnost střevního epitelu. Pomocí enterického nervového systému je střevo spojeno s mozkem a zajišťuje tak neurologickou funkci, kdy miliony neuronů ze střev společně s centrální nervovou soustavou (CNS) aktivují důležité neurotransmitery (Adak & Khan, 2018).

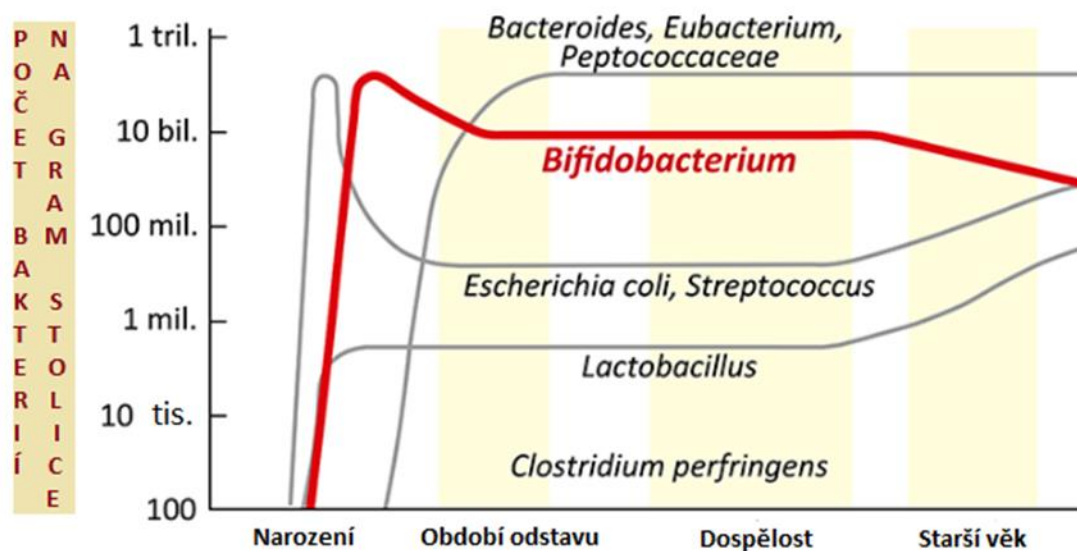
### 3.1.2 Vývoj a složení střevní mikrobioty kojence

Střevní mikrobiota je velmi důležitá pro zdravý vývoj kojence a celkově ovlivňuje zdraví jedince po celý život (Yang et al., 2021). Existují studie, které uvádí, že životní styl a zeměpisná poloha souvisí se stravovacími návyky a kulturou a ovlivňuje složení mikrobiomu. Rozdíl bývá především u dětí žijících na venkově a v městské aglomeraci (De Filippo et. al., 2010). Vývoj střevního mikrobiomu začíná již při narození jedince a během prvních tří let života dochází k nejvýznamnějším změnám vývoje. V průběhu těhotenství dochází ke změnám střevní mikrobioty matky, aby bylo plodu k dispozici co nejlepší prostředí pro vývoj (Browne et al., 2022). Přenos bakteriálních druhů z matky na dítě poskytuje kojenci tzv. startovací sadu bakterií, které jsou důležité pro zdravý růst a ochranu proti chorobám. Přenos bakteriálních druhů v případě císařského řezu nebo při podání antibiotik je spojený s výskytem většího množství patogenů (*Enterococcus*, *Klebsiella*) a imunitních poruch u dětí. Podání antibiotik také zpomaluje vývoj mikrobioty v prvním roce života (Browne et al., 2022). Způsob porodu je pro následný vývoj střevní mikrobioty kojence významný. Děti kojené mateřským mlékem mají mikrobiotu složenou z laktobacilů, bakterií rodu *Staphylococcus* a *Bifidobacterium*, oproti kojencům s umělou výživou, kteří mají jako hlavní střevní bakterie rodů *Clostridium*, *Roseburia* a *Anaerostipes* (Ihekweazu & Versalovic, 2018).

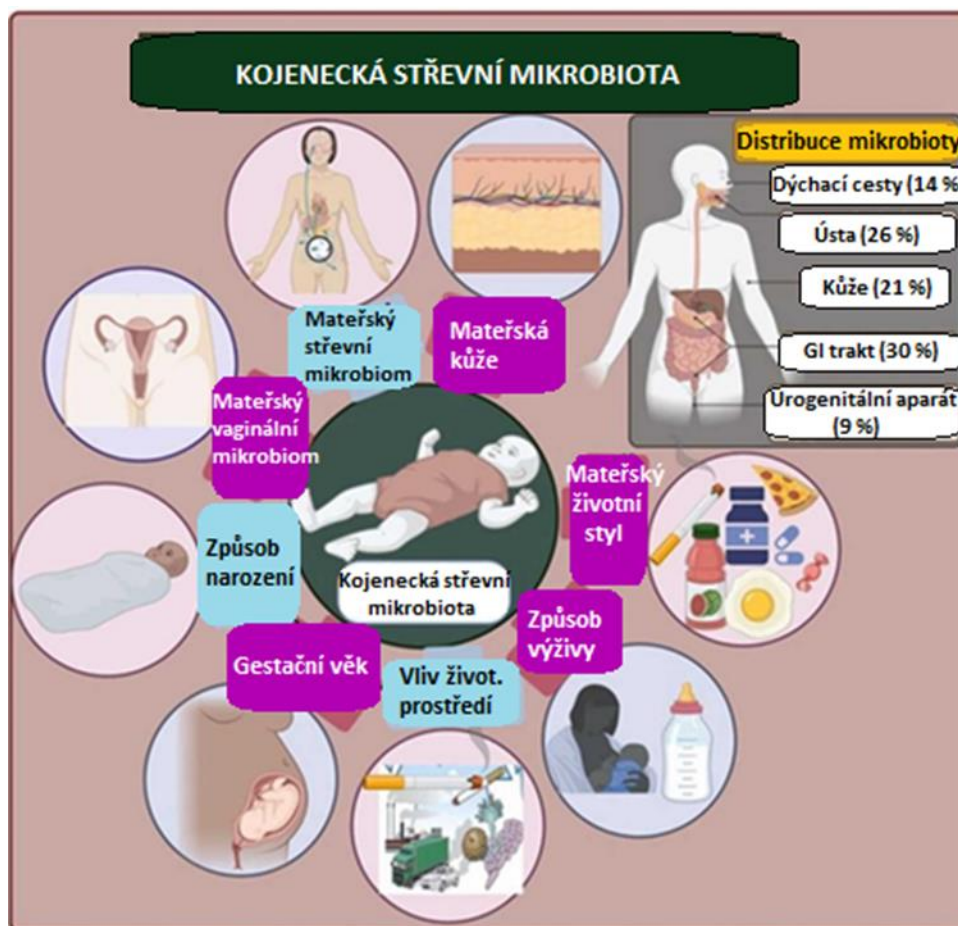
Dominantní bakteriální kmene přenášené z matky na dítě jsou Bacteroidetes a Actinobacteria. Z kmene Actinobacteria mají vybrané druhy rodu *Bifidobacterium* (*B. breve*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. bifidum*) schopnost metabolismu oligosacharidů lidského mateřského mléka. Tyto oligosacharidy jsou jinak pro člověka nestravitelné. Některé druhy kmene Bacteroidetes jako jsou: *Ba. fragilis*, *Ba. dorei*, *Ba. vulgatus* jsou také schopné metabolizovat oligosacharidy mateřského mléka. Sedm hlavních druhů z kmene Bacteroidetes je dominantní součástí střevní mikrobioty dospělého člověka (*Ba. vulgatus*, *Ba. thetaiotaomicron*, *Ba. dorei*, *Ba. uniformis*, *Ba. clarus*, *Ba. xylanisolvens*, *Ba. ovatus*). Také některé druhy kmene Firmicutes jsou důležitou součástí mikrobioty dospělého člověka, ale z jedenácti přenášených druhů z matky na dítě přetrvává pouze *Streptococcus thermophilus* a *Veillonella parvula*. Sporulace ve střevní mikrobiotě v rámci Firmicutes podporuje přenos anaerobních bakterií. Z matky na dítě je přenášena pouze jedna sporulující bakterie *Clostridium innocuum*. Ve srovnání s dospělými jedinci je množství sporotvorných složek u dítěte v raném věku velmi malé. Jedním z důvodů malého výskytu spor mohou být žlučové kyseliny, kterých je také malé množství. Úkolem žlučových kyselin je klíčení bakteriálních spor a následná kolonizace vegetativních buněk. Kolonizace bývá rozvinuta s ukončením kojení, kdy dochází k poklesu bakterií metabolizujících oligosacharidy mateřského mléka (Browne et al., 2022). Nicméně, jiné studie naznačují, že zastoupení endospory tvořících bakterií u kojence může být, co se týče množství taxonů, velmi variabilní a druhové složení se v průběhu prvních dvou let života mění. Ingridelli et al. (2023) detekovali 21 taxonů rodu Eubacteriales patřících do čeledi *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae* a *Peptostreptococcaceae*. Metodika byla optimalizována pro detekci a izolaci endospory tvořících anaerobů v kojenecké stolici, kdy bylo od jednoho kojence v měsíčních intervalech odebráno 24 vzorků stolice. Identifikace byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, sekvenování genu

16S rRNA a biochemických testů. Nejčastěji identifikovanými druhy byly *Clostridium perfringens*, *Cl. paraputrificum*, *Cl. tertium*, *Cl. symbiosum*, *Cl. butyricum* a *Cl. ramosum*. Dále byly také kultivovány méně často detekovatelné střevní taxony, jako je *Flavonifractor plautii*, *Intestinibacter bartletti*, *Eisenbergiella tayi* a *Eubacterium tenue*. Byla zde potvrzena fenotypová variabilita z hlediska enzymatické aktivity, fermentačních profilů a produkce butyrátu (Ingribelli et al., 2023).

Vývoj střevní mikrobioty v raném životě je rozdělen do tří fází. První časné stadium trvá od 6-12 měsíců a je důležité pro imunologický a fyziologický vývoj. Druhé přechodné stadium je spojené s ukončením kojení, zavedením pevné stravy, kdy dochází k poklesu bakterií *Bifidobacterium* (Obr. 1). Třetí je stadium zrání, kdy se složení mikrobioty začíná podobat dospělému člověku a nejvíce zastoupené kmeny jsou Bacteroidetes a Firmicutes. Bakterie jsou přenášeny z matky na dítě z několika míst (Obr. 2). Nejdůležitější je střevo matky, odkud pochází kmeny Bacteroidetes a Actinobacteria a většina těchto druhů přetrvává do dospělosti. Bakterie přenesené z kůže matky jsou přechodné a dlouhodobě nepřetrvávají. Z ústní dutiny je nejdůležitější *Veillonella parvula*, která zpracovává laktát produkovaný druhy z rodu *Streptococcus* nebo *Lactobacillus*, a zároveň produkuje propionát a acetát. Hlavní zásobárnou laktobacilů je vaginální prostředí, tyto druhy ale po ukončení novorozeneckého období klesají. Z mateřského mléka jsou přenášeny rody *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. bifidum* a *B. pseudocatenulatum*), *Propionibacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* a *Escherichia* (Browne et al., 2022).



**Obrázek 1:** Druh a zastoupení bakterií na gram stolice v průběhu vývoje člověka (Mitsuoka, 1973, upraveno).

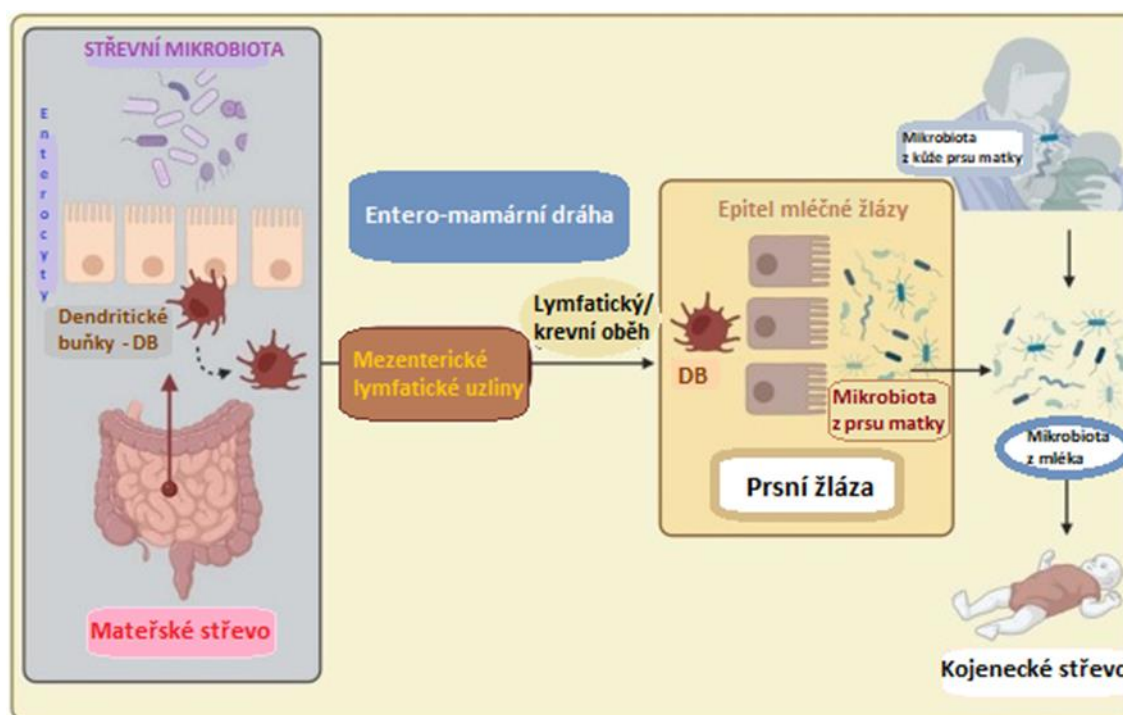


**Obrázek 2:** Způsoby přenosu bakterií z matky na dítě (Mady et al., 2023, upraveno).

Výskyt *Actinomyces naeslundii* a gramnegativních anaerobních bakterií v ústní dutině matky může způsobit dřívější porod a nižší porodní hmotnost dítěte, naopak přítomnost laktobacilů bývá spojena s porodem v termínu a vyšší porodní hmotností. Důležitou roli hraje také zdravotní stav matky například výskyt alergických onemocnění. U matky, která je alergická se v mateřském mléce objevuje méně bifidobakterií a poté také jejich nižší množství ve stolici kojenců (Thum et al., 2012). Na složení střevního mikrobiomu kojence může mít vliv i index tělesné hmotnosti matky (BMI). U kojenců matek s nadváhou se mohou vyskytovat vyšší koncentrace bakterií *Bacteroides* a *Staphylococcus*, oproti tomu u kojenců matek s hodnotou BMI v normě se může vyskytovat vyšší počet bifidobakterií. Tato tvrzení však vyžadují další zkoumání, aby mohla být potvrzena (Collado et al., 2010).

Mateřské mléko je pro kojence důležité nejen z hlediska potravy, poskytnutí potřebných živin a antimikrobiálních složek – imunoglobuliny, cytokiny, lysozym a laktoferin, ale je také přirozeným zdrojem oligosacharidů, které slouží jako prebiotikum (Thum et al., 2012). Prebiotikum je definováno jako nestravitelná složka potravy, která příznivě ovlivňuje hostitele stimulováním růstu nebo aktivity bakterií v tlustém střevě, a tím zlepšuje zdraví hostitele (Davani-Davari et al., 2019). Oligosacharidy mateřského mléka (HMO) je podporován imunitní systém kojence, zajišťována ochrana před patogenními bakteriemi a zvyšována glukózová

homeostáza. Navíc je jimi podporován vývoj mikrobiomu dítěte s převažujícím množstvím bifidobakterií, které jsou přítomné v tlustém střevě kojenců (Thum et al., 2012). HMO jsou složeny z pěti monosacharidových jednotek glukózy, galaktózy, N-acetylglukosaminu, fukózy a N-acetylneuraminové kyseliny. Vázané v glykosidických vazbách tvoří více než 100 strukturně odlišných HMO. Celkové množství a složení HMO se u jednotlivých žen liší a v důsledku toho má každé dítě odlišný soubor těchto oligosacharidů (McGuire et al., 2017). Přenos střevní mikrobioty z matky na dítě mateřským mlékem je znázorněn na **obrázku 3**. Principem přenosu jsou gramnegativní organismy (*Bacteroides*) aktivující střevní dendritické buňky (DB), jejichž schopnost je vyvolat střevní sliznici k reakci sekrečního IgA (Mady et al., 2023). Přenos bakterií je také způsoben kontaktem kůže na kůži. Tyto bakterie jsou přechodné a nepřetrvávají. Při sání mléka během kojení dochází k přenosu bakterie *V. parvula*, která je v raném věku hojně zastoupena. Při odsávání a předčasném odstavení kojenců může dojít k snížení mikrobiálního přenosu (Browne et al., 2022).



**Obrázek 3:** Schéma přenosu střevní mikrobioty matky do mateřského mléka (Mady et al., 2023, upraveno).

### 3.2 Čeleď *Enterobacteriaceae*

Čeleď *Enterobacteriaceae* patří k nejvýznamnějším bakteriálním čeledím. K nejdůležitějším zástupcům se řadí *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Shigella* spp., *Yersinia pestis* a *Salmonella typhi*, které se řadí k významným bakteriálním patogenům člověka. *Enterobacteriaceae* jsou charakterizovány jako gramnegativní tyčinky, pohyblivé, s bičíky. Netvoří spory a jejich velikost je 1-5  $\mu\text{m}$ . Jsou fakultativně anaerobní a rostou na

klasických laboratorních médiích s peptony nebo masovými výtažky s optimální teplotou mezi 22-37 °C. Jsou biochemicky aktivní a schopné fermentovat D-glukózu a jiné cukry. Bývají kataláza pozitivní a oxidáza negativní, redukují dusičnany na dusitany a mají v DNA 39-59 % (G+C) guanin-plus-cytosin (Farmer et al., 2010).

### 3.2.1 Taxonomie enterobakterií

Název *Enterobacteriaceae* byl poprvé navržen Rahnem v roce 1937. Tvoří velkou skupinu geneticky a biochemicky příbuzných bakterií. Řadí se do kmene Proteobacteria, třídy Gamaproteobacteria a řádu Enterobacteriales, do kterého jsou zařazeny celkem tři čeledi. (Baylis et al., 2011). Čeleď *Morganellaceae*, *Yersiniaceae* a *Enterobacteriaceae* (hlavní rod *Enterobacter*), do které bylo do roku 2021 zahrnuto 112 druhů, dříve označované jako „skupina tlustého střeva a tyfu“ pocházející z řeckého slova „entero“ (střevo) (Janda & Abbott, 2021). Do poloviny minulého století byla bakteriální klasifikace založena na fenotypu a pozorování. Poté byla zavedena hybridizace a další genetické metody (Baylis et al., 2011). V 70. letech 20. století byly definovány dříve nerozpoznané taxony střevních bakterií využitím polyfázového přístupu. Základní princip tohoto přístupu byl založen na spojení 50-200 morfologických, kulturních a biochemických znaků s genetickými studii DNA hybridizace a procentuálního obsahu G+C. V důsledku těchto metod byla pozměněna klasifikace např. *Morganella (Proteus) morgani* (Janda & Abbott, 2021).

Po roce 1980 byla zavedena moderní bakteriální nomenklatura a taxonomie schválením seznamů bakteriálních názvů v časopise *International Journal of Systematic Bacteriology*. Původní seznam obsahoval 2 366 prokaryotických názvů, z nichž 2 213 bylo na úrovni rodu, druhu a poddruhu. V 90. letech 20. století bylo sekvenování genu 16S rRNA zásadní pro bakteriální systematiku. Tato metoda byla rychlá, ale neměla dobrou rozlišovací schopnost na úrovni druhu u čeledi *Enterobacteriaceae*, způsobenou povahou ribozomálního genu. Následně byly zavedeny molekulární techniky např. hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF), multilokusová sekvenční analýza (MLSA), průměrná nukleotidová identita (ANI), procentuální obsah konzervovaných proteinů (POCP) a celogenomové sekvenování (WGS). Významný nárůst druhů u čeledi *Enterobacteriaceae* byl po roce 2005 (Janda & Abbott, 2021).

Uspořádaný systém pojmenování nových taxonů, včetně čeledi *Enterobacteriaceae* je řízen Mezinárodním kódem nomenklatury prokaryot (ICNP – International Code of Nomenclature of Prokaryotes). Základem kategorického klasifikačního systému je pořadí rodů a druhů. Toto uspořádání je podstatné pro regulaci vědeckých názvů mezinárodně uznávanými pravidly. ICNP zahrnuje pojmenování rodu a druhu a také požadavky na zveřejnění a validaci taxonu, oficiální formu registrace jména pomocí centralizovaného systému. Pravidlo 27 ICNP zařazuje nový taxon do časopisu *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM) nebo do jiné publikace s následným zveřejněním na validačním seznamu v IJSEM. Téměř polovina taxonů zapsaných do jiných publikací než IJSEM, není validována, což následně tvoří problém ve vědecké a lékařské literatuře. Např. rod *Atlantibacter*, který byl vytvořen v roce 2016 a jeho cílem bylo překlasifikovat dva druhy: *Escherichia hermanii* a *Salmonella subterranean* do nového rodu. Důvody neschopnosti

validace ale nejsou známé. Ke změnám klasifikace může docházet rychle a mohou být založeny na nových technologiích, analýze bakteriálních populací, analytických a výpočetních metodách. V roce 2019 byl ICNP aktualizován z předchozí verze z roku 2008 (Janda & Abbott, 2021).

Taxonomie bakterií se skládá ze tří důležitých složek – identifikace, nomenklatury a klasifikace. Klasifikace zahrnuje uspořádání geneticky podobných organismů do příbuzné evoluční skupiny. Do roku 1985 byly pouze tři střevní skupiny uznávané jako gastrointestinální patogeny: *Escherichia coli* – *Shigella*, *Salmonella spp.* a *Yersinia enterocolitica*. V současnosti je uznáváno více než 40 různých patotypů, z nichž více než 50 % patří do čeledi *Enterobacteriaceae* (Janda & Abbott, 2021).

### 3.2.2 Význam enterobakterií u kojenců

Enterobakterie se u kojenců podílí na trávení potravy, produkci vitamínů a podpoře vývoje imunitního systému. Podílí se na metabolických aktivitách a jsou schopny fermentovat některé cukry. Obvykle se nachází v rovnováze s ostatními bakteriemi střevního mikrobiomu, pokud však dojde k jeho dysbióze, může docházet k přemnožení enterobakterií a způsobit infekce. Větší zastoupení patogenních kmenů čeledi *Enterobacteriaceae* může poté u kojenců způsobit rozvoj onemocnění (Hung et al., 2021).

Děti, a především kojenci jsou více citlivé na toxické produkty z prostředí. V prvních měsících života není lidský organismus dostatečně vyvinut a má nižší schopnost detoxikace kontaminantů z životního prostředí. Výživa kojenců je omezena na mateřské mléko, ovoce a kojeneckou výživu. Důsledkem toho může výskyt toxických kontaminantů v těchto potravinách vést k vyššímu riziku než u dospělých jedinců (Braun et al., 2021). Kojenecká výživa a sušené mléko bývá zdrojem kontaminace a vznikem alimentárních onemocnění způsobené enterobakteriemi u kojenců. Tyto gramnegativní tyčinky produkující karbapenemázu (enzymy produkované gramnegativními mikroorganismy, schopné hydrolyzovat molekulu karbapenemů) jsou vysoce rezistentní vůči lékům. Bakterie patřící do této skupiny jsou *Escherichia spp.* a *Klebsiella spp.* Dalším patogenem vyskytující se v práškové kojenecké výživě je bakterie *Cronobacter spp.* (Seesahai et al., 2021).

Gestační věk je důležitým faktorem pro vytvoření střevní mikrobioty kojence. Předčasně narozené děti mohou trpět imunitními, dýchacími a neurologickými problémy, obtížně zvládat různá onemocnění a obvykle bývají krmeny uměle nebo parenterálně. Tito novorozenci vykazují opožděnou kolonizaci střeva komenzálními anaerobními mikroby, jako jsou *Bifidobacterium spp.* nebo *Bacteroides spp.* Oproti tomu vykazují výrazně vyšší hladiny čeledi *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae* a dalších oportunních patogenních mikroorganismů. Dominantní zastoupení v první měsících života mají grampozitivní bakterie, jako jsou *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.* a klostridie. Složení střevní mikrobioty předčasně narozeného jedince může být náchylné pro rozvoj nekrotizující enterokolitidy nebo sepse. Takto složený mikrobiom se od novorozenců narozených v termínu liší nejen složením, ale i funkcí. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem produkované střevní mikrobiotou bývají zastoupeny v nižších koncentracích. Pozměněný metabolismus lipidů je způsoben



obohacením derivátů žlučových kyselin a na základě testů provedených ve vzorcích moči byla také zjištěna vyšší hladina vitamínu D a E (Hill et al., 2017).

### 3.3 Rod *Escherichia* a *Escherichia coli*

*Escherichia coli* je považována za nejvíce prozkoumaný mikrobiální organismus na světě. Vliv na lidské zdraví se skládá z komenzalismu, projevu gastrointestinálních onemocnění a extraintestinálních patologií. Přítomnost této bakterie ve výkalech a její schopnost přetrvávat v různých prostředích vedlo k jejímu použití jako fekální indikátorový organismus pro kvalitu vody. Dále jako indikátor pro antimikrobiální rezistenci gramnegativních bakterií. Kromě funkce neškodného střevního komenzálu je také hlavní příčinou lidských onemocnění (Geurtsen et al., 2022). Kmeny „*Shigella*“ jsou považovány za poddruhy *E. coli*, ale často jsou označovány pod svým samostatným rodovým jménem. Důvody takto intenzivního studování *E. coli* jsou především: rychlé tempo růstu v přítomnosti kyslíku, jednoduchost z hlediska genetické manipulace a snadná adaptace na změny prostředí (Abram et al., 2021).

#### 3.3.1 *Escherichia* spp.

Původ názvu bakterie *Escherichia coli* pochází z označení *Bacterium coli commune*. Tento komenzál gastrointestinálního traktu, izolovaný z fekálního materiálu novorozenců a raných kojenců, byl identifikován v roce 1885 Theodorem Escherichem jako původce dětského průjmu. V roce 1895 byla tato bakterie označována jako *Bacterium coli* a v roce 1919 přejmenována na *Escherichia coli*. Identifikace nových druhů rodu *Escherichia* byla provedena pomocí biochemických analýz a později pomocí rozvoje genotypových a genomických diagnostických prostředků. Například pomocí výsledků hybridizace DNA a analýzy sekvenování 16S rRNA byla requalifikována *Escherichia albertii* (Friedmann, 2014). *E. coli* obsahuje pohyblivé gramnegativní bacily z čeledi *Enterobacteriaceae* a rodu *Escherichia*. *E. coli* je snadno dostupná z klinických vzorků na obecných nebo selektivních médiích rostoucí při 37 °C za aerobních podmínek. V gastrointestinálním traktu je přizpůsobena obtížným podmínkám jako je kyselost žaludku a žluč. Na základě přizpůsobení k těmto podmínkám bylo vytvořeno selektivní médium obsahující žluč a krystalovou violet, nazývané MacConkey agar (Nataro & Kaper, 1998). Znaky, které odlišují *E. coli* od ostatních komenzálů jsou: schopnost této bakterie fermentovat glukózu, laktózu, kataláza a indol pozitivní, oxidáza, ureáza a citrát negativní. Podle metody DNA hybridizace vykazují kmeny, které jsou považovány za členy *E. coli* > 70% podobnost DNA s referenčními kmeny a podle sekvenční identity založené na nukleových kyselinách > 99% 16S rRNA nebo > 95% průměrnou identitu nukleotidů (Cobo-Simón et al., 2022).

#### 3.3.2 *Escherichia hermanii*

*Escherichia hermanii* je gramnegativní tyčinkovitá bakterie patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*, která byla poprvé popsána v roce 1982. Od *E. coli* ji lze rozeznat díky různým biochemickým vlastnostem: pozitivní reakce na kyanát draselný, fermentace celobiózy

a produkce žlutého pigmentu. Je považována za patogenní, jelikož může způsobovat bakteriémii, infekci močových cest a centrálního nervového systému (Ioannou, 2019). *E. hermanii* byla izolována z ran, peritoneálních tekutin, krve, mozkomíšního moku, novorozeneckého cefalohematomu a moči, aby byla potvrzena možná patogenita. Studie provedené *in vitro* také dokazují, že *E. hermanii* je rezistentní na penicilin, ampicilin a karbenicilin (Kaewpoowat et al., 2013). Jak již bylo uvedeno výše v kapitole 3.2.1 Taxonomie enterobakterií, u *E. hermanii* byla navržena reklasifikace v závislosti na vývoji rodu *Atlantibacter*. *Escherichia hermanii* by byla nově přejmenována na *Atlantibacter hermanii* (Janda & Abbott, 2021).

### 3.3.3 Pozitivní vliv *E. coli* u kojenců

*Enterobacteriaceae*, jako *E. coli* a některé druhy *Enterobacter* jsou jedním z prvních bakteriálních kolonizátorů ve střevě kojence ( $10^9$  KTJ/gram stolice kojenců). Schopnost *E. coli* využívat kyslík pomáhá vytvářet anaerobní prostředí pro růst přísných anaerobních bakterií a podílet se na kolonizační rezistenci (Arrieta et al., 2014).

*E. coli* vytváří mutualistický nebo komenzální vztah s lidským hostitelem, podporuje produkci vitamínu K a vytváří odolnost proti kolonizaci patogenů produkcí mikrocinů a kolicinů. Schopností kolicinů je působit na bakterie produkující antibakteriální proteiny (Gattupalli & Gattupalli, 2021). *E. coli* zahrnuje probiotické kmeny, které příznivě ovlivňují hostitele a byly modifikovány tak, aby byla zlepšena jejich kolonizace, vylučování metabolitů, proteinů a enzymů. Probiotikum *E. coli* Nissle 1917 (EcN) se v humánní medicíně používá jako mikrobiální léčivo, které mimo jiné vykazuje příznivé účinky při akutním průjmu u kojenců a batolat. Dalšími probiotickými kmeny jsou u kojenců léčeny gastrointestinální poruchy a alergie (Splichalova et al., 2014). Kromě toho je *E. coli* schopna produkce kyseliny para-amino-benzoové (PABA), která je substrátem pro syntézu kyseliny listové, což je základní živina nezbytná pro syntézu proteinů a nukleových kyselin, která je obecně potřebná pro růst mnoha bakterií, včetně některých bifidobakterií a laktobacilů (Rossi et al., 2011).

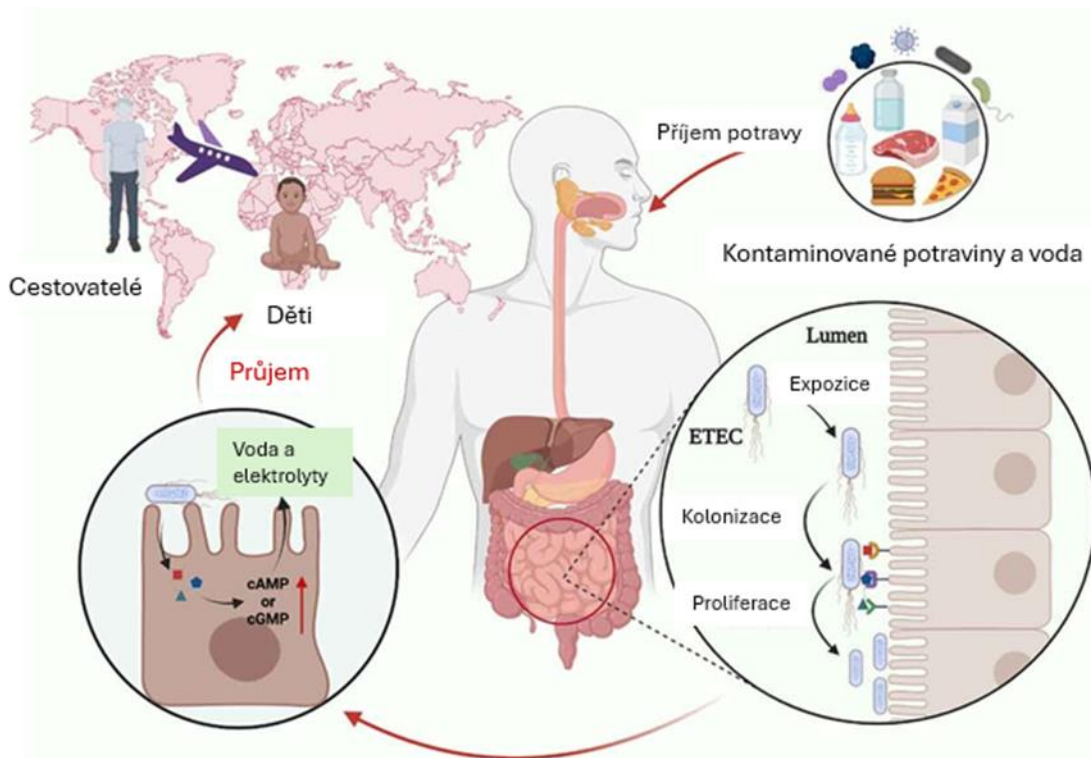
### 3.3.4 Onemocnění způsobené *E. coli* u kojenců

*E. coli* patří také zároveň k nejběžnějším lidským patogenům (García & Fox, 2021). Bakteriální patogenita je dle Pakbin et al. (2023) definována jako schopnost bakteriálních kmenů vyvolat infekci, uvolňovat toxiny, produkovat virulenci a způsobovat onemocnění až úmrtnost hostitele. Patogenní aktivita je charakteristická pro všechny bakteriální patogeny. Stupeň virulence je měřítkem patogenity bakterie a náchylnost k bakteriální infekci je poté závislá na tomto stupni a fyziologických podmínkách hostitele. Hostitelé mohou být infikováni více než jedním patotypem *E. coli*. Z tohoto důvodu by mělo být pro charakterizaci vybráno několik izolátů *E. coli* z konkrétní hostitelské tkáně nebo biologického vzorku (García & Fox, 2021). Podle místa infekce vzniklých onemocnění lze rozdělit dvě skupiny: střevní (průjmy) a extraintestinální (infekce močových cest a septikémie). Střevní skupina se dále dělí na šest odlišných patotypů: enteropatogenní *E. coli* (EPEC), enterohemoragická *E. coli* (EHEC) (produkující toxin Shiga = hlavní virulenční faktor), enterotoxigenní *E. coli* (ETEC),

enteroinvazivní *E. coli* (EIEC), která napadá epitel tlustého střeva a způsobuje bacilární úplavici, enteroagregační *E. coli* (EAEC) a difuzně adherentní *E. coli*, která bývá spojena s Crohnovou chorobou. K extraintestinálním druhům je zařazena např. uropatogenní *E. coli* (UPEC) nebo *E. coli* spojená s novorozeneckou meningitidou (Korf et al., 2019). První zmínky o dětských průjemových onemocněních způsobených *E. coli* byly popsány Adamem v roce 1933. Schéma sérologické klasifikace, které se používá dodnes, bylo navrženo Kauffmanem v roce 1944. Podle tohoto schématu jsou bakterie *E. coli* sérotypizovány na základě povrchových antigenů O, H a K. Průjemové kmeny *E. coli* patří mezi první patogeny, pro které byly vyvinuty molekulárně diagnostické metody. S rozvojem technologií sond na bázi nukleových kyselin a metod PCR (polymerázová řetězová reakce) došlo k dalšímu pokroku rozlišení mezi průjemovými a nepatogenními druhy (Nataro & Kaper, 1998). Další klasifikace *E. coli* byla umožněna stanovením fylogenetické skupiny (A, B1, B2 a D), kde skupiny A a B1 jsou stanoveny jako komenzální kmeny a B2 a D představují patogenní kmeny (García & Fox, 2021). Každý patotyp *E. coli* je charakteristický pro své mechanismy patogenity a má svůj specifický profil faktorů virulence. Dle Pakbin et al. (2021) jsou faktory virulence definovány jako specifické molekuly (především proteiny) produkované a uvolňované bakteriemi, houbami, prvoky a viry. Tyto faktory jsou kódovány specifickými geny umístěnými na chromozomu nebo genetických elementech (plazmidy, transpozony) u bakteriálních patogenů. Obecně je lze rozdělit do 6 hlavních skupin: membránové proteiny, kapsle, sekreční proteiny, proteiny vnější membrány, tvorba biofilmu a získávání železa. Skupina membránových proteinů je poté složena z faktorů adheze, invaze, kolonizace a povrchové virulence. Skupina sekrečních proteinů je rozdělena do inhibitorů imunitní odpovědi, toxinů a transportních skupin (Pakbin et al., 2023).

K nákaze člověka může docházet konzumací kontaminovaných potravin (nedostatečně tepelně upravené maso, kontaminované čerstvé potraviny – salátové listy), pitnou vodou kontaminovanou živočišným nebo lidským odpadem nebo přímým kontaktem na člověka v důsledku špatné hygieny. EPEC, ETEC a EAEC jsou řazeny k hlavním původcům dětských průjmů. Enteropatogenní a enterotoxigenní *E. coli* jsou také nejčastěji izolované bakteriální enteropatogeny u dětí mladších 5 let v rozvojových zemích (Clements et al., 2012). Enterotoxigenní *E. coli* v tenkém střevě má schopnost kolonizovat střevní epiteliální buňky prostřednictvím kolonizačních faktorů a dochází k proliferaci na povrchu střevního epitelu, jak je znázorněno na **obrázku 4**. ETEC má schopnost produkovat tepelně labilní nebo tepelně stabilní enterotoxiny s toxickým účinkem. Tepelně labilní enterotoxin je vysokomolekulární molekula složená z aktivní alfa podjednotky (katalytická složka) obklopená dalšími pěti vazebnými beta podjednotkami. Přenos toxinu do cytoplazmy je zpomalen z důvodu přítomnosti dvou fosfolipidových membrán, proto je zásadní sekrece proteinů. Tepelně stabilní enterotoxin je nízkomolekulární peptid skládající se z 18 až 19 aminokyselinových zbytků. Kolonizace ETEC je zásadní pro účinek její toxicity. Po úspěšné kolonizaci dochází k účinné aktivitě enterotoxinů, která je zodpovědná za sekreci vody a elektrolytů ve střevním lumenu. Uvolnění vody a elektrolytů do střevního lumenu je způsobeno zvýšením cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Projev infekce ETEC je charakterizován akutním vodnatým

průjmem, jehož důsledkem je dehydratace a vyčerpání. Dalšími příznaky jsou zvracení, žaludeční křeče, bolest hlavy a v některých případech i horečky (Zhang et al., 2022).



**Obrázek 4:** Charakteristika infekce enterotoxigenní *E. coli* (Zhang et al., 2022, upraveno).

Enteroagregační bakterie *E. coli* (EAEC) je považována za relativně nový potravinový patogen spojený s akutními dětskými průjmy a růstovou retardací. Ke klinickým příznakům je zařazen vodnatý průjem s krví nebo hlenem. Patogeneze EAEC je spojena s adhezí ke střevnímu epitelu prostřednictvím adhezenčních agregačních fimbrií, tvorbou biofilmu a sekrecí toxinů (Pakbin et al., 2021).

Mezi hlavní onemocnění způsobené *E. coli* se řadí: krvavý/vodnatý průjem, hemolyticko-uremický syndrom a kolitida. K extraintestinálním onemocněním je řazena bakteriémie, sepse, meningitida a infekce močových cest (Geurtsen et al., 2022).

### 3.3.5 Meningitida

Zánět mozkových blan neboli meningitida je infekční onemocnění centrálního nervového systému, při kterém dochází k otoku mozku, uvolňování cytokinů a chemokinů v reakci na bakterie a bakteriální produkty a nejvíce postihuje děti v novorozeneckém a kojeneckém věku. Výskyt tohoto onemocnění je nejvyšší v rozvojových zemích afrického kontinentu. Rozvoj očkování proti meningokokům, *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae*, snížilo úmrtnost na toto onemocnění (Liao et al., 2021).

Nejznámějším patotypem způsobujícím meningitidu je extraintestinální patogenní *E. coli* spojená s novorozeneckou meningitidou, která má schopnost přežít v krvi a napadat mozkové blány novorozence a kojence. Jedná se o jednu z nejčastějších infekcí novorozenců, jejichž mortalita je 10-30 % (Wijetunge et al., 2015). Patogeny způsobující meningitidu mají schopnost pronikat hematoencefalickou bariérou. Hematoencefalická bariéra je strukturální a funkční bariéra, která je tvořena mozkovými mikrovaskulárními endoteliálními buňkami, astrocyty a pericyty. Její schopnost je regulace průchodu molekul dovnitř a ven z mozku, aby bylo udrženo nervové prostředí a ochrana mozku před mikroby a toxiny cirkulujícími v krvi. Průnikem *E. coli* přes tuto bariéru je způsoben intrakraniální zánět, kterým je vyvolána infekce. Je způsoben prostřednictvím transcelulárního mechanismu, ale není změněna propustnost hematoencefalické bariéry (Kim, 2016).

*Cronobacter sakazakii* patří k dalším původcům dvou typů invazivních novorozeneckých onemocnění: bakteriémie a meningitidy. Ve 40 % případů novorozenecké nebo kojenecké meningitidy patří k nejčastějším příznakům mozkové léze způsobené tvorbou abscesů. Hlavní rizikové faktory pro rozvoj *Cb. sakazakii* jsou předčasný porod, nízká porodní hmotnost pod 2 500 g a konzumace práškové kojenecké výživy. Úmrtnost byla hlášena u 40-80 % pacientů onemocněných bakteriemií, meningitidou a nekrotizující enterokolitidou. K zamezení rozvoji *Cb. sakazakii* Janda & Abbott (2021) doporučuje náhradu práškové kojenecké výživy. Dále omezení konzumace některých moučných výrobků, mouky, obilných jader, bylin, koření, masa a dalších, ze kterých může být *Cb. sakazakii* získán. Jeho rozsáhlé rozšíření v životním prostředí je vysvětleno jeho odolností vůči vysychání, suchým a kyselým podmínkám. Tepelná odolnost od 60 °C do 4 °C umožňuje této bakterii přežít standardní výrobní procesy. V důsledku toho bylo WHO (Světovou zdravotnickou organizací) a FAO (Organizací pro výživu a zemědělství) vydáno doporučení pro přípravu práškové kojenecké výživy horkou vodou o teplotě > 70 °C, aby došlo k snížení míry infekce (Blackwood & Hunter, 2016).

Ve většině studií bylo potvrzeno, že normální počet bílých krvinek u zdravých předčasně narozených nebo donošených novorozenců je <10 buněk/mm<sup>3</sup>. Tyto hladiny závisí na věku, kdy nejvyšších hodnot je dosaženo během prvního týdne. Novorozenci narození po 34. týdnu těhotenství, u nichž byla prokázána bakteriální meningitida, mají vyšší počet bílých krvinek (přes 400 buněk/mm<sup>3</sup>). Na rozdíl od novorozenců narozených před 34. týdnem, kteří mají nižší počet bílých krvinek (pod 110 buněk/mm<sup>3</sup>). Vyšší počet buněk je spojen s gramnegativní nebo grampozitivní meningitidou. Bakteriální meningitida bývá spojena s pleocytózou mozkomíšního moku (zvýšené množství buněk), virová meningitida bývá lymfocytární povahy. Normální hladina glukózy u novorozenců se pohybuje mezi 70-80 % sérové hladiny. Tato hladina klesá při bakteriální meningitidě (Simonsen et al., 2014).

### 3.3.6 Infekce močových cest

Infekce močových cest jsou způsobeny velkým množstvím patogenů, z nichž nejvýznamnější je uropatogenní *E. coli* (UPEC). K méně častým se poté řadí *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus* spp., *Pseudomas*

spp. a jiné. Příznaky této infekce mohou být různé a lze je rozdělit do tří kategorií. Jednou z nich je akutní pyelonefritida, což je typ infekce ledvin, k jejíž příznakům patří bakteriurie (přítomnost bakterií v moči) a pyurie (přítomnost velkého množství leukocytů v moči). Další z nich je akutní cystitida, která se projevuje častým močením, dysurií (bolestivé močení), bolestí v podbřišku a zapáchající močí. Třetí kategorií, která vzniká ve většině případů je asymptomatická bakteriurie, postihující dolní močové cesty. Močová trubice je obvykle sama schopna působit proti patogenním bakteriím. Sliznice a epitelální buňky jsou schopny udržet rovnováhu mezi močovou trubicí a bakteriemi. V případě silné patogenity bakterií nebo vnějšího poškození je tato ochranná funkce narušena. Nejprve dochází ke kolonizaci vyvolanou uropatogenní *E. coli*, poté k jejímu nárůstu v moči a interakci s obranným systémem epitelu močového měchýře. Následně je vytvořen biofilm z důvodu množení a hromadění UPEC. Biofilm je významný právě z hlediska kolonizace a vzniku infekce. Díky následné invazi a replikaci dochází k zvýšení počtu až na  $10^5$  bakterií na buňku. Poté dochází ke kolonizaci ledvin. UPEC narušuje tkáň hostitele uvolňováním tří typů toxinů: hemolysin, cytotoxický nekrotizující faktor 1 a autotransportní toxiny (Zhou et al., 2023).

V novorozeneckém období je infekce častější u předčasně narozených dětí. Během prvních 6 měsíců mají větší riziko infekce chlapci než dívky. Po prvním roce života jsou náchylnější dívky. V tomto věku je obtížné infekci rozeznat. K příznakům patří horečka, záchvaty, metabolická acidóza, špatné sání, prodloužená žloutenka, abnormální přibývání nebo ubývání hmotnosti, páchnoucí moč a je zde vysoká pravděpodobnost bakteriémie. Slabý proud moči nebo neustálé pomočování může naznačovat poškození funkce močového měchýře nebo obstrukci v dolních močových cestách. U dětí do 3 let věku by při těchto dlouhodobých příznacích měla být provedena analýza moči. U kojenců lze odebrat moč připojením sterilního váčku nebo suprapubickou aspirací, která je spolehlivější pro získání čistého vzorku. Suprapubickou aspirací lze použít pouze u nevyprázdněného měchýře při poloze dítěte v leže a vpichem jehly do maximální hloubky 1-2 cm kolmo na břišní stěnu. Při odběru by vzorek moči měl být uchován ve sterilní nádobě bez přístupu vzduchu, protože počet bakterií se každých 30 minut zdvojnásobí. Pokud vzorek nemůže být během krátké doby analyzován, může být zchlazen na teplotu 4 °C po dobu 4 hodin. K detekci bakteriurie a pyurie by měla být provedena mikroskopie. Přítomnost bakterií v moči může být maskována přítomností krystalů, vaginálních buněk, uroteliálních buněk, červených nebo bílých krvinek. K léčbě infekce močových cest jsou používány antibiotika, která jsou snadno aplikovatelná, dosahují vysoké koncentrace v moči, vykazují minimální nebo žádnou toxicitu, nemají vliv na vaginální mikrobiom a účinně působí proti *E. coli*. U dětí jsou nejčastěji používány cefalosporiny (Suprax, Omnicef, Cedax, Vantin, a další) a fluorochinoliny (například Cipro, nebo Neofloxin) (Leung et al., 2019). V případě neantibiotické prevence je používána D-manóza. Jedná se inertní monosacharid, který je metabolizován a vylučován močí, inhibicí působící adheze bakterií k urotelu. Tento jednoduchý cukr je v metabolismu důležitý pro glykosylaci bílkovin. D-manóza je schopna vázat a blokovat adheziny umístěné na špičce bakteriálních fimbrií a je kompetitivním inhibitorem proti adhezi bakterií k receptorům uroteliálních buněk. V důsledku toho může D-manóza zabránit adhezi uropatogenů

způsobující infekci močových cest. Její schopnost vázat se na *E. coli* pomáhá zlepšit dlouhotrvající léčbu. V metabolismu je dobře snášena, ale nežádoucím účinkem mohou být průjmy (Nunzio et al., 2021).

Na snížení rizika vzniku infekce se podílí také kojení, kdy vysoká hladina imunoglobulinu v mateřském mléce působí proti přilnutí bakterií ke střevní sliznici a močovému epitelu. Bylo také zjištěno, že oligosacharidy mateřského mléka mohou ochránit epitelální buňky močového měchýře před cytotoxicitou a protizánětlivými účinky způsobenými uropatogenní *E. coli* (Kawalec & Zwolinska, 2022).

### 3.3.7 Enteropatogenní skupiny druhu *E. coli*

Enteropatogenní skupina *E. coli* (EPEC) byla souhrnně popsána Neter et al. (1995), kdy byly sepsány kmeny epidemiologicky související se vznikem kojeneckých průjmů. Kmeny jsou charakteristické neschopností produkovat Shiga toxin, ale produkují cytotoxiny. Funkcí EPEC je přilnutí ke střevnímu epitelu, zničení mikrokloků a polymerizace aktinu (García & Fox, 2021). K faktorům virulence, kterými je způsobena infekce EPEC, jsou zařazeny sekreční proteiny – vypuštění proteinů, kterými narušují cytoskelet buňky; adheziny – fimbrie využívající k přichycení ke střevním buňkám; kapsle – k vyhýbání se imunitnímu systému a cytotoxiny – zajišťující přímé poškození střevní buňky vedoucí ke vzniku průjmu. Schopnost produkovat cytotoxiny odlišuje EPEC od jiných patotypů *E. coli*. Schopností EPEC je přímé poškození střevních buněk, na rozdíl od ETEC, kterými jsou produkovány toxiny způsobující sekreci tekutin (Pakbin et al., 2021). EPEC lze identifikovat pomocí fluorescenčního aktinového barvicího testu, jehož principem je rozlišení, zda bakterie mohou produkovat příslušné léze. Na základě dílčí klasifikace lze rozdělit typické EPEC (tEPEC) a atypické EPEC (aEPEC). Typické kmeny mají velký plazmid virulence (plazmid EPEC adherence faktor – pEAF) kódující fimbrie, zatímco aEPEC tento plazmid nemají (García & Fox, 2021).

### 3.3.8 Probiotický kmen *E. coli*

Kmen *E. coli* Nissle 1917 (EcN) je používán jako aktivní složka farmaceutického přípravku Mutaflor (mikrobiální lék licencovaný pro použití v humánní medicíně v evropských zemích). Je používán od roku 1917 k léčbě různých onemocnění a dysfunkcí střevního traktu. Toto použití *E. coli* jako probiotického kmene bylo objeveno bakteriologem Alfredem Nisslem v Německu. Byly testovány lidské střevní kmeny na růstovou inhibiční aktivitu proti *Salmonella* spp., *Shigella* spp. a dalším enteropatogenům. Na základě těchto testů bylo zjištěno, že fekální izoláty *E. coli* působí antagonisticky proti výše zmíněným patogenům. V roce 1917 byla provedena izolace kmene EcN během první světové války ze stolice vojenského příslušníka. U tohoto vojáka se nerozvinul infekční průjem i přesto, že konzumoval enteropatogeny kontaminovanou vodu. Dle Nisslea bylo potvrzeno tvrzení, že ve střevech příslušného vojáka se nacházel silný antagonisticky aktivní kmen *E. coli*, který zabránil infekci. Na základě provedení laboratorních testů byl tento kmen zaveden jako součást lékařského přípravku. Před rozvojem použití antibiotik se jeho použití vztahovalo na infekční průjmy, později se léčily i neinfekční poruchy a onemocnění trávicího traktu (chronická zácpa, zánětlivé onemocnění

střev apod.). EcN je gramnegativní enterobakterie obsahující lipopolysacharid jako strukturální složku své vnější buněčné membrány. Molekulární struktura tohoto lipopolysacharidu je složena z velmi krátkých postranních řetězců polysacharidů, které jsou složeny z jednoho stavebního bloku oligosacharidů typického pro antigen O6. Z tohoto důvodu dochází k „polohrubému“ fenotypovému vzhledu kmene, pokud je pěstován na pevných živných médiích. Z hlediska metabolických schopností je EcN typickým kmenem *E. coli* s výjimkou schopnosti metabolismu argininu. EcN je schopna produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem (octová a mravenčí kyselina) jako konečných produktů, metabolismu sacharidů za aerobních i anaerobních podmínek (Sonnenborn & Schulze, 2009).

EcN byla testována pro své antimikrobiální účinky proti jiným mikroorganismům *in vitro* i *in vivo*. *In vitro* byly antagonistické účinky stanoveny kokultivací s enteropatogenními, uropatogenními a jinými kmeny *E. coli*, i s jednotlivými kmeny druhů: *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp. a *Candida* spp. Testování bylo provedeno buď v kapalných médiích, kde byl stanoven počet životaschopných bakterií každého kmene po aerobním růstu při 37 °C, nebo na pevných médiích pomocí agarové difúzní metody, kde byla EcN vytvořena inhibiční zóna proti testovanému kmeni. Kultivace EcN s *E. coli* produkující Shiga toxin v tekutých kulturách vedla ke snížení hladin Shiga toxinu. Antagonistický účinek byl potvrzen i u *in vivo* působením EcN s dalšími mikroorganismy (patogenní i nepatogenní *E. coli*, *Salmonella* spp., *Candida* spp., *Lactobacillus* spp.). Inhibiční účinky byly pozorovány i u perorálního podání kmene EcN novorozencům. Stolice novorozenců byla mikrobiologicky analyzována, aby byla potvrzena kolonizace. Množení fakultativních a obligátních patogenů ve střevě dětí bylo významně sníženo kolonizací EcN. Testy provedenými na novorozencích (donošených i předčasně narozených) byly potvrzeny vyšší hladiny imunoglobulinů (IgA a IgM) v krevním séru a ve vzorkách stolice několik dní po záměrné kolonizaci střeva EcN. Kolonizace je usnadněna schopností EcN produkovat a vylučovat celulózu (důležité pro tvorbu biofilmu). Kmen EcN se od ostatních kmenů *E. coli* liší schopností tvořit biofilmy při 37 °C, jiné kmeny pouze při teplotách < 30 °C. Dosažení dlouhodobé střevní kolonizace EcN je umožněno pouze za určitých podmínek. U novorozenců, kdy byla podána perorální dávka  $10^8$  KTJ EcN po dobu prvních 5 dnů života, byl aplikovaný kmen získán ze vzorků stolice po dobu několika měsíců. U dospělých jedinců, kdy byl EcN podán perorálně po dobu 1 týdne, byl kmen získán ve většině případů po dobu 2 týdnů. U zdravých dospělých jedinců je obtížné dosáhnout trvalého osídlení střeva EcN z důvodu zábran tvořených současnou mikrobiotou (Sonnenborn & Schulze, 2009).

Licencovaný lék Mutaflor lze získat ve formě tobolek obsahující lyofilizovaný prášek s životaschopnou EcN ( $2,5-25 \times 10^9$  KTJ/kapsle) nebo jako bakteriální suspenzi ( $10^8$  KTJ/ml). Tobolky jsou uzpůsobeny tak, aby se bakterie EcN uvolňovala nejdříve v terminálním ileu (konečný úsek kyčelníku tenkého střeva ústící do slepého střeva). Jsou odolné proti žaludeční kyselosti, antimikrobiálnímu působení žluči a trávicím enzymům v tenkém střevě. Suspenze je složena z životaschopné bakterie EcN v roztoku elektrolytu bez sacharidů a dusíku. Tato suspenze byla vytvořena především pro kojence a batolata (nebo pro dospělé s obtížemi při polykání) (Sonnenborn & Schulze, 2009).



Dle randomizované, placebem kontrolované dvojitě zaslepené klinické studie, do které byly zařazeni kojenci a batolata při léčbě akutního průjmu, byla studována účinnost EcN. Akutní průjem by neměl trvat déle než 3 po sobě jdoucí dny. Do studie bylo zařazeno celkem 113 kojenců a batolat ve věku 2-46 měsíců, kteří byli náhodně rozděleni do skupin s EcN suspenzí ( $10^8$  KTJ/ml) nebo do skupiny s placebem v dávce závislé na věku (kojenci 1 x 1 ml suspenze/den, batolata 2 x 1 ml/den, děti starší 3 let 3 x 1 ml/den). V obou léčených skupinách byl průjem způsoben bakteriálními nebo virovými infekcemi a také jinými nespecifickými příčinami, které nebyly rozpoznány. Cíle snížení počtu stolic bylo dosaženo u 52/55 pacientů ve skupině s EcN a 39/58 pacientů ve skupině s placebem. Studie probíhala po dobu 2,5 dne ve skupině s EcN a 4,8 dne ve skupině s placebem. Dle výsledků bylo potvrzeno, že léčba EcN zkrátila průměrnou dobu trvání průjmu o 2,3 dne ve srovnání s placebem (Sonnenborn & Schulze, 2009).

Méně známým probiotickým přípravkem *E. coli* je suspenze Symbioflor 2. Tento probiotický produkt je vyroben společností SymbioPharm GmbH (Herborn, Německo) a je zařazen nejčastěji pro léčbu gastrointestinálních onemocnění. Rozdílem oproti probiotiku Mutaflor (kmen *E. coli* Nissle) je, že obsahuje šest genotypů *E. coli* ( $1,5 - 4,5 \times 10^7$  životaschopné bakterie/ml). Jeho doporučená dávka pro kojence je 1 ml denně stejně jako u přípravku Mutaflor (Beimfohr, 2016).

Dalším probiotickým zástupcem je kmen *E. coli* Colinfant (obsahuje *E. coli* criodesiccata O83:K24:H31), který je používán u kojenců při alergiích, nozokomiálních infekcích, průjmech a také zabraňuje infekci patogenní *E. coli* (Gattupalli & Gattupalli, 2021).

### 3.4 Rod *Enterobacter*

Rod *Enterobacter*, patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*, zahrnuje gramnegativní fakultativně anaerobní bacily 2  $\mu$ m dlouhé, pohyblivé pomocí bičičků. Tento rod byl poprvé popsán v roce 1960 a v posledních 50 letech došlo ke změnám v taxonomii např. *Enterobacter sakazakii* byl přeřazen do rodu *Cronobacter*. Tento rod je dostupný z půdy a vody a je endofytní nebo fytopatogenní pro různé druhy rostlin a současně i oportunní patogen pro člověka (Davin-Regli et al., 2019).

#### 3.4.1 *Enterobacter* spp.

V současnosti *Enterobacter* spp. zahrnuje významné zástupce jako je: *Enterobacter aerogenes*, *Enb. amnigenus*, *Enb. arachidis*, *Enb. asburiae*, *Enb. carcinogenus*, *Enb. cloacae*, *Enb. cowanii*, *Enb. dissolvans*, *Enb. gergoviae*, *Enb. helveticus*, *Enb. hormaechei*, *Enb. kobei*, *Enb. ludwigii*, *Enb. mori*, *Enb. nimipressuralis*, *Enb. oryzae*, *Enb. pulveris*, *Enb. pyrinus*, *Enb. radicincitans*, *Enb. soli*, *Enb. taylorae* a *Enb. turicensis*. Osm z těchto druhů je zařazeno do komplexní skupiny *Enterobacter cloacae*: *Enb. cloacae*, *Enb. asburiae*, *Enb. hormaechei*, *Enb. kobei*, *Enb. ludwigii*, *Enb. mori* a *Enb. nimipressuralis*. *Enb. cloacae* je minimálně z 60 % podobný ve svém genomu s ostatními šesti členy skupiny. Tato nomenklatura je založena na

sdílení především genotypových, ale také fenotypových charakteristik (Davin-Regli et al., 2019).

Z těchto všech bakterií byly pouze některé druhy zařazeny k patogenům způsobující m nemocniční infekce. *Enb. aerogenes*, *Enb. cloacae* a *Enb. hormaechei* patří k nejčastěji izolovaným druhům u klinických infekcí. Patogenita těchto bakterií je založena na vylučování enterotoxinů, alfa-hemolyzinů a cytotoxinů podobných toxinům Shiga. *Enb. hormaechei* byl popsán v roce 1989 O'Harou et al. jako LDC (lysin dekarboxyláza) a želatináza negativní, ODC (ornitin dekarboxyláza), ADH (arginin dekarboxyláza) a ureáza pozitivní, fermentující sacharózu, L-ramnózu, ale ne D-sorbitol ani melibiózu. Dle rozdělení podle Hoffamanna byl *Enb. hormaechei* rozřazen do tří poddruhů na základě rozdílných biochemických charakteristik. *Enb. hormaechei* subsp. *oharae* je schopen fermentovat pouze melibiózu; *Enb. hormaechei* subsp. *hormaechei* je schopen fermentovat pouze dulcitol; a *Enb. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* je schopen fermentovat všechny sloučeniny kromě dulcitolu (Davin-Regli et al., 2019).

*Enb. amnigenus* byl popsán Izardem et al. (1981) a jedná se o vzácně izolovanou bakterii, která byla přeřazena do rodu *Lelliottia*. Jsou rozlišovány dvě skupiny tohoto kmene: bioskupina 1 a 2. Tyto kmeny jsou charakteristické pozitivní reakcí na ornitin dekarboxylázu a lysin dekarboxylázu, negativní reakcí na ureázu a fermentací na melibiózu. Kmen bioskupiny 1 vykazuje fermentaci na sacharózu a rafinózu, ale ne na D-sorbitol. Kmen bioskupiny 2 naopak vykazuje fermentaci na D-sorbitol, ale ne na sacharózu a rafinózu (Davin-Regli et al., 2019).

*Enb. cloacae* je rozdělen na dva poddruhy. *Enb. cloacae* subsp. *cloacae*, který vykazuje negativní reakci na aeskulinový test a *Enb. cloacae* subsp. *dissolvens*, který vykazuje pozitivní aeskulinovou reakci. Fermentuje D-sorbitol, sacharózu a melibiózu (Davin-Regli et al., 2019).

### 3.4.2 Vliv rodu *Enterobacter* u kojenců

Některé druhy rodu *Enterobacter* představují u kojenců riziko v důsledku konzumace umělé výživy. *Enterobacter sakazakii*, který byl přeřazen do rodu *Cronobacter* je oportunní patogen představující vysoké riziko pro kojence a jedince s oslabenou imunitou, jehož původcem je především prášková kojenecká výživa (Prell & Koletzko, 2016). Bakterie rodu *Cronobacter* jsou přizpůsobeny k přežití v kojenecké výživě, do které se mohou dostat různými cestami. Jedním ze způsobů kontaminace může být přidání kontaminovaných přísad po sušení a balení, dále během manipulace nebo ze špatně vyčištěného nádobí. Významné snížení počtu buněk *Cronobacter* spp. bylo dosaženo působením mikrovln v kojeneckých lahvích. Dále přidáním kyseliny kaprylové ke kojenecké výživě byla způsobena inhibice *Cronobacter* spp. při nízkých teplotách. Dle Strydom et al. (2012) má kyselina mléčná schopnost chelatace iontů mědi, což jí umožňuje proniknout cytoplazmatickou membránou a stát se toxickou pro bakterie. Působením kyseliny mléčné (0,2 %) v kombinaci se síranem měďnatým (50 µg/ml) po dobu 6 hodin při teplotě 21 °C dochází k úplné eliminaci *Cronobacter* spp. Organizací pro potraviny a zemědělství (FAO) a Světovou zdravotnickou organizací (WHO) jsou vydány předpisy v rámci Codex Alimentarius, kterými jsou dány podmínky a správné výrobní postupy práškové kojenecké výživy. V rámci tohoto kodexu byla v roce 2008 vydána novelizace, aby

hotové práškové produkty byly speciálně testovány na *Cronobacter* spp. (Strydom et al., 2012).

### 3.4.3 Onemocnění způsobené rodem *Enterobacter* u kojenců

Druhy, které jsou zařazeny do skupiny ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter* spp.) způsobují nozokomiální infekce, zejména na jednotkách intenzivní péče, které postihují především novorozence, předčasně narozené děti, pacienty s diabetes mellitus apod. Novorozenci jsou vystaveni vysokému riziku infekce z důvodu nezralosti jejich imunitního systému (Davin-Regli et al., 2019). Dle Hernandez-Alonso et al. (2022) jsou primárním zdrojem kmenů *Enterobacter* inkubátory. Bylo provedeno testování inkubátorů v režimu „vypnuto“ a „zapnuto“ a odebráno 45 vzorků. V režimu „vypnuto“ byl *Enterobacter* spp. nalezen u 5 z 19 vzorků a v režimu „zapnuto“ byl nalezen u 20 z 26 vzorků.

*Enb. cloacae* je přítomen v normálním lidském mikrobiomu a v současné době je často objeven při systematickém odběru vzorků novorozenců. Je spojován s pooperačními případy, nozokomiální sepsí, pneumonií, infekcí močových cest a meningitidou (Davin-Regli et al., 2019). Přenášen může být špatnou hygienou nebo špatnou dezinfekcí z povrchů. Od roku 1990 se stal významným patogenem na novorozeneckých odděleních po celém světě. Na JIP jde především o přenos z kontaminovaných intravenózních tekutin, roztoků parenterální výživy a lékařského vybavení. Rozvojem gramnegativních bacilů ve střevě je způsoben útlum slizniční a systémové imunity vedoucí k rozvoji sepse. Nejrozšířenější gramnegativní bacily izolované ze střev novorozenců jsou *K. pneumoniae* a *E. coli*. *Enterobacter* spp. je zastoupen pouze z šestiny těchto gramnegativních bacilů. Nezralost imunitního systému novorozence a použití antimikrobiálních látek (cefalosporiny) mohou být příčinou infekce na JIP, jelikož podání cefalosporinů třetí generace indukuje genetické varianty *Enterobacter*  $\beta$ -laktamázy, což způsobuje nadprodukcí enzymu a rozvoj rezistence (Girlich et al., 2021).

## 3.5 Další druhy enterobakterií ve střevní mikrobiotě

Většina rodů v řádu Enterobacteriales je zařazena do čeledi *Enterobacteriaceae*, čímž je tato čeleď považována za jednu z taxonomicky nejrozmanitějších bakteriálních čeledí, které jsou v současné době uznávány. V rámci této čeledi je rozeznáno několik odlišných skupin/rodů. Mimo již zmíněný *Enterobacter* spp. a *Escherichia* spp. je do této čeledi zařazen *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Kluyvera* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Shigella* spp. a jiné druhy patřící ke gramnegativním enterobakteriím (Adeolu et al., 2016).

### 3.5.1 *Klebsiella* spp.

Kmeny rodu *Klebsiella* byly poprvé izolovány na konci 19. století a pojmenovány Trevisanem roku 1885 na počest německého mikrobiologa Edwina Klebse. Rod v současnosti zahrnuje jak druhy patřící do komplexu druhů *Klebsiella pneumoniae* (KpSC) tak další druhy (*K.*

*oxytoca* a jiné). Do roku 2022 bylo klasifikováno sedm fyloskupin patřící do komplexu druhů *K. pneumoniae* (KpSC): *K. pneumoniae* (Kp1), *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (Kp2), *K. variicola* subsp. *variicola* (Kp3), *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (Kp4), *K. variicola* subsp. *tropica* (Kp5), *K. quasivariicola* (Kp6) a *K. africana* (Kp7) (Dong et al., 2022).

K neznámějším zástupcům *Klebsiella* spp. je zařazena právě *K. pneumoniae*. Je charakterizována jako gramnegativní tyčinkovitá laktóza fermentující bakterie nacházející se na povrchu sliznic. Jako oportunní patogen je spojena s jednou třetinou všech infekcí způsobených gramnegativními organismy (zápal plic, infekce močových cest, sepe, meningitida a jiné). Ochranu před imunitním systémem hostitele si zajišťuje zevní vrstvou (kapslí). Dále je vybavena fimbriemi, kterými je zprostředkována adheze k hostitelským buňkám (Diab et al., 2024). Jsou rozlišovány fimbrie typu 1, které jsou vláknité a jsou uplatňovány v močových cestách a fimbrie typu 3, které mají tvar šroubovice a jsou důležité pro vytváření biofilmů. Bylo potvrzeno, že infekce jsou způsobeny dvěma patotypy *Klebsiella* spp.: klasickým (cKp) a hypervirulentním (hvKp). Oba patotypy jsou globálními patogeny, ale hvKp je stále častěji objevován a je schopen způsobit těžké infekce spojené s vysokou mortalitou (Dong et al., 2022).

Druhým klinicky nejrozšířenějším druhem po *K. pneumoniae* je *K. oxytoca*. Jde opět o gramnegativní anaerobní tyčinkovitou enterobakterii, která byla v roce 1886 pojmenována Fluggem jako „*Bacillus oxytocus perniciosus*.“ Poté byla v roce 1923 přejmenována na *Aerobacter oxytocom* a následně v roce 1956 na *K. oxytoca*. Je považována za oportunní patogen způsobující nozokomiální infekce u novorozenců i dospělých. U zdravých jedinců bývá v zastoupení 1,6 – 9 % ve stolici, což představuje nižší míru kolonizace než u *K. pneumoniae*. U nemocných nebo oslabených jedinců je její zastoupení vyšší, u kojenců a novorozenců na jednotkách intenzivní péče je ve stolici zastoupena okolo 25 %. *Klebsiella oxytoca* zahrnuje nejméně pět blízce příbuzných druhů, které byly dříve klasifikovány jako jeden druh: *Klebsiella grimontii*, *Klebsiella huaxiensis*, *Klebsiella michiganensis*, *Klebsiella pasteurii* a *Klebsiella spallanzanii* (Yang et al., 2021).

### 3.5.2 *Citrobacter* spp.

Rod *Citrobacter* je charakterizován fakultativně anaerobními pohyblivými gramnegativními bacily, které jsou oxidáza negativní, kataláza pozitivní, lysin dekarboxyláza negativní a využívají citrát jako jediný zdroj uhlíku. Mohou se vyskytovat jednotlivě nebo v párech a jejich pohyblivost je zajištěna peritrichózními bičíky (Chowdhry & Cohen, 2012). Z lidských klinických vzorků jsou nejčastěji izolovány *Citrobacter koseri*, *C. freundii*, *C. youngae*, *C. braakii* a *C. amalonaticus*. V životním prostředí lze nalézt ve vodě, půdě, potravinách a jako kolonizátory gastrointestinálního traktu. Jsou považovány za původce infekcí močových cest, krevního řečiště a centrálního nervového systému. U dětí je *C. koseri* příčinou meningitidy a mozkového abscesu, především v novorozeneckém a kojeneckém období (Samonis et al., 2008). Hematologická vyšetření jsou prevencí pro rozvoj meningitidy. V případě infekce vykazují kojenci vysoké procento hemokultur (Chowdhry & Cohen, 2012).

### 3.5.3 Ostatní druhy enterobakterií

K dalším zástupcům enterobakterií je zařazena *Kluyvera* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp. a *Shigella* spp. *Kluyvera* spp. je rod charakteristický malými tyčinkovitými bakteriemi, odpovídající obecné definici *Enterobacteriaceae*. Rod je složen z 5 hlavních druhů: *Kl. ascorbata*, *Kl. cryocrescens*, *Kl. georgiana*, *Kl. intermedia* a *Kl. sichuanensis* (Yu et al., 2023). *Salmonella* spp. je považována za hlavní patogen lidí a zvířat. U kojenců je významným druhem *Salmonella enterica*, která je původce infekcí z práškové kojenecké výživy (Angulo et al., 2008). *Proteus* spp. je vyznačován fenylalanindeaminázovou aktivitou a mezi jeho dva významné druhy se řadí *Proteus mirabilis* a *P. vulgaris*. Tyto druhy byly poprvé popsány v roce 1885 a na základě jejich schopnosti zkapalňovat želatinu rozděleny. *P. vulgaris* je schopen zkapalňovat želatinu rychle a *P. mirabilis* pomaleji. Později byly tyto druhy rozlišovány na základě jejich biochemických vlastností. *P. vulgaris* je charakterizován fermentací glukózy, sacharózy a maltózy. *P. mirabilis* je schopen fermentovat glukózu, pomalu i sacharózu, ale ne maltózu (O'Hara et al., 2000). Oba druhy jsou schopné produkovat sirovodík a množit se na neinhibičním agarovém médiu. *P. mirabilis* je pozitivní na ornitin a negativní na produkci indolu. *P. vulgaris* je negativní na ornitin a pozitivní na indol. *P. mirabilis* je považován za třetího nejčastějšího původce infekce močových cest v dětském věku po bakteriích *E. coli* a *Klebsiella* spp. Enzym ureáza, který je produkován *P. mirabilis* a jeho příbuznými bakteriemi je schopen rozkládat močovinu na amoniak. Tato reakce zvyšuje pH moči, amoniak reaguje s hořčíkem a fosfátem a je vytvořeno prostředí pro růst bakterií způsobující následnou infekci (Barson & Antonara, 2018).

Genotypově a fenotypově příbuzný rod od *E. coli* je rod *Shigella*. Tento rod je považován za invazivní bakteriální patogeny, které představují fakultativně anaerobní nesorotvorné tyčinkovité nepohyblivé a gramnegativní bakterie. Od *E. coli* je lze odlišit nižší aktivitou ve využití sacharidů, neschopností fermentovat laktózu, nepohyblivostí a negativní reakcí na lysin dekarboxylázu. Jsou považovány za nejstarší specifické patogeny a v roce 1888 byly izolovány ze vzorků stolice odebrané od pacientů s akutní úplavicí. V roce 1898 byly Kiyoshi Shigem identifikovány jako hlavní původci lidské úplavice. Později bylo pomocí genetických metod identifikováno a klasifikováno více než 46 sérotypů této bakterie. Na základě rozdílů v biochemických reakcích a O antigenu lipopolysacharidu byly identifikovány čtyři druhové podskupiny (*Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* a *S. sonnei*). Shigelóza je nakažlivé infekční onemocnění způsobené různými druhy *Shigelly* konzumací kontaminovaných potravin a vody. Výskyt této nemoci může být u všech věkových kategorií, ale nejvíce postihuje děti mladší 5 let. K přenosu této bakterie z člověka na člověka může docházet i fekálně-orální cestou při epidemiích přenášených potravinami a vodou. Klinické příznaky se mohou lišit od mírného průjmu způsobeného *S. sonnei* až po úplavici (bolestivá krvavá stolice s příměsí slizu) způsobenou *S. dysenteriae*. *S. dysenteriae* jsou způsobena závažnější a smrtelnější onemocnění (Pakbin et al., 2023).

Mimo již zmíněnou čeleď *Enterobacteriaceae* jsou do řádu Enterobacteriales zařazeny další dvě čeledi: *Morganellaceae* a *Yersiniaceae*. Do čeledi *Morganellaceae* je zařazen hlavní typový rod *Morganella*. Tyto bakterie jsou oxidáza negativní, arginin dekarboxyláza negativní

a indol pozitivní. Do čeledi *Yersiniaceae* je zařazen hlavní typový rod *Yersinia*, ale významným zástupcem je také *Serratia* spp. Tyto bakterie jsou pohyblivé, kataláza pozitivní a neschopné produkovat sirovodík (Adeolu et al., 2016).

### 3.6 Další druhy související s prací

#### 3.6.1 *Enterococcus* spp.

*Enterococcus* spp. jsou zařazeny ke grampozitivním bakteriím, které bývají izolovány z půdy a vody, také jsou přítomné ve fermentovaných výrobcích, dále jako součást střevní mikrobioty a původci onemocnění. Termín „entérocoque“ byl poprvé použit Thiercelinem v roce 1899, kterým byly popsány jako střevní komenzální bakterie mající schopnost stát se patogenními. Vzhledem k morfologickým a biochemickým vlastnostem byly enterokoky považovány za součást rodu *Streptococcus* a do poloviny 80. let 20. století klasifikovány jako streptokoky skupiny D. V roce 1970 byl navržen vlastní rod *Enterococcus*, aby takzvané enterické streptokoky byly zařazeny do vlastního rodu. Teprve v roce 1984 se formální návrh rodu *Enterococcus* stal jako řádně uznaný rod oddělený od streptokoků v „Bergeyho příručce systematické bakteriologie.“ Čeleď *Enterococcaceae* byla poprvé navržena Ludwigem et al. (2009) na základě podobnosti genu 16S rRNA a původně zahrnovala *Enterococcus* spp., *Vagococcus* spp., *Tetragenococcus* spp. a *Melissococcus* spp. Enterokoky jsou definovány jako bakterie netvořící spory, které existují jednotlivě nebo jako páry, řetězce nebo skupiny. Jsou to chemoorganotrofní fakultativní anaeroby s homofermentativním metabolismem, kyselinou mléčnou jako převládajícím konečným produktem fermentace sacharidů. Většina enterokoků je negativní na oxidázu a katalázu, tolerantní k soli, rezistentní k žluči, vykazuje hydrolýzu na aeskulin a jsou schopny růst v přítomnosti azidu sodného (García-Solache & Rice, 2019).

### 3.7 Interakce enterobakterií s komenzály střevní mikrobioty kojence s probiotickým potenciálem

Probiotické látky jsou často používány pro snížení počtu antimikrobiálních rezistentních bakterií, prostřednictvím změn v mikrobiotě a sekrece antimikrobiálních proteinů. Jsou zařazeny do výživy jako perorální doplňky pro kojence k potlačení potencionálních střevních patogenních enterobakterií, kdy významný pozitivní vliv vykazují především probiotické směsi (Hung et al., 2021). Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které pokud jsou podávány v adekvátním množství, vykazují příznivý vliv na lidské zdraví. Dle definice WHO nejsou endogenní bakterie střevního traktu považovány za probiotika, pokud nejsou izolovány, kultivovány a následně podány hostiteli (nejčastěji perorálně) (Kleerebezem et al., 2010). U dospělých lze patogenní enterobakterie pouze snížit, ale ne zcela odstranit, na rozdíl od kojenců. K hlavním probiotickým funkcím je zařazen právě antagonismus s oportunními patogeny, zlepšení trávení, podpora zrání imunitního systému v raných fázích života, zachování imunitní homeostázy v průběhu života, produkce vitamínů a dalších prospěšných

látek. Mezi nejběžnější probiotika jsou zařazeny *Bifidobacterium* spp. a *Lactobacillus* spp. (Hung et al., 2021).

### 3.7.1 Bifidobakterie

Jak již bylo zmíněno v kapitole č. 3.1.2 Vývoj a složení mikrobioty kojence, HMO jsou považovány za prebiotické sloučeniny (látky podporující růst komenzálních bakterií), díky schopnosti aktivní stimulace růstu střevních mikrobioty kojence. Někdy je účinek HMO označován jako „bifidogenní“, protože specificky podporují růst bifidobakterií, ale pouze některých taxonů. HMO jako zdroj uhlíku využívají *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* a částečně některé další bifidobakterie spojené s mikrobiotou kojence (*B. breve*, *B. bifidum*). Významně přispívají k metabolismu kojence prostřednictvím degradace glykanů. *B. longum* subsp. *infantis*, původně izolovaný z kojeneho dítěte, obsahuje geny, kterými jsou kódovány enzymy podílející se na degradaci (fukosidáza, sialidáza,  $\beta$ -hexosaminidáza a  $\beta$ -galaktosidáza) a internalizaci (extracelulární proteiny, permeázy) HMO. Kdežto *B. adolescentis*, vyskytující se v mikrobiotě dospělých, nemá schopnost využívat základní struktury HMO. Bifidobakterie se ve velkém množství vyskytují v tlustém střevě, oproti tomu v dutině ústní jsou v nižších koncentracích. Poprvé byly izolovány z výkalů kojeneho dítěte v roce 1899, kdy je Tissier klasifikoval jako samostatný rod *Bifidobacterium*, patřící do kmene Actinobacteria. Do roku 2017 bylo do tohoto rodu zařazeno kolem 59 taxonů, z nichž některé z nich byly izolovány ze vzorků stolice lidského střeva (Lugli et al., 2017), v současné době jich je přes 130 (bacterio.net).

Dle provedených studií Milani et al. (2017) bylo potvrzeno, že bifidobakterie jsou schopny kódovat exopolysacharidy spojené s buněčným povrchem (EBP). Tyto exopolysacharidy jsou sacharidové polymery sloužící jako extracelulární vrstva k pokrytí povrchů gram pozitivních mikroorganismů. EBP mohou vykazovat dvě funkce: bakteriální (faktor virulence u konkrétních onemocnění) nebo s pozitivním účinkem na lidské zdraví. EBP syntetizované bifidobakteriemi jsou složeny z monosacharidů (D-glukóza, D-galaktóza a L-ramnóza) a jsou označovány jako heteropolysacharidy. Bylo také prokázáno, že EBP, které jsou produkovány *B. longum* mají schopnost modulovat imunitní odpověď, tím že tlumí prozánětlivé reakce. Další klíčovou interakcí bifidobakterií s hostitelem jsou pili/fimbrie. U rodu *Bifidobacterium* byly popsány dva různé typy: pili s těsnou adherencí a pili závislé na sortáze. Pilami s těsnou adherencí je zprostředkována kolonizace hostitele bifidobakteriemi. Pilami závislými na sortáze je podporována adheze bifidobakteriálních buněk k enterocytům prostřednictvím proteinů extracelulární matrice a také interakce s imunitním systémem. Neonatální imunitní systém je nevyvinutý a podněty vyvolané bifidobakteriálními pili mohou být zásadní pro další vývoj imunity. Do interakce mezi bifidobakteriemi a hostitelem je zapojen také inhibitor serinové proteázy (serpin). Bifidobakteriální serpiny jsou použity jako inhibitory neutrofilů a pankreatických elastáz. Geny, kterými je kódován serpin u bifidobakterií jsou přítomny pouze u *B. breve*, *B. longum* a *B. dentium* (Hidalgo-Cantabrana et al., 2014).

Dle Hung et al. (2021) bylo provedeno několik studií porovnávající účinky podání *Bifidobacterium* spp. Do dvojité zaslepené, placebem kontrolované randomizované klinické

studie bylo zařazeno 69 předčasně narozených dětí, kterým bylo suplementováno *B. lactis*, což vedlo ke snížení počtu životaschopných enterobakterií. Stejně tak tomu bylo u 21 novorozenců, u kterých byly provedeny operace vrozených srdečních vad a bylo jim podáno *B. breve*. V další randomizované studii s 300 zdravými novorozenci byl příjem *B. longum* subsp. *longum* spojen s vyšším počtem bifidobakterií oproti enterobakteriím, obdobně tomu bylo u podání *B. longum* subsp. *infantis*. Předčasně narozené děti jsou více náchylné ke střevním infekcím a je proto žádoucí zařadit probiotické doplňky k možnému potlačení patogenní kolonizace střeva enterobakteriemi. U kojenců je tento pozitivní výsledek vysvětlen jednoduchým mikrobiomem, menším zasažením do chronických onemocnění a předchozí antimikrobiální expozicí (Hung et al., 2021).

Hlavní prebiotika používaná v kojenecké výživě jsou GOS (galakto-oligosacharidy), FOS (frukto-oligosacharidy) a polydextróza. Přídavek GOS nebo směsi GOS/FOS má pozitivní vliv na množství bifidobakterií. Také bylo potvrzeno, že samotný GOS zvyšuje hladinu laktobacilů (Roberfroid et al., 2010). V posledních letech je stále více do dětských kojeneckých výživ přidávána 2-FL (2-fukosyllaktóza). Další studií bylo prokázáno její využití kojeneckými bifidobakteriemi jako jsou *B. longum* subsp. *infantis*, *B. kashiwanohense* a *B. breve*. 2-FL je oligosacharid nacházející se v mateřském mléce a je důležitý z hlediska vývoje střevní mikrobioty kojenců. *B. longum* a *B. kashiwanohense* jsou schopny metabolizovat 2-fukosyllaktózu a L-fukózu. Metabolismus těchto látek vede k produkci kyseliny mléčné a dalších organických kyselin, které jsou důležité pro zdraví střev (Bunešová et al., 2016).

### 3.7.2 Laktobacily

Rod *Lactobacillus* patřící do kmene Firmicutes je kolonizován v lidské střevní mikrobiotě brzy po porodu. Jedná se o grampozitivní fakultativně anaerobní mikroorganismy s nízkým obsahem G + C, neschopné tvořit spory. Produkce kyseliny mléčné jako hlavního konečného produktu je způsobena v důsledku schopnosti laktobacilů fermentace rafinovaných cukrů (na rozdíl od bifidobakterií, které jsou především producenty mastných kyselin s krátkým řetězcem – SCFA). Ochranná funkce kyseliny mléčné přispívá ke snížení pH a je vytvořeno nevyhovující prostředí pro patogenní bakterie (Vlasova et al., 2016). Dle fermentačních charakteristik jsou laktobacily rozděleny do tří skupin: obligátně homofermentativní, fakultativně heterofermentativní a obligátně heterofermentativní (Kleerebezem et al., 2010). Komerční použití laktobacilů v roli probiotik je rozšířené v důsledku průmyslového kvašení, včetně fermentovaných výrobků (Vlasova et al., 2016).

*Limosilactobacillus* (syn. *Lactobacillus*) *reuteri* je heterofermentativní bakterie mléčného kvašení používaná jako probiotikum nebo startovací kultura v potravinách a jiných výrobcích. V přítomnosti glycerolu je *L. reuteri* schopen syntetizovat 3-hydroxypropionaldehyd (3-HPA). 3-HPA je vylučován do prostředí a vzniká reuterin. Reuterin je považován za antimikrobiální činidlo účinné proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím a pokud je k dispozici dostatečné množství glycerolu jako produktu luminální mikrobiální fermentace, může dojít prostřednictvím metabolismu *L. reuteri* k jeho aktivní syntéze v tlustém střevě. *In vitro* bývá reuterin syntetizován za pH, teploty a anaerobních



podmínek, podobných těm, jaké má gastrointestinální trakt. K fyzikálně-chemickým vlastnostem reuterinu je zařazena jeho rozpustnost ve vodě a odolnost vůči proteolytickým a lipolytickým enzymům (Cleusix et al., 2007).

Dle Hung et al. (2021) byly opět provedeny studie na účinnost působení laktobacilů proti enterobakteriím. Hospitalizovaným kojencům byl podán *L. reuteri*, kdy výsledkem byla nižší kolonizace průměrné *E. coli*. U dětí s velmi nízkou porodní hmotností vedla suplementace *L. reuteri* po dobu jednoho týdne k nižšímu výskytu enterobakterií a stafylokoků. Ne u všech studií je však tento pozitivní účinek potvrzen. Ve dvojité zaslepené randomizované kontrolní studii, do které bylo zahrnuto 21 předčasně narozených dětí krmených z lahve, byl podán *Lacticaseibacillus* (syn. *Lactobacillus*) *ramnosus* a nebylo prokázáno snížení počtu enterobakterií, zvýšený přírůstek hmotnosti ani zkrácená doba hospitalizace oproti 26 kontrolních kojenců (Hung et al., 2021). Oproti tomu byla však zavedena probiotická terapie v těhotenství, kdy byl ženám podán *L. rhamnosus* a byla potvrzena jeho kolonizace v dětském střevě a zvýšené množství bifidobakterií u porozených dětí (Gueimonde et al., 2006).

Výsledkem mnoha studií bylo potvrzení, že předčasně narozené děti jsou vystaveny vysokému riziku rozvoje střevních infekcí v důsledku imunitní nezralosti, antibiotické léčby a opožděné mikrobiální kolonizaci. Perorální probiotika složená z bifidobakterií, laktobacilů nebo *Saccharomyces boulardii*, nebo kombinací různých bifidobakterií se *Streptococcus thermophilus*, může docházet ke snížení rozvoje mnoha onemocnění (Luoto et al., 2014).

## 4 Metodika

Experimentální část diplomové práce se zabývá identifikací a charakterizací vybraných kmenů enterobakterií prostřednictvím různých fenotypových a genotypových metod. Jedná se o metody jako MALDI-TOF MS, sloužící k ověření identity testovaných kultur, dále pak genotypovou fingerprintovou metodu REP-PCR. Z fenotypových metod se jedná o testování hemolytické aktivity,  $\beta$ -glukoronidázové aktivity, produkce indolu,  $\beta$ -glukosidázové aktivity a peroxidázy. Testována byla také jejich interakce (antimikrobiální aktivita) navzájem a s dalšími komenzály. V rámci testování antimikrobiální aktivity byla použita agarová difúzní metoda.

### 4.1 Materiál a metody

K testování byla použita kolekce enterobakterií izolovaných z kojenců, kterou zajistila Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, ČZU v Praze. K dispozici bylo 63 izolátů (52 enterobakterií a 11 enterokoků), které byly izolovány ze stolice kojenců bez zjevných zdravotních obtíží a všichni kojenci byli narozeni v řádném termínu. Vzorky pocházejí z různých experimentů, odběry a následné zpracování vzorků proběhlo podle metodiky schválené Etickou komisí ČZU s referenčním číslem 06/2022. Všechny izoláty byly původně izolované ze stolice kojenců pomocí TBX agaru. Přestože *Enterococcus* spp. nepatří mezi enterobakterie, tak jsou často společně detekovány na uvedeném médiu, tudíž jsou součástí kolekce. K jednotlivým kmenům byly přiděleny kódy pro jednodušší zapsání výsledků. Přehled testovaných izolátů s přidělenými kódy je uveden v **tabulce 1**, bakterie rodu *Enterococcus*, případně *Enterobacter* spp., který byl po testování identifikován jako *Enterococcus* spp. jsou zde modře zvýrazněny.

Antimikrobiální aktivita vybraných probiotických kmenů vůči enterobakteriím byla testována pouze u 32 kmenů z prezentovaných 63 a v **tabulce 1** jsou vyznačeny tučně.

**Tabulka 1:** Seznam testovaných izolátů izolovaných z kojenců

	KÓD	PŮVODNÍ OZNAČENÍ KMENE	MALDI-TOF MS (původní izolát)	skóre
1	B23	TBX 69/2	<i>Acinetobacter ursingii</i>	ND
2	X7	TBX 2/5	<b><i>Citrobacter amalonauticus</i></b>	2,25
3	X21	TBX 9/5	<i>Citrobacter braakii</i>	2,25
4	B66	TBX 80/2	<i>Citrobacter braakii</i>	ND
5	X12	TBX 5/6	<b><i>Citrobacter freundii</i></b>	2,23
6	X26	TBX OK 3	<i>Citrobacter freundii</i>	ND
7	X29	TBX OK 3	<i>Citrobacter freundii</i>	ND
8	B21	TBX 69/2	<b><i>Citrobacter freundii</i></b>	ND
9	B65	TBX 80/3	<b><i>Citrobacter freundii</i></b>	ND
10	X14	TBX 6/7	<i>Cronobacter sp.</i>	1,84
11	B68	TBX 83/3	<b><i>Enterobacter asubriae</i></b>	ND
12	B1	TBX 9/3a	<b><i>Enterobacter cloacae</i></b>	ND
13	B5	TBX 10/4a	<b><i>Enterobacter cloacae</i></b>	ND
14	B51	TBX 5/4	<b><i>Enterobacter cloacae</i></b>	ND
15	B52	TBX 6/2a	<b><i>Enterobacter cloacae</i></b>	ND
16	B69	TBX 83/3	<b><i>Enterobacter kobei</i></b>	ND
17	B64	TBX 68/4	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	ND
18	B42	TBX 75/2	<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>	ND
19	X9	TBX 2/4	<b><i>Enterococcus durans</i></b>	2,23
20	X1	TBX 1/5	<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>	ND
21	X2	TBX 1/5	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,04
22	X17	TBX 7/4	<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>	2,05
23	X28	TBX OK 3 (3/3)	<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>	ND
24	B55	TBX 9/5	<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>	ND
25	B56	TBX 12/6	<i>Enterococcus faecalis</i>	ND
26	B19	TBX 69/2	<i>Enterococcus faecium</i>	ND
27	X3	TBX 1/4	<i>Escherichia coli</i>	2,22
28	X4	TBX 1/4	<b><i>Escherichia coli</i></b>	2,41
29	X5	TBX 2/6	<b><i>Escherichia coli</i></b>	2,41
30	X6	TBX 2/5	<b><i>Escherichia coli</i></b>	2,35
31	X8	TBX 2/4	<i>Escherichia coli</i>	2,32
32	X10	TBX 3/6	<i>Escherichia coli</i>	2,09
33	X11	TBX 4/6	<b><i>Escherichia coli</i></b>	2,28
34	X13	TBX 6/8	<i>Escherichia coli</i>	2,26
35	X16	TBX 6/7	<i>Escherichia coli</i>	2,35
36	X20	TBX 8/5	<b><i>Escherichia coli</i></b>	2,36
37	X23	TBX 23 (10)	<i>Escherichia coli</i>	ND
38	X24	TBX 26 (11)	<b><i>Escherichia coli</i></b>	ND
39	X27	TBX OK3	<b><i>Escherichia coli</i></b>	ND

40	B11	TBX 44/4	<i>Escherichia coli</i>	ND
41	B12	TBX 51/4	<i>Escherichia coli</i>	ND
42	B14	TBX 51/4	<i>Escherichia coli</i>	ND
43	B15	TBX 52/3	<i>Escherichia coli</i>	ND
44	B27	TBX 70/2	<i>Escherichia coli</i>	ND
45	B28	TBX 70/2	<i>Escherichia coli</i>	ND
46	B34	TBX 71/4	<i>Escherichia coli</i>	ND
47	B35	TBX 72/2	<i>Escherichia coli</i>	ND
48	B45	TBX 76/4	<i>Escherichia coli</i>	ND
49	B46	TBX 76/4	<i>Escherichia coli</i>	ND
50	B49	TBX 79	<i>Escherichia coli</i>	ND
51	B50	TBX 79	<i>Escherichia coli</i>	ND
52	X18	TBX 7/3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,24
53	X25	TBX OK 3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ND
54	B59	TBX 16/4	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ND
55	B67	TBX 83/4	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ND
56	B7	TBX 44/2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ND
57	B32	TBX 71/2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ND
58	B70	TBX 86/2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ND
59	X19	TBX 8/4	<i>Klebsiella variicola</i>	2,19
60	X22	TBX 9/5	<i>Klebsiella variicola</i>	2,21
61	B38	TBX 73/3	<i>Morganella morganii</i>	ND
62	X15	TBX 6/7	<i>Phytobacter ursingii</i>	1,98
63	B22	TBX 69/2	<i>Serratia marcescens</i>	ND

Vysvětlivky k **tabulce 1:**

ND = nejsou data

#### 4.1.1 Příprava bakteriálních kultur

V rámci této práce byly provedeny různé testy a podle toho byla volena média. Nicméně při prvotní kontrole identity a čistoty původních zamražených kultur ve sbírce byl použit WSP bujón, což je Wilkins-Chalgren bujón (33 g/l) doplněný o sójový pepton (5 g/l), cystein (0,5 g/l, vše Oxoid) a Tween 80 (1 ml/l, Sigma Aldrich).

Po smíchání a rozpuštění příslušných ingrediencí pomocí zahřívání, byl bujón nadávkován do zkumavek, které byly nejprve zahřívány a poté probublány směsí plynů, tak aby bylo vytvořeno anaerobní prostředí. Zkumavky byly sterilovány v autoklávu (Tuttnauer 2840EL, Schoeller) na program tekutiny a poté vychlazeny na pokojovou teplotu. Enterobakterie byly přeočkovány pomocí injekčních stříkaček (0,3 ml kultury do 9 ml bujónu) do těchto zkumavek s WSP bujónem a byly kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

Pro další testování se poté používala kultura narostlá na takto modifikovaném Wilkins-Chalgren agaru, zde je dávka agaru (43 g/l), dávkování ostatních ingrediencí je stejné. Nebo byly použity kolonie z krevního agaru (popsáno níže).

Obecně byly agary připravovány následujícím postupem. Do připravených nadepsaných baněk byla nalita destilovaná voda. Poté bylo do každé naváženo příslušné množství média, zakryto alobalem a lehce promícháno. Baňky byly vloženy do Papinova hrnce s vodou a sterilovány po dobu 60 minut, čemuž předcházelo natlakování hrnce a poté zchlazení. Po uplynutí času byla vypuštěna zbývající pára a až poté byly baňky vyndány z hrnce. Baňky s médiem se nechaly vytemperovat přibližně hodinu při 55 °C ve vodní lázni. Malé Petriho misky byly nadepsány kódy bakterií (X1, X2, ...). Množství agarů určené na jednu malou Petriho misku je 5 ml, tudíž před přípravou média bylo spočítáno množství agarů odpovídající počtu kmenů, se kterými bylo plánováno pracovat. Zkontrolovaná kultura narostlá ve WSP bujónu byla inokulační kličkou aplikována a rozetřena na již ztuhlý agar a následně kultivována při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin za aerobních podmínek. Druhý den byly naočkované misky vyndány z termostatu a použity k dalším testům a úkonům.

#### **4.1.2 Kontrola čistoty popis morfologie**

Pomocí fázového kontrastního mikroskopu (Nikon Eclipse E 200LED MV RS, Japonsko) při zvětšení 400x byla zkontrolována čistota a morfologie jednotlivých kultur. Kapka kultury z kultivovaného bujónu byla přenesena pomocí injekční stříkačky na podložní sklíčko a zakryta krycím sklíčkem. Poté byl proveden popis morfologie a kontrola čistoty.

#### **4.1.3 Ověření identity testovaných kultur pomocí MALDI-TOF MS**

Připravené mikrozkušavky Eppendorf o objemu 1,5 ml byly nadepsány kódy kmenů. Stůl byl olihován 70% etanolem a byl zapnut kahan. Z čerstvě narostlých kultur ve WSP bujónu, které byly 24 h v 37 °C v termostatu, byl odebrán asepticky 1 ml kultury pomocí injekční stříkačky do mikrozkušavky Eppendorf. Při identifikaci metodou MALDI-TOF MS bylo postupováno dle instrukcí výrobce (Bruker Daltonik GmbH, Německo). Přenesená kultura byla stočena na centrifuze po dobu 2 min při otáčkách 14 550/min. Poté byl slit supernatant do předem připravené kádinky. Automatickou pipetou bylo odebráno 500 µl 70% etanolu a resuspendováno s peletou, která zbyla na dně v Eppendorf mikrozkušavce. Následně byly zkušavky opět vloženy do centrifugy a stočeny za předchozích podmínek, etanol byl slit. Poté se zbývající etanol nechal za pokojové teploty po dobu 10 minut vytékat. Následně bylo přidáno 15 µl 70% kyseliny mravenčí (Honeywell FlukaTM, USA) a 15 µl acetonitrilu (Sigma-Aldrich) a pomocí automatické pipety zhomogenizováno. Eppendorf mikrozkušavky byly opět vloženy do centrifugy a stočeny za předchozích podmínek. Do MALDI tabulky byly zaznamenány kódy bakterií. Pomocí automatické pipety byl odebrán 1 µl supernatantu ve dvou kopiích a nanesen na MALDI destičku dle připraveného seznamu. Po zaschnutí byl na každý spot pipetován 1 µl matrixu. Destička se nechala zaschnout. Vzorky byly poté připraveny na samotné měření pomocí přístroje MALDI-TOF MS a vyhodnocení Bruker Biotyper softwarem.

Vyhodnocení výsledků bylo provedeno na základě podobnosti známých a neznámých spekter a údajů zaznamenaných v MALDI databázi. Výsledkem bylo skóre od 0-3 (nulová až dokonalá podobnost). Skóre se rozděluje do tří intervalů podle identifikace na úrovni druhu

s vysokou mírou jistoty (označená zelenou barvou) v rozmezí hodnot 2,00-3,00; na úrovni rodu s nízkou mírou jistoty (označená žlutou barvou) v rozmezí hodnot 1,7-1,99 a v případě, že nelze provést identifikaci (označená červenou barvou) je rozmezí hodnot 0,00-1,69.

#### 4.1.3.1 Detekce enzymu $\beta$ -glukuronidázy na chromogenním TBX agaru

TBX médium je založeno na tryptonovém žlučovém agaru (CM0595). Tryptonový žlučový agar byl původně vytvořen tak, aby zlepšil dřívější metody používané k detekci *E. coli* v potravinách, z hlediska rychlosti, spolehlivosti, lepší regeneraci ze zmrazených vzorků a detekci špatných fermentorů laktózy (Anderson & Baird-Parker, 1975).

TBX médium, kterému je přidáno chromogenní činidlo X-glukuronidu detekuje aktivitu glukuronidázy. Jedná se o stejný enzym detekovaný reagentem MUG7 a ukázalo se, že je vysoce specifický pro *E. coli*. Přibližně 3–4 % *E. coli* jsou však glukuronidáza negativní, především kmeny *E. coli* O1579 (Ratnam et al., 1988).

Většina kmenů *E. coli* může být odlišena od jiných koliformních bakterií přítomností enzymu glukuronidázy. Chromogen v médiu TBX je 5-brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-glukuronid (X-glukuronid) a je cílen tímto enzymem. Buňky *E. coli* jsou schopny absorbovat tento komplex neporušený a intracelulární glukuronidáza štěpí vazbu mezi chromoforem a glukuronidem. Uvolněný chromofor je zbarven a hromadí se v buňkách, což způsobuje, že kolonie *E. coli* jsou zbarveny modře/zeleně (Ratnam et al., 1988).

#### 4.1.4 Hemolytická aktivita

Pro testování hemolytické aktivity byl připraven Columbia krevní agar, který je složen z 23 g proteázového peptonu, 5 g kvasničného extraktu, 5 g chloridu sodného, 1 g kukuřičného škrobu a 15,6 g agaru (vše Oxoid), ke kterému bylo přidáno 20 ml defibrinované ovčí krve (Oxoid). Účelem použití kukuřičného škrobu je absorbce toxických vedlejších produktů obsažených ve vzorku a zdroj energie pro organismy obsahující alfa amylázy. Ke zjištění hemolytických reakcí byla použita ovčí krev, dodávající faktor X (hem) – pro růst patogenních kmenů. Krevní agar byl opět aplikován (5 ml) na malé Petriho misky a po ztuhnutí byl inokulován testovanou kulturou. Pomocí inokulační kličky byla odebraná kolonie z WSP agaru rozetřena po krevním agaru (Columbia agar, Oxoid). Kultury se nechaly kultivovat při 37 °C 24 hodin za aerobních podmínek. Druhý den byl proveden odečet a sledována změna zbarvení (hemolytická aktivita), v případě pozitivní reakce došlo k rozkladu erytrocytů, v případě negativní reakce nedošlo k žádným změnám. Typická morfologie kolonií izolovaných druhů je uvedena v **tabulce 2** (Becton Dickinson GmbH, 2013).

**Tabulka 2:** Typická morfologie kolonií často izolovaných druhů na agaru Columbia Agar s 5% ovčí krví

DRUH	MORFOLOGIE
<b>Streptokoky (jiná než skupina D)</b>	Malé, šedobílé, beta nebo alfa hemolýza.
<b>Enterokoky (skupina D)</b>	Malá, ale větší než streptokoky skupiny A, šedavé barvy. Alfa hemolýza.
<b>Stafylokok</b>	Velké, bílé až šedé nebo smetanové až žluté, s hemolýzou/ bez.
<b><i>Corynebacteria</i></b>	Malé až velké, bílé až šedé nebo žluté, s hemolýzou/ bez.
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	Malé až středně velké, šedavé, se slabou beta hemolýzou.
<b><i>Enterobacteriaceae</i></b>	Střední až velké, šedé kolonie, s hemolýzou/ bez.
<b><i>Candida spp.</i></b>	Malé, bílé.

#### 4.1.5 Katalázový test

Katalázový test je určen pro rozlišení bakterií, které mají/nemají přítomný enzym katalázu. Schopností katalázy je rozklad peroxidu vodíku na kyslík a vodu. Na podložní sklíčko byla aplikována kapka 3% peroxidu vodíku a pomocí inokulační kličky rozetřena narostlá kolonie z krevního agaru a sledovala se vzniklá reakce. V případě pozitivní reakce, tedy přítomnosti enzymu katalázy došlo k tvorbě bublinek O<sub>2</sub> (rozkladu peroxidu vodíku na kyslík a vodu). Pokud nedošlo k tvorbě bublinek, jednalo se o negativní reakci.

#### 4.1.6 COLI TEST

COLI test je určen pro rychlou identifikaci kmenů *E. coli*, na základě aktivity  $\beta$ -glukuronidázy a tvorby indolu. Je doporučen Národní referenční laboratoří SZÚ-CEM (Státní zdravotní ústav – Laboratoře Centra epidemiologie a mikrobiologie) pro *Escherichia coli* a *Shigella* spp. Principem je vložení proužku z balení COLI testu do suspenze testovaného kmene ve fyziologickém roztoku a inkubace v termostatu. Substance z proužku jsou uvolněny do suspenze. Substrát pro detekci aktivity  $\beta$ -glukuronidázy se nazývá 4-methyl-umbelliferyl- $\beta$ -D-glukuronid. V přítomnosti  $\beta$ -glukuronidázy je hydrolyzován a uvolňuje se 4-metyumbelliferon, který způsobuje pod zdrojem UV záření modrou fluorescenci. Substrát pro reakci tvorby indolu se nazývá L-tryptofan. Indol je detekován reakcí s p-dimethylaminobenzaldehydem a pozitivní reakce se projeví červeným zbarvením. Optimální skladovací teplota pro skladování COLI testu je od 2-8 °C (Erba Lachema s.r.o., 2019).

Z čisté kultury byla připravena suspenze v 500  $\mu$ l fyziologického roztoku. Automatickou pipetou byl resuspendován fyziologický roztok s bakteriální kulturou (narostlou na krevním agaru nebo WSP agaru), poté byl vložen COLI papírek. Použili jsme hustou suspenzi (3. stupeň McFarlandovy zákalové stupnice). Eppendorf mikroskopavky s COLI papírkem byly vloženy na hodinu do termostatu (37 °C). Po uplynutí času byla nejdříve vyhodnocena aktivita  $\beta$ -glukuronidázy v temné místnosti za použití UV lampy o vlnové délce cca 360 nm. Pozitivní

reakce se projevila vznikem modré fluorescence. Pozitivní reakce testu tvorby indolu se projevila po přidání 4-5 kapek činidla, vznikem červeného nebo růžového zbarvení (Erba Lachema s.r.o., 2019).

#### 4.1.7 Žluč-aeskulinový agar – nárůst kolonií a hydrolýza

Pro přípravu žluč-aeskulinového agaru bylo použito 14 g bakteriofágového peptonu (Oxoid), 15 g žlučové soli (Sigma-Aldrich), 0,5 g citrátu železitého (Oxoid), 1 g aeskulinu (Oxoid) a 15 g agaru (Oxoid). Hlavním důvodem použití žluč-aeskulinového agaru je rozlišení mezi enterokoky/ streptokoky skupiny D a streptokoky bez skupiny D. Enterokoky/streptokoky skupiny D hydrolyzují aeskulin za vzniku aesculetinu a dextrózy. Aesculetin je v médiu spojen s citrátem železitým za vzniku tmavě hnědého nebo černého komplexu, který znázorňuje pozitivní reakci. Žlučové soli inhibují grampozitivní bakterie vyjma enterokoků/streptokoků skupiny D. Do Petriho misky bylo pomocí skleněné pipety s balónkem napipetováno 5 ml žluč-aeskulinového agaru a necháno do druhého dne při pokojové teplotě. Druhý den byla pomocí inokulační kličky rozetřena na každou misku kolonie a poté byly v termostatu (37 °C) kultivovány po dobu 24 h.

#### 4.1.8 REP-PCR

Základem pro opakovanou extragenní palindromickou sekvenci (REP) - polymerázovou řetězovou reakci (PCR) je izolace DNA ze zkoumaného vzorku. Nejprve byl odebrán 1 ml kultury do 1,5 ml Eppendorf zkumavky a vložen do centrifugy po dobu 2 a půl minuty při 14 550 otáček/min. Zbývá peleta byla resuspendována ve 100 µl PrepMan Ultra™ roztoku (Applied Biosystems, USA). Vzniklá suspenze byla poté zahřáta při teplotě 100 °C v termostatu po dobu 10 minut. Za pokojové teploty se nechala zchladnout a byla vložena a stočena opět na centrifuze za předchozích podmínek. Pomocí automatické pipety byl pipetován supernatant do sterilní zkumavky. Vyizolovaná DNA byla připravena pro REP-PCR reakci. PCR směs byla připravena z: Master mixu DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) v množství 12,5 µl (Thermo Fisher Scientific) obsahující směs nukleotidů, reakční pufr a Taq DNA polymerázu, 10,5 µl PCR vody (Thermo Fisher Scientific), 1 µl 10 pmol primeru GTG<sub>5</sub>. Směs PCR se poté nechala zvortexovat. Před spuštěním samotné PCR reakce byla směs napipetována do PCR mikrozkuvek a přidán 1 µl DNA. Opět se mikrozkuvky nechaly zvortexovat a byly umístěny do termocykleru (Bio-Rad, USA). Teplotní režimy byly rozděleny do třech fází. Nejprve byla provedena denaturace – 1 cyklus při 95 °C po dobu 7 minut, kdy došlo k rozpadu vodíkových můstků mezi vlákna DNA. Poté následovalo 30 cyklů při 90 °C po dobu 30 minut, při 40 °C po dobu 1 minuty a při 65 °C po dobu 8 minut. Následoval 1 cyklus při teplotě 65 °C po dobu 16 minut (Gevers et al., 2001).

Poté byly PCR produkty vizualizovány pomocí agarózové gelové elektroforézy. Jedná se o poslední krok PCR, díky němuž byly detekovány vzniklé PCR produkty. Princip elektroforézy spočívá v migraci elektricky nabitých částic v elektrickém poli.

Postup:

1) Do 100 ml TAE (Tris-acetát-EDTA) pufru (0,75krát koncentrovaného) bylo přidáno 1,5 g



práškové agarózy (obojí ThermoScientific).

2) Směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě (3 min.)

3) Do směsi bylo přidáno 5  $\mu$ l GelRed (Biotum) barviva.

4) Roztok byl nalit do elektroforézy, do nádoby s hřebínky a nechal se ztuhnout při laboratorní teplotě.

5) Gel byl zalit TAE puřrem v nádobě elektroforézy.

6) Hřebínky byly opatřně vyjmuty, čímž vznikly komůrky pro PCR směs.

7) Do jamek v gelu bylo automatickou pipetou nanášeno po 5  $\mu$ l PCR směsi. Do první a poslední jamky se nanáší 5  $\mu$ l velikostního standardu (GeneRuler DNA Ladder Mix, ThermoScientific), který se přidává pro odhad velikosti pozorovaných fragmentů DNA. Velikost fragmentu se udává jako počet bází – bp (base pair).

8) Nádoba elektroforézy byla přikryta víkem a připojena ke zdroji napětí 80 V po dobu 180 minut.

Vzniklé fingerprinty byly poté vizualizovány pomocí GelDoc systému (BioRad) a dále zpracovány SW BioNumerics (Biomérieux).

Tato část práce (REP-PCR) vznikla za pomoci Ph.D. studenta Ahmada Amina.

#### 4.1.8.1 Biochemické testování enzymatické aktivity pomocí API ZYM testu

Pro další testování byla použita biochemická metoda s využitím testu API ZYM (Biomérieux). Metoda je určena pro zjištění enzymatické aktivity. Obsah balení tohoto testu se skládá z testovacích proužků s 20 jamkami, jejichž báze (vyrobená z netkaných vláken) obsahuje enzymatický substrát s puřrem. Testovací proužky by měly být skladovány při teplotách od 2-8 °C. Princip metody je založen na zjišťování konečných produktů metabolismu, v závislosti na barevných reakcích, které vyvolá přidání reagentů. Reakce jsou následně odečítány z odečítací tabulky (viz **tabulka 3**) (bioMérieux SA, 2009).

**Tabulka 3:** Tabulka odečtu

č.	ENZYM TESTOVÁN NA	SUBSTRÁT	ph	VÝSLEDEK	
				POZITIVNÍ	NEGATIVNÍ
1	Kontrola			Bezbarvosť či barva vzorku, pokud má intenzivní zbarvení	
2	Alkalická fosfatáza	2-naftyl fosforečnan	8.5	Fialová	Bezbarvá nebo velmi světle žlutá *
3	Esteráza (C4)	2-naftyl butyrát	6.5	Fialová	
4	Lipáza esteráza (C 8)	2-naftyl kaprylát	7.5	Fialová	
5	Lipáza (C 14)	2-naftyl myristát	"	Fialová	
6	Leucinarylamidáza	L-leucyl-2-naftylamid	"	Oranžová	
7	Valinarylamidáza	L-valyl-2-naftylamid	"	Oranžová	
8	Cystinarylamidáza	L-cystyl-2-naftylamid	"	Oranžová	
9	Trypsin	N-benzoyl-DL-arginin-2-naftylamid	8.5	Oranžová	
10	alfa-chymotrypsin	N-glutaryl-l-fenylalanin-2-naftylamid	7.5	Oranžová	
11	Kyselá fosfatáza	2-naftyl fosforečnan	5.4	Fialová	
12	Naftol-AS-BI-fosfohydroláza	Naftol-AS-BI-fosforečnan	"	Modrá	
13	alfa-galaktosidáza	6-Br-2-naftyl-alfaD-galaktopyranosid	"	Fialová	
14	beta-galaktosidáza	2-naftyl-betaD-galaktopyranosid	"	Fialová	
15	beta-glukuronidáza	Naftol-AS-BI-betaD-glukuronid	"	Modrá	
16	alfa-glukosidáza	2-naftyl-alfaD-glukopyranosid	"	Fialová	
17	beta-glukosidáza	6-Br-2-naftyl-betaD-glukopyranosid	"	Fialová	
18	N-acetyl-beta-glukosaminidáza	1-naftyl-N-acetyl-betaD-glukosaminid	"	Hnědá	
19	alfa-mannosidáza	6-Br-2-naftyl-alfaD-mannopyranosid	"	Fialová	
20	alfa-fukosidáza	2-naftyl-alfaL-fukopyranosid	"	Fialová	

Před zahájením testu byla nutná příprava čerstvé narostlé kultury vybraných kmenů. Bakteriální kolonie narostlá na krevním agaru byla resuspendována s fyziologickým roztokem a porovnána s připraveným roztokem o hustotě 5-6 McFarland. Následně byly připraveny inkubační boxy (misky a víčka) a do každého bylo nanášeno 5 ml destilované vody. Misky byly poté označeny čísly vzorku. Po vyjmutí testovacích proužků z obalu byly vloženy do inkubačních boxů. Pomocí automatické pipety bylo do každé jamky napipetováno 65 µl vzorku. Po inokulaci byly všechny misky zavřeny plastovými víčky a byly vloženy do termostatu (37 °C) po dobu 4 hodin. Inokulovaný proužek nesměl být vystaven silnému světlu. Po uplynutí času byly misky vyndány z termostatu a do každé jamky byla přidána 1 kapka reagensie ZYM A a 1 kapka reagensie ZYM B. Po uplynutí 5 minut bylo možné odečíst výsledky a zaznamenat reakce do výsledkové tabulky (viz Výsledky API ZYM).

#### 4.1.9 Antimikrobiální aktivita – agarová difúzní metoda

Celkem bylo pro testování vybráno 32 kmenů náležících k testovaným izolátům (viz **tabulka 1**) a 3 kontrolní kmeny (*Bifidobacterium breve* BR03, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, *Lactobacillus (Limosilactobacillus) reuteri* DSM 17938). Čerstvě narostlé kmeny a jejich supernatanty byly testovány navzájem (35 supernatantů proti 35 kulturám pomocí jamkové difúzní metody). Z narostlých kmenů byl pomocí centrifugace získán supernatant a zbylá kultura byla použita jako inokulum. Pro zajímavost byla do testu zařazena 3-HP (kyselina 3-

hydroxypropionová), kde je předpoklad možné citlivosti enterobakterií. Pro 3-HP vzorky byly použity 4 různé koncentrace (60, 150, 300 a 600 mM) a číslování od 1-4 na jedné misce. Z přeočkovaných zkumavek byl odebrán pomocí injekční stříkačky 1 ml kultury, která byla pomocí skleněné pipety s balónkem zalita 25 ml WSP agaru. Miskou bylo lehce krouženo, aby došlo k promíchání média a kultury. Po ztuhnutí agaru byly korkovrtem vytvořeny jamky, kdy byl korkotvor po každé kultuře vložen do 100% etanolu a ožihán nad kahanem, aby bylo zabráněno kontaminaci. Do vzniklých jamek bylo následně pomocí automatické pipety nanášeno 50 µl supernatantu testované kultury, nebo 3-HP v různých koncentracích. Supernatant byl získán z 1,5 ml kultury, injekční stříkačkou přenesen do Eppendorf zkumavek a vložen po dobu 2 min a 14 550 otáček do centrifugy. Petriho misky byly poté kultivovány anaerobně (AnaeroGen, Oxoid) v termostatu (37 °C) po dobu 24 h. Druhý den byly misky vyndány z termostatu, vyhodnocena antimikrobiální aktivita a změřeny inhibiční zóny.

## 5 Výsledky

Celkem bylo testováno 63 izolátů (52 enterobakterií a 11 enterokoků po finální identifikaci), které byly izolovány ze stolice kojenců a byla u nich známa předběžná identita, kultivační morfologie a zbarvení na TBX agaru, ze kterého byly původně izolovány. V rámci testů provedených v této diplomové práci bylo provedeno ověření jejich identity pomocí MALDI-TOF MS a také byla zhodnocena jejich genotypová variabilita pomocí fingerprintové metody REP-PCR. Dále byl proveden katalázový test, hemolytická aktivita, nárůst kolonií a hydrolýza na žluč-aeskulinovém agaru, ověřena  $\beta$ -glukoronidázová aktivita na TBX agaru a proveden COLI test. Uvedenými metodami byly kmeny charakterizovány na úrovni fenotypu. Dále bylo 32 kmenů testováno na antimikrobiální aktivitu.

### 5.1 MALDI-TOF MS

V rámci metody MALDI-TOF MS bylo z celkového počtu 63 testovaných izolátů identifikováno 6 z rodu *Citrobacter* (*C. amalonauticus* a *C. freundii*) 5 z rodu *Enterobacter* (*Enterobacter asubriae*, *Enb. cloacae*), 11 z rodu *Enterococcus* (*Enc. durans*, *Enc. faecalis*, *Enc. faecium*), 28 kmenů *E. coli*, 8 z rodu *Klebsiella* (*K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *K. variicola*), 1 kmen *Morganella morganii*, 3 kmeny se nepodařilo identifikovat (SE; nejasná identita z dostupné databáze) a 1 kmen byl identifikován jako *Serratia marcescens*. Detekovaná identita všech testovaných kmenů na druhové úrovni je uvedena v **tabulce 4**, tedy kromě 3 kmenů (X14, X15 a X21), které se nepodařilo řádně identifikovat na rodovou a druhovou úroveň. Je zde jistý předpoklad, že se jedná o směsnou kulturu, jelikož i původní identifikace měla nízké skóre. V případě porovnání původních výsledků identifikace a v práci identifikovaných bylo zjištěno, že u 5 kmenů se jedná o jinou identitu na úrovni rodu (X26, B23, B32, B51 a B52), a u dalších 7 kmenů se neshodují výsledky druhové identity (X19, X22, B7, B64, B66, B68 a B69). Vzhledem ke zvolené metodě identifikace a v některých případech ne úplně vysokému skóre pro druhovou identifikaci, není výsledek nikterak překvapivý. Skóre představuje číselnou hodnotu, která slouží ke zhodnocení podobnosti mezi hmotnostním spektrem neznámého vzorku a referenčními spektry v databázi přístroje. Vyšší skóre znamená větší podobnost mezi oběma spektry, což naznačuje pravděpodobnější identifikaci organismu ve vzorku. Naměřené hodnoty jsou zobrazeny v souhrnu výsledků v **tabulce 4**.

Celkový souhrn výsledků provedených testování u jednotlivých kmenů je znázorněn v **tabulce 4**. V tabulce jsou uvedeny také výsledky k dalším provedeným testům, které jsou popisovány dále v jednotlivých podkapitolách.

Tabulka 4: Celkový souhrn výsledků

	KÓD	PŮVODNÍ OZNAČENÍ KMENE	MALDI TOF MS (2. kopie, bujón)	scóre	Kataláza_CBA	HLA_test_CBA	BAA_růst	BAA_hydrolyza	BAA_růst/hydrolyza	TBX 1. kopie KCH	COLI test_UV	COLI test_indo I	Coli test
1	X7	TBX 2/5	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2,16	+	-	+	-	+/-	BK	-	+	-/+
2	X12	TBX 5/6	<i>Citrobacter freundii</i>	2,35	-	-	+	-	+/-	BK	-	-	-/-
3	X29	TBX OK 3	<i>Citrobacter freundii</i>	2,39	-	-	+	-	+/-	BK	-	-	-/-
4	B21	TBX 69/2	<i>Citrobacter freundii</i>	2,24	-	-	+	-	+/-	BK	-	-	-/-
5	B65	TBX 80/3	<i>Citrobacter freundii</i>	2,17	+	-	+	-	+/-	BK	-	-	-/-
6	B66	TBX 80/2	<i>Citrobacter freundii</i>	2,4	+	-	+	-	+/-	BK	-	-	-/-
7	B68	TBX 83/3	<i>Enterobacter asubriae</i>	2,12	+	-	+	+	+/+	BK	-	-	-/-
8	B1	TBX 9/3a	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,29	+	-	+	-	+/-	BK	-	-	-/-
9	B5	TBX 10/4a	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,37	+	-	+	-	+/-	BK	-	-	-/-
10	B64	TBX 68/4	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,12	+	-	+	-	+/-	BK	-	-	-/-
11	B69	TBX 83/3	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,17	+	-	+	-	+/-	BK	-	+	-/+
12	X9	TBX 2/4	<i>Enterococcus durans</i>	2,26	-	ZB	+	+	+/+	/	-	-	-/-
13	X1	TBX 1/5	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,47	-	ZB	+	+	+/+	/	-	-	-/-
14	X2	TBX 1/5	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,4	+	ZB	+	+	+/+	BK	-	-	-/-
15	X17	TBX 7/4	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,46	-	+	+	+	+/+	BK	-	-	-/-
16	X28	TBX OK 3 (3/3)	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,41	+	+	+	+	+/+	/	-	-	-/-
17	B42	TBX 75/2	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,42	+	-	+	+	+/+	BK	-	+	-/+
18	B51	TBX 5/4	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,41	+	ZB	+	+	+/+	BK	-	-	-/-
19	B52	TBX 6/2a	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,42	+	ZB	+	+	+/+	BK	-	-	-/-
20	B55	TBX 9/5	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,43	-	ZB	+	+	+/+	BK	-	-	-/-
21	B56	TBX 12/6	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,39	-	ZB	+	+	+/+	BK	-	-	-/-
22	B19	TBX 69/2	<i>Enterococcus faecium</i>	2,2	-	ZB	+	+	+/+	BK	-	-	-/-
23	X3	TBX 1/4	<i>Escherichia coli</i>	2,29	+	-	+	+	+/+	BK	-	-	-/-
24	X4	TBX 1/4	<i>Escherichia coli</i>	2,49	+	-	+	-	+/-	BK	-	+	-/+
25	X5	TBX 2/6	<i>Escherichia coli</i>	2,29	+	-	+	-	+/-	MK	+	+	+/+
26	X6	TBX 2/5	<i>Escherichia coli</i>	2,6	+	-	+	-	+/-	M/B_K	-	+	-/+
27	X8	TBX 2/4	<i>Escherichia coli</i>	2,57	+	-	+	-	+/-	M/B_K	-	-	-/-
28	X10	TBX 3/6	<i>Escherichia coli</i>	2,47	+	-	+	-	+/-	MK	+	+	-/-
29	X11	TBX 4/6	<i>Escherichia coli</i>	2,49	-	-	+	-	+/-	MKBS	+	+	+/+
30	X13	TBX 6/8	<i>Escherichia coli</i>	2,54	-	-	+	-	+/-	MKBS	+	+	+/+
31	X16	TBX 6/7	<i>Escherichia coli</i>	2,55	+	-	+	-	+/-	BK	-	-	-/-
32	X20	TBX 8/5	<i>Escherichia coli</i>	2,44	+	-	+	-	+/-	MK	+	+	+/+
33	X23	TBX 23 (10)	<i>Escherichia coli</i>	2,55	+	-	+	-	+/-	BK	-	-	-/-
34	X24	TBX 26 (11)	<i>Escherichia coli</i>	2,55	+	-	+	-	+/-	BK	-	+	-/+
35	X26	TBX OK 3	<i>Escherichia coli</i>	2,51	+	-	+	-	+/-	/	-	-	-/-
36	X27	TBX OK3	<i>Escherichia coli</i>	2,55	+	-	+	-	+/-	MK	+	+	+/+
37	B11	TBX 44/4	<i>Escherichia coli</i>	2,52	+	-	+	-	+/-	MK	+	+	+/+
38	B12	TBX 51/4	<i>Escherichia coli</i>	2,48	+	-	+	-	+/-	BK	-	+	-/+
39	B14	TBX 51/4	<i>Escherichia coli</i>	2,5	+	-	+	-	+/-	MK	+	+	-/-
40	B15	TBX 52/3	<i>Escherichia coli</i>	2,54	+	-	+	-	+/-	BK	-	-	-/-
41	B23	TBX 69/2	<i>Escherichia coli</i>	2,47	-	-	+	-	+/-	BK	-	-	-/-
42	B27	TBX 70/2	<i>Escherichia coli</i>	2,48	+	-	+	-	+/-	MK	+	+	-/-
43	B28	TBX 70/2	<i>Escherichia coli</i>	2,54	-	-	+	-	+/-	BK	-	+	-/-
44	B32	TBX 71/2	<i>Escherichia coli</i>	2,57	-	-	+	-	+/-	BK	-	-	-/-
45	B34	TBX 71/4	<i>Escherichia coli</i>	2,58	+	-	+	-	+/-	BK	-	-	-/-
46	B35	TBX 72/2	<i>Escherichia coli</i>	2,5	+	-	+	-	+/-	MK	+	-	+/+
47	B45	TBX 76/4	<i>Escherichia coli</i>	2,5	-	-	+	-	+/-	BK	-	+	-/+
48	B46	TBX 76/4	<i>Escherichia coli</i>	2,5	+	-	+	-	+/-	MK	+	+	+/+
49	B49	TBX 79	<i>Escherichia coli</i>	2,48	-	-	+	-	+/-	BK	-	-	-/-
50	B50	TBX 79	<i>Escherichia coli</i>	2,55	+	-	+	-	+/-	MK	+	-	+/+
51	X18	TBX 7/3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,28	+	-	+	+	+/+	BK	-	-	-/-
52	X25	TBX OK 3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,19	+	-	+	+	+/+	BK	-	-	-/-
53	B59	TBX 16/4	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,23	+	-	+	+	+/+	BK	-	+	-/+
54	B67	TBX 83/4	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,26	+	-	+	+	+/+	BK	-	-	-/-
55	X19	TBX 8/4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,93	+	-	+	+	+/+	BK	-	-	-/-
56	X22	TBX 9/5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,91	+	-	+	+	+/+	BK	-	-	-/-
57	B70	TBX 86/2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,18	+	-	+	+	+/+	BK	-	-	-/-
58	B7	TBX 44/2	<i>Klebsiella variicola</i>	2,14	+	-	+	+	+/+	BK	-	-	-/-
59	B38	TBX 73/3	<i>Morganella morganii</i>	2,31	-	-	+	-	+/-	BK	-	+	-/+
60	X14	TBX 6/7	SE	1,94	+	-	+	+	+/+	BK	-	-	-/-
61	X15	TBX 6/7	SE	1,93	+	-	+	+	+/+	BK	-	-	-/-
62	X21	TBX 9/5	SE	2,12	+	-	+	+	+/+	BK	-	-	-/-
63	B22	TBX 69/2	<i>Serratia marcescens</i>	2,39	-	-	+	-	+/-	BK	-	-	-/-

Vysvětlivky k **tabulce 4**:

+ = pozitivní reakce

- = negativní reakce

ZB = změna barvy

MK = modré kolonie

BK = bílé kolonie

M/B\_K = modrobílé kolonie

MKBS = modré kolonie s bílým středem

/ = bez výsledku

Kataláza\_CBA = Katalázový test – Columbia Blood Agar

HLA\_test\_CBA = Test hemolytické aktivity – Col.B. Agar

BAA\_růst = nárůst kolonií na žluč-aeskulinovém agaru

BAA\_hydrolýza = hydrolýza na žluč-aeskulinovém agaru

COLI test\_UV = COLI test –  $\beta$ -glukoronidázová aktivita

COLI test\_indol = COLI test – produkce indolu

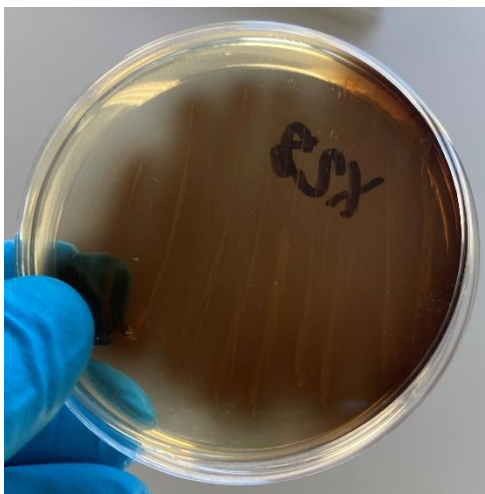
### 5.1.1 Fenotypové charakteristiky testovaných kmenů

Vzhledem k rodové i druhové variabilitě testovaných kmenů enterobakterií a do testu zařazených enterokoků bylo zřejmé, že se izoláty budou lišit na úrovni rodu, druhu a i kmene. Žádný z testovaných kmenů enterobakterií nevykazoval hemolytickou aktivitu (HA). Variabilita byla zjištěna u testování hemolytické aktivity enterokoků. U všech testovaných druhů docházelo ke změně zbarvení agarů a dále pozitivní hemolytické reakci u dvou kmenů *Enc. faecalis* (X17, X28) – **obrázek 5**. Kmen (B42) s negativním výsledkem zbarvení a bez HA byl zhodnocen další mikroskopickou kontrolou jako směsná kultura.



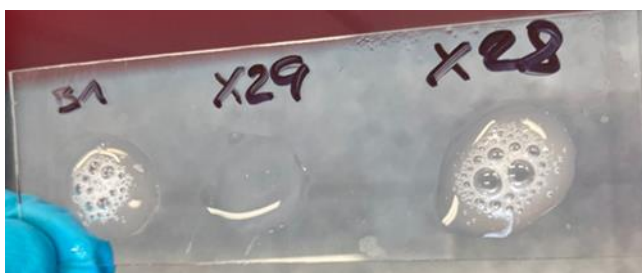
**Obrázek 5:** *Enterococcus faecalis* (X28) – pozitivní reakce (hemolytická aktivita)

U všech 63 izolátů byl rozpoznán nárůst kolonií na žluč-aeskulinovém agaru. Nedošlo tak k inhibici jejich růstu prostřednictvím žlučových solí. Hydrolýza byla potvrzena pouze u některých kmenů (**obrázek 6**). Všichni zástupci rodu *Enterococcus* a *Klebsiella* měli pozitivní hydrolýzu aeskulinu za vzniku aesculetinu a dextrózy. Pozitivní výsledek měl také jediný kmen z enterobakterů identifikovaný jako *Enb. asubriae*.



**Obrázek 6:** *Enterococcus faecalis* (X28) – pozitivní reakce: nárůst kolonií, hydrolýza aeskulinu

Druhý nejvyšší počet pozitivních reakcí vykazoval katalázový test (**obrázek 7**), kdy bylo pozitivních 45 kmenů. Zde byly pozitivní všechny enterobaktery a *Klebsiella* spp., na kmenové úrovni se lišily *E. coli*, *C. freundii* a enterokoky. Další nelze více posuzovat, jelikož je zde malé množství zástupců viz **tabulka 4**.



**Obrázek 7:** (B1) – *Enterobacter cloacae* (pozitivní reakce), (X29) – *Citrobacter freundii* (negativní reakce), (X28) – *Enterococcus faecalis* (pozitivní reakce)

$\beta$ -glukoronidázová aktivita byla primárně hodnocena prostřednictvím dvou testů. A to pomocí chromogenního média TBX a COLI testu. Výsledky obou metod se shodují a kmeny *E. coli* detekované jako modré kolonie na TBX agaru měly pozitivní výsledek na  $\beta$ -glukoronidázu i v COLI testu. COLI test obsahuje také test na indol. Ten mělo pozitivní více jak polovina kmenů *E. coli*, dále pak také *M. morgani*, kmen B42 vyhodnocený jako směsná kultura, dále *C. amalonaticus*, *Enb. cloacae* a *Enc. faecalis*.

Vyhodnocení API ZYM testu bylo provedeno na základě změn barvy u jednotlivých jamek, do kterých byl přidán vzorek s reagensy ZYM A a ZYM B. Principem bylo štěpení daného substrátu za pomoci enzymů, které byly produkovány testovanými bakteriemi, což vedlo ke změně barvy indikátoru.

V rámci enzymatického testování bylo zkoumáno 37 kmenů. Z nichž 23 bylo předem kultivováno na TBX (kmeny testoval někdo jiný a jsou v tabulce vyznačeny tučně) a 14 na WSP,

kteře jsem testovala já. Do testu byl pro zajímavost zařazen 1 kmen (*Escherichia hermanii*) mimo testovanou kolekci. Jednalo se taktěž o izolát od kojence. Na typu média byl závislý konečný výsledek testu a vysvětleny některé reakce. TBX je chromogenní médium a při  $\beta$ -glukoronidázové aktivitě se barví do modra. Takže není úplně vhodné pro API ZYM test použít přímo tyto kolonie. Pro biochemické testy by měly být použity kolonie narostlé na elektivních médiích.

Kontrolní „negativní“ reakce byla potvrzena u všech 37 testovaných kmenů. Nejvyšší počet pozitivních reakcí v rámci enzymatického testování byl zaznamenán u leucin arylamidázy, kdy 33 z 37 testovaných kmenů vykazovalo výraznou enzymatickou reakci, u 1 kmene byla rozpoznána stále odečitatelná reakce (*M. morgani*) a u 3 kmenů nebyla reakce žádná (*Enc. faecalis*). Nejvyšší počet pozitivních reakcí v rámci druhu zaznamenal *Enb. cloacae* (B64). Jeho výrazná enzymatická reakce byla potvrzena u alkalické fosfatázy, esterázové lipázy, leucin arylamidázy, cystin arylamidázy, kyselé fosfatázy, Naftol-AS-BI-fosfohydrolázy,  $\beta$ -galaktosidázy,  $\beta$ -glukosidázy a N-acetyl- $\beta$ -glukosamidázy. Pozitivní reakci na alkalickou fosfatázu vykazovalo 31 z 37 testovaných kmenů. Negativní reakce na alkalickou fosfatázu byla zaznamenána u 4 kmenů *Enc. faecalis*, 1 kmene *Enc. faecium* a 1 kmene *E. hermanii*. Pozitivní reakce na  $\beta$ -glukoronidázu byla potvrzena pouze u 5 kmenů *E. coli*, které byly předem kultivovány na TBX. Zde se právě rozcházejí výsledky pro tento enzym v případě kultivace kultury na chromogenním médiu. Na běžném médiu nedošlo k dostatečné expresi genů a výsledek API ZYM se neshoduje s COLI testem a TBX agarem. Reakce s žádnou enzymatickou aktivitou byly zaznamenány u všech vzorků testovaných na valin arylamidázu, trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin,  $\alpha$ -manosidázu a  $\alpha$ -fukosidázu. Kompletní tabulka se všemi reakcemi testovaných kmenů je vložena do samostatných příloh této diplomové práce. Zkrácený výsledek je prezentován v **tabulce 5**.



**Tabulka 5:** Zkrácený souhrn výsledků API ZYM testu

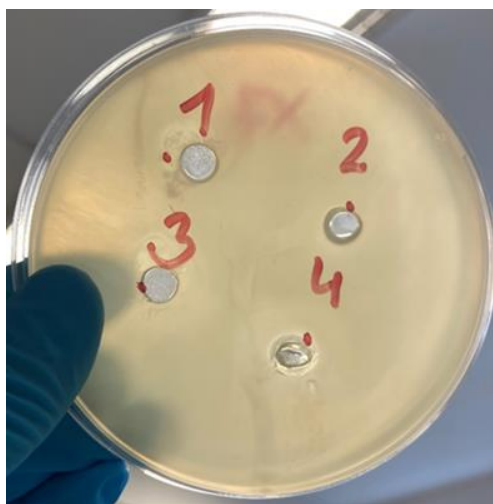
Kmen	Druhá identita	2	3	4	6	8	11	12	13	14	15	16	17	18
X12	<i>Citrobacter freundii</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
X29	<i>Citrobacter freundii</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
B65	<i>Citrobacter freundii</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
B66	<i>Citrobacter freundii</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
B68	<i>Enterobacter asubriae</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
B69	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
B5	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
B64	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
B52	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
X28	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+/-	-/+	-	-	-/+	+/-	-	-	-	+	-	-
X1	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-/+	-	-	-	-	-/+	-	-	-	+	-	-
X17	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
B19	<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
X3	<i>Escherichia coli</i>	+	-/+	-	+	-	+	+	-	+	-	+/-	-	-
X5	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+	-	+	+/-	-	-/+	-	-	-	-
X11	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-/+	-	-
B11	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
B14	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
B15	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
B27	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
B28	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
B34	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
B35	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
B45	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
B46	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
B49	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
B50	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
NC	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
C	<i>Escherichia hermanii</i>	-	-	-	+	-	-/+	-	-	-	-	-	-	-
X18	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	-	+	-	+	+/-	+	+	-	-/+	+	-
B67	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
X19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	-/+	-	-	-	-
B70	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
B7	<i>Klebsiella variicola</i>	+	-	-	+	-	+	+	+/-	+/-	-	+/-	-/+	-
B38	<i>Morganella morganii</i>	+	-	-	+/-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
B22	<i>Serratia marcescens</i>	+	+/-	+/-	+	-	+	-/+	-	+/-	-	-/+	-	-
		Alkalická fosfatáza	Esteráza (C 4)	Esterázová lipáza (C 8)	Leucin arylamidáza	Cystin arylamidáza	Kyselá fosfatáza	Naftol-AS-BI-fosforyláza	$\alpha$ -galaktosidáza	$\beta$ -galaktosidáza	$\beta$ -glukoridáza	$\alpha$ -glukosidáza	$\beta$ -glukosidáza	N-acetyl- $\beta$ -glukosaminidáza

**Vysvětlivky k tabulce 5:**

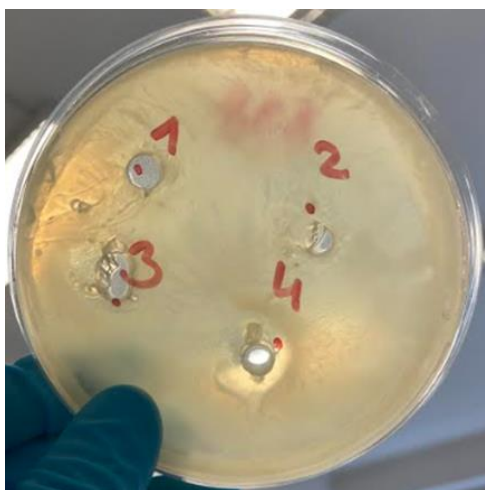
- + = výrazná enzymatická reakce
- +/- = stále odečitatelná reakce
- /+ = slabá reakce
- = bez reakce

## 5.2 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální aktivita byla testována u 32 vybraných kmenů a 3 probiotických kmenů, tedy dvou bifidobakterií a jednoho laktobacila. Všechny 35 kmenů bylo otestováno difúzní metodou navzájem a nebyla zaznamenána žádná antimikrobiální aktivita. Výjimka byla zjištěna pouze u aplikace 3-HP, která byla testována proti 5 kmenům, ale pouze u 2 z nich se projevil inhibiční zóny. Jednalo se o kmeny *Morganella morganii* a *Citrobacter amalonaticus*, u kterých bylo testováno 3-HP v nejvyšší koncentraci. U těchto kmenů byly změřeny inhibiční zóny, které jsou znázorněny na **obrázku 8 a 9**.



**Obrázek 8:** Inhibiční zóny u *Citrobacter amalonaticus* (X7) (pozitivní výsledek u vzorku 4 = 600  $\mu$ M 3-HP)



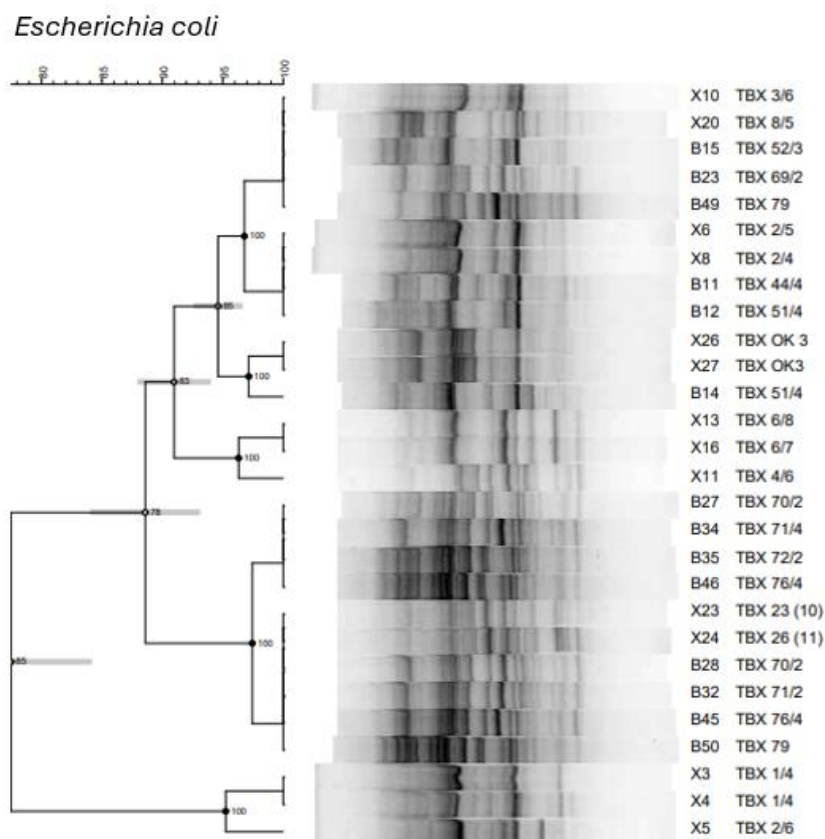
**Obrázek 9:** Inhibiční zóny u *Morganella morganii* (B38) (pozitivní výsledek u vzorku 4 = 600  $\mu$ M 3-HP)

### 5.3 REP-PCR

Fingerprintové metody na bázi PCR neslouží k vyložené identifikaci bakterií, ale jsou nástrojem genotypové charakterizace získaných izolátů. Vhodné jsou například ke kmenovému odlišení. Máme-li například od jednoho jedince více izolátů a nechceme zbytečně pro další metody testování používat identické kopie.

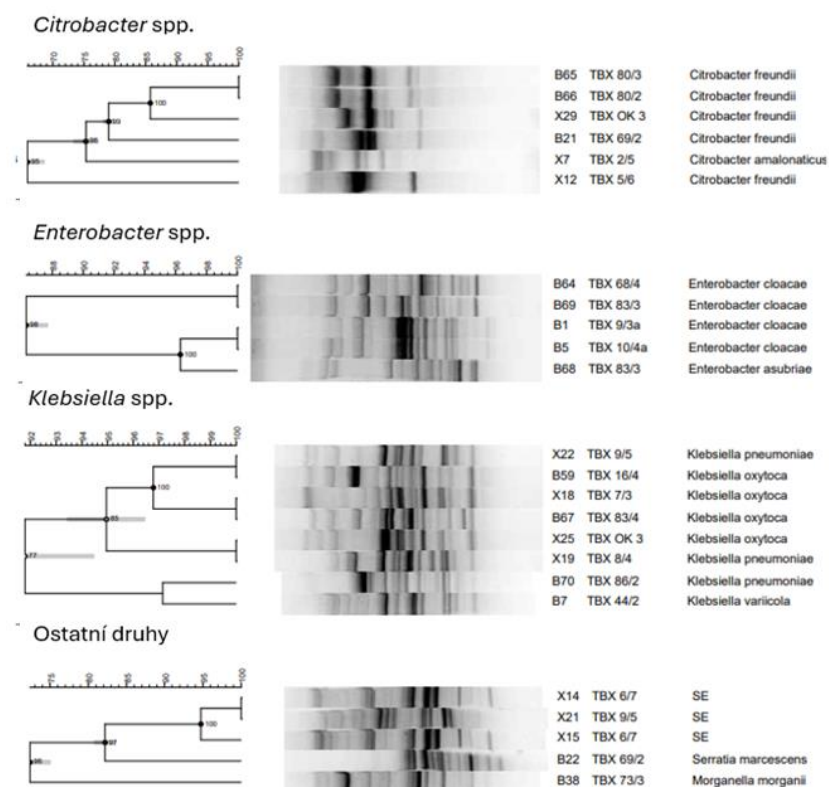
Níže jsou na obrázcích zobrazeny fingerprintové profily získané metodou REP-PCR s použitím primeru GTG5. Uvedený primer umožnil zobrazení profilů všech testovaných kmenů. V testované kolekci enterobakterií a enterokoků bylo zařazeno několik izolátů, které pocházely od stejných hostitelů, což se projevilo na jejich profilech.

Nejvíce z testovaných izolátů náleželo do druhu *E. coli* (**obrázek 10**). Vzhledem k množství izolátů nebylo možné mít všechny vzorky na jednom gelu, což poté ovlivňuje finální hodnocení. Tudíž nebyla kritéria úplně striktně nastavená. Cílem bylo na základě vyhodnocení podobnosti profilu prezentovaného jako proužky na gelu zjistit, které z izolátů představují klony jednoho kmene. Což je patrné například u vzorků X6 a X8, které pocházejí podle dalšího značení (TBX2/5 a TBX2/4) ze stejného fekálního vzorku, jen se jedná o izoláty z různých ředění. Dále pak například X13 a X16, X3 a X4. Mezi vzorky se našly i izoláty s velmi podobným či dokonce identickým profilem pocházejícím z různých fekálních vzorků B35 a B46. Nicméně poskytnutá data pro potřeby diplomové práce neuvádějí identitu/příslušnost ke konkrétnímu kojenci, takže nelze zhodnotit, zda se nemohlo jednat o totožného hostitele.



**Obrázek 10:** Fingerprintové profily izolátů *E. coli*

Další výsledky jsou zobrazeny na úrovni jednotlivých rodů, a to *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. a ostatní druhy na **obrázku 11**. I zde byly uvedenou metodou detekovány identické klony kmenů jako například *C. freundii* B65 a B66. Vzhledem k tomu, že zde bylo u některých rodů zastoupeno více druhů, tak je zde variabilita jednotlivých izolátů logická. Nicméně, zde byla i patrná variabilita na úrovni druhu například 4 charakterizované kmeny *Enb. cloacae* vykazovaly 2 různé fingerprintové profily, taktéž zástupci *K. oxytoca* se od sebe lišili na kmenové úrovni.



**Obrázek 11:** Fingerprintové profily ostatních druhů

Enterokoky jsou poté zobrazeny na **obrázku 12**. I zde byly opět v kolekci identické klony *Enc. faecalis* X1 a X2. Nicméně v dendrogramu jsou prezentovány odděleně, zřejmě by bylo třeba vhodněji upravit kritéria. Zajímavá je třeba kmenová podobnost u izolátů X17 a X28, které jako jediné dva izoláty vykazovaly hemolytickou aktivitu. Nebo také jasná odlišnost profilů druhů *Enc. durans* a *Enc. faecium*.



**Obrázek 12:** Fingerprintové profily *Enterococcus* spp.

## 6 Diskuze

*Enterobacteriaceae* je čeleď gramnegativních tyčinkovitých fakultativně anaerobních bakterií, které jsou známy především pro jejich schopnost způsobovat střevní onemocnění. Jsou zodpovědné za řadu onemocnění lidí a zvířat, včetně infekcí močových cest, gastroenteritidy, meningitidy a septikémie (Abdullah et al., 2015). I přes tuto skutečnost se jedná o běžné komenzály GIT, a to již od počáteční kolonizace kojence. Ke vzniku a rozvoji infekcí dochází v případě dysbiózy střevní mikrobioty (Hung et al., 2021). Mikrobiologická diagnostika pro detekci přítomnosti a typu *Enterobacteriaceae* z klinických vzorků je potenciálně důležitá. Různé biochemické testy se tradičně používají k předpokládané identifikaci a třídění různých druhů enterobakterií. Výsledky různých testů jsou poté manuálně vyhodnocovány buď jako pozitivní nebo negativní pro identifikaci konkrétní skupiny bakterií (Abdullah et al., 2015).

MALDI-TOF MS, který byl poprvé představen v laboratořích klinické mikrobiologie v Evropě, je rychle přijímán laboratořemi po celém světě. Ačkoli má více aplikací, jeho široké přijetí v klinické mikrobiologii souvisí s jeho použitím jako levné, snadné, rychlé a přesné metody pro identifikaci vykultivovaných bakterií a hub na základě automatizované analýzy hmotnostní distribuce bakteriálních proteinů. Pomocí MALDI-TOF MS se podařilo identifikovat většinu z testovaných izolátů v této diplomové práci. V případě neúspěšné identifikace se pravděpodobně jednalo o směsné kultury. V této práci bylo však shledáno že při identifikaci na druhovou úroveň by bylo vhodné danou metodu doplnit nebo ověřit jinou metodou. Rodová identifikace byla shledána jako spolehlivá, nicméně v případě rozlišení některých druhů nebyla skóre vysoká, což může ovlivnit kvalita zpracování vzorků. A navíc se lišila identita původní od nově zjištěné. Nicméně dle provedeného testování Oviano et al. (2017) bylo pomocí MALDI-TOF MS správně identifikováno 95 % kmenů enterobakterií. Dále MALDI-TOF MS dokázala detekovat  $\beta$ -laktamázu s citlivostí 90 % a specificitou 98 % a byla rychlejší než klasické mikrobiologické metody.

V této práci byla použita kolekce enterobakterií a také enterokoků, která pocházela ze zdravých kojených dětí. V rámci testování bylo potvrzeno, že kojenecké izoláty z čeledi *Enterobacteriaceae* a stejně tak testované *Enterococcus* spp. vykazují fenotypovou i genotypovou variabilitu. Rod *Enterococcus* je charakterizován schopností růstu za určitých podmínek (pH 9,6; teplota 10–45 °C), což je široce využíváno při selektivní izolaci. Dle Manero & Blanch (1999) jsou detekovány a stanovovány počty enterokoků pomocí selektivního média (např. M-enterococcus agar nebo KF streptococcus agar) a je používán žluč-aeskulin-azidový agar jako další test pro jejich potvrzení. Ačkoli tato metoda může odlišit *Enterococcus* spp. od jiných bakteriálních druhů, některé izoláty mohou být chybně identifikovány. Použité izoláty v této práci pocházely z TBX agaru. V této práci byl pozitivní růst a hydrolýza na žluč-aeskulinovém agaru potvrzen u všech kmenů rodu *Enterococcus*. Pozitivní reakce vykazovaly ale také všechny kmeny rodu *Klebsiella* a kmen *Enb. asubriae*. *Enc. faecalis* i *Enc. faecium* mohou přežít zahřátí na 60 °C po dobu 30 minut, díky čemuž je rod *Enterococcus* odlišitelný od jiných blízkce příbuzných rodů, jako je *Streptococcus* spp. (Foulquie Moreno et al., 2006). K posouzení hemolýzy vyvolané enterokoky lze použít tryptikázový sójový agar nebo agar

Columbia s 5 % (v/v) defibrinované ovčí krve. Pokud je použita lidská nebo koňská krev, hemolýza je založena na cytolyzinové aktivitě a způsobuje  $\beta$ -hemolytickou reakci (Domig et al., 2003). Hemolytická aktivita byla v této práci u enterokoků detekována, ale pouze u některých kmenů druhu *Enc. faecalis*. Ve studii Izumi et al. (2005) bylo testováno 95 kmenů *Enc. faecalis* izolovaných z různých lidských klinických zdrojů. Tyto kmeny byly zkoumány na hemaglutinační aktivitu a produkci hemolyzinu (Hly) v přítomnosti erytrocytů širokého spektra druhů, kdy 54 % kmenů vykazovalo hemolytickou aktivitu, s nejvyšší aktivitou u kmenů izolovaných z ran. Hemaglutinační a hemolytická aktivita byla spojena s expresí specifických genů, včetně agregačního faktoru a hemolyzinu. Kmeny s vyšší hemaglutinační a hemolytickou aktivitou vykazovaly také vyšší tvorbu biofilmu. Hemaglutinační a hemolytická aktivita kmenů *Enc. faecalis* může hrát důležitou roli v jejich virulenci. Tyto vlastnosti mohou usnadnit kolonizaci hostitele a invazi do tkání. Takové kmeny mohou být poté také spojeny s těžšími infekcemi.

Enzym kataláza je důležitý v rozkladu reaktivních forem kyslíku, tj. peroxidu vodíku na kyslík a vodu (Kaushal et al., 2018). V této práci byly bakterie rozlišeny na základě jejich schopnosti produkovat tento enzym a pozitivní reakce byly zaznamenány u většiny testovaných izolátů. Dle Chester & Moskowitz (1987) bylo testováno 174 kmenů čeledi *Enterobacteriaceae* ze 43 druhů. U všech testovaných kmenů této studie byla zaznamenaná pozitivní reakce na katalázový test. Pro přesnou identifikaci bakterií je však nutné provést další testování.

*E. coli* je nejrozsáhleji studovaný organismus pro biosyntézu indolu. V *E. coli* je indol produkován tryptofanázou, díky které může reverzibilně přeměňovat tryptofan na indol, pyruvát a amoniak (Lee & Lee, 2010). Dle Zhao et al. (2019) je indol a metabolity indolu významný pro diagnostiku a remisi lidských onemocnění. Podávání kyseliny indol-3-propionové je účinné při nealkoholické steatohepatidě, moduluje střevní mikrobiální složení a inhibuje dysbiózu. Podobně kyselina indolakrylová, produkováná komenzálními bakteriemi podporuje fungování střevní epitelální bariéry a zmírňuje zánětlivou reakci (Wlodarska et al., 2017). V této práci byl indol testován pomocí COLI testu, který je pravidelně používán pro identifikaci *E. coli*. V rámci COLI testu byla sledována i aktivita  $\beta$ -glukoronidázy.  $\beta$ -glukoronidázová aktivita způsobuje dekonjugaci bilirubin diglukuronidu, což vede k vysrážení bilirubinátu vápenatého, který přispívá k tvorbě žlučových kalů a kamenů. Tento proces je připisován enzymové aktivitě produkované aerobními enterobakteriemi, jako jsou *E. coli* a *Klebsiella* spp. Dle Ratnam et al. (1988) by měli být bez aktivity pouze 3–4 % enterobakterií. V mé práci byly však bílé kolonie zaznamenány přibližně u poloviny izolátů. V rámci testování  $\beta$ -glukoronidázové aktivity byly použity celkem 3 různé testy (TBX, COLI test, API ZYM). Výsledky testování na chromogenním TBX agaru se shodovaly s COLI testem, nicméně ne s biochemickým API ZYM testem. Tam byl pozitivní výsledek zaznamenán pouze při použití kolonií z TBX agaru, což není považováno za relevantní. Jelikož pro daný typ testu je dobré používat elektivní médium jako je například krevní agar, ale zde test nefungoval. Nicméně daný test přinesl celou řadu dalších výsledků. Nejčastěji byly testované enterobakterie a enterokoky pozitivní na leucin arylamidázu. API testy jsou obecně používány pro klinické

laboratoře, lékaře/administrátory, krevní banky, kosmetiku/osobní péči, zemědělství/potravinářský průmysl a biofarmacii. Systém nabízí rozsáhlou a robustní databázi, která je přístupná prostřednictvím internetové služby APIWEB™ (bioMérieux). Testování je dobré kombinovat s dalšími metodami, jelikož výsledek může být ovlivněn genovou expresí. Exprese bakteriálních genů závisí nejen na specifických regulačních mechanismech, ale také na růstu bakterií, protože důležité parametry, jako je množství RNA polymeráz a ribozomů, jsou závislé na rychlosti růstu (Klumpp et al., 2009).

Dle Sonnenborn & Schulze (2009) byla *E. coli* Nissle (EcN) testována pro své antimikrobiální účinky proti jiným mikroorganismům. U *in vitro* testování byla vytvořena inhibiční zóna proti testovanému kmeni, jak již bylo zmíněno v kapitole 3.3.8 Probiotický kmen *E. coli*. Antimikrobiální aktivita proti patogenům je důležitým faktorem, který je třeba vzít v úvahu při výběru potenciálních probiotických kmenů pro udržení zdravé mikrobiální rovnováhy v GIT (Shokryazdan et al., 2014). Ve studii Shokryazdan et al. (2014) vykazovalo 9 izolovaných kmenů *Lactobacillus* antagonistickou aktivitu proti 12 testovaným patogenům, které jsou patogenní pro člověka. Dle Chen et al. (2021) bylo zjištěno, že *Lactobacillus* spp. vykazoval antimikrobiální aktivitu proti široké škále *Enterobacteriaceae* produkujících karbapenemázu (KPC). Antimikrobiální aktivita *Lactobacillus* spp. byla způsobena produkcí kyseliny mléčné, bakteriocinů a dalších antimikrobiálních látek. *Lactobacillus* spp. inhiboval růst KPC-produkujících *E. coli*, *K. pneumoniae* a *Enb. cloacae*. V této diplomové práci nebylo v rámci testování pomocí agarové difúzní metody sledováno, že by laktát a acetát produkovaný bifidobakteriemi nebo laktobacily nějakým způsobem inhiboval růst testovaných enterobakterií a enterokoků. Mnoho mikroorganismů může produkovat 3-HP jako meziprodukt nebo konečný produkt řadou metabolických drah. Kyselina 3-hydroxypropionová nebo 3-hydroxypropanoát (3-HP) je důležitá chemikálie definována jako tříuhlíková, opticky neaktivní organická sloučenina a strukturální izomer kyseliny mléčné (kyselina 2-hydroxypropanová). Z výzkumů bylo zjištěno, že 3-HP inhibuje růst *E. coli* v závislosti na koncentraci. Bylo zjištěno, že 3-HP ovlivňuje metabolismus a energetické procesy v buňkách *E. coli*. Také inhibuje růst *K. pneumoniae* a *Enb. cloacae* (Kumar et al., 2013). Testovaná 3-HP v difúzní metodě této diplomové práce vykazovala inhibiční účinky vůči *M. morgani* a *C. amalonaticus* pouze v nejvyšší použité koncentraci 600  $\mu$ M. Tento účinek nebyl zaznamenán vůči testovaným kmenům *K. pneumoniae*, *K. varriicola* a *Serratia marcescens*. Je potřeba poznamenat, že 3-HP byla celkem testována pouze vůči 5 kmenům, takže by bylo třeba do testu zahrnout více kmenů i taxonů.

I přestože byla nalezena rodová, druhová i kmenová variabilita v rámci testovaných enterobakterií a enterokoků, tak by bylo žádoucí rozšíření o další metody testování. Například u *E. coli* je možné stanovit celou řadu dalších vlastností a kategorizovat je dále jak na úrovni fenotypu i genotypu, jelikož zahrnuje jak probiotické kmeny například *E. coli* Nissle, tak silně patogenní, a proto je charakterizace a další testování důležité.

## 7 Závěr

V této diplomové práci byla potvrzena fenotypová i genotypová variabilita napříč testovanými zástupci enterobakterií, taktéž u do testu zahrnutých enterokoků. V rámci testování byla potvrzena jak druhová, tak kmenová variabilita. Pomocí MALDI-TOF MS byla identifikována většina testovaných izolátů a jejich identita byla potvrzena s vysokou mírou jistoty identifikace na rodové úrovni. Nicméně, v případě rozlišení na úrovni druhu by bylo vhodné zařadit i jiné metody identifikace. Z hlediska aplikovatelnosti a vypovídající hodnoty zvolených fenotypových testů vykazoval nejčastější pozitivní výsledek nárůst kolonií na žluč-aeskulinovém agaru, kdy došlo k pozitivní reakci u všech izolátů. Hydrolýza byla poté zaznamenána pouze u kmenů enterokoků a některých dalších kmenů náležících do čeledi *Enterobacteriaceae*. Vysoký počet pozitivních reakcí vykazoval také katalázový test. Nicméně, žádný z testovaných kmenů enterobakterií nevykazoval hemolytickou aktivitu. Hemolytická aktivita byla zaznamenána pouze u některých kmenů druhu *Enc. faecalis*. Nejednoznačné byly výsledky testu  $\beta$ -glukuronidázové aktivity, kde chromogenní TBX agar a COLI test byly shodné, zatímco biochemický test API ZYM se lišil. Což mohlo být z důvodu nižší citlivosti API ZYM testu nebo nevhodných testovacích podmínek, které ovlivnily aktivitu enzymu. Pro definitivní závěr by bylo vhodné testy zopakovat, nebo použít jinou metodu. Například PCR detekci zodpovědných genů. Při testování pomocí agarové difúzní metody nebyl zaznamenán antimikrobiální účinek použitých bifidobakterií a laktobacilů ani inhibice růstu testovaných enterobakterií a enterokoků vzájemně. Nicméně, při testování 3-HP byly zaznamenány inhibiční účinky vůči *M. morgani* a *C. amalonaticus* (v nejvyšší použité koncentraci 600  $\mu$ M). V tomto případě bylo testováno pouze 5 kmenů a bylo by tedy potřeba pro přesnější výsledky zahrnout více taxonů i kmenů a rozšířit metodiku testování.

Z interpretovaných výsledků bylo zjištěno, že pro validní potvrzení použitých metod by bylo třeba více zástupců testovaných taxonů a opakování.



## 8 Literatura

- 1) Abdullah Ahmed, Alam S. M. Sabbir, Sultana Munawar, Hossain M. Anwar. 2015. BioCluster: Tool for Identification and Clustering of *Enterobacteriaceae* Based on Biochemical Data. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. 13(3):192–199
- 2) Abram Kaleb, Udaondo Zulema, Bleker Carissa, Wanchai Visanu, Wassenaar M. Trudy, Robeson S. Michael, Ussery W. David. 2021. Mash-based analyses of *Escherichia coli* genomes reveal 14 distinct phylogroups. *Communications Biology*. 4:117
- 3) Adak Atanu, Khan R. Mojibur. 2018. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 76: 473–493
- 4) Adeolu Mobolaji, Alnajar Seema, Naushad Sohail, Gupta S. Radhey. 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66:12
- 5) Alnajar Seema, Gupta S. Radhey. 2017. Phylogenomics and comparative genomic studies delineate six main clades within the family Enterobacteriaceae and support the reclassification of several polyphyletic members of the family. *Infection, Genetics and Evolution*. 54: 108-127
- 6) Anderson J.M., Baird-Parker A.C. 1975. *Journal of Applied Bacteriology*. 39: 111-117
- 7) Angulo J. Fredirick, Cahill M. Sarah, Wachsmuth Kaye I., Costarrica de Lourdes Maria, Embarek Ben Karim Peter. 2008. Powdered Infant Formula as a Source of *Salmonella* Infection in Infants. *Clinical Infectious Diseases*. 46(2): 268-273
- 8) Arrieta Marie-Claire, Stiemsma T. Leah, Amenyogbe Nelly, Brown M. Eric, Finlay Brett. 2014. The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Frontiers in Immunology*. 5 (5): 427
- 9) Barson J. William, Antonara Stella. 2018. *Proteus, Providencia, and Morganella* Species. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Fifth Edition)*. 833-835
- 10) Baylis Chris, Uyttendaele Mieke, Joosten Han, Davies Andy. 2011. The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry. *International Life Sciences Institute*. 1-52

- 11) Becton Dickinson GmbH. 2013. BD Columbia Agar with 5 % Sheep Blood. Médium na miskách k okamžitému použití, 254071: 120. Available at <https://www.bd.com/resource.aspx?idx=8579>
- 12) Beimfohr Claudia. 2016. A Review of Research Conducted with Probiotic *E. coli* Marketed as Symbioflor. International Journal of Bacteriology. ID 3535621
- 13) Berg Gabriele, Rybakova Daria, Fischer Doreen, Cernava Tomislav, Vergès Ch. Marie-Christine, Charles Trevor, Chen Xiaoyulong , Cocolin Luca, Eversole Kelve, Corral H. Gemo, Kazou Maria, Kinkel Linda, Lange Lene, Lima Nelson, Loy Alexander, Macklin A. James, Maguin Emmanuelle, Mauchline Tim, McClure Ryan, Mitter Birgit, Ryan Matthew, Sarand Inga, Smidt Hauke, Schelkle Bettina, Schloter Michael. 2020. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. Microbiome. 8: 103
- 14) bioMérieux SA. 2009. Available at <https://www.biomerieux.cz/produkty/apir>
- 15) Blackwood P. Brian, Hunter J. Catherine. 2016. Cronobacter spp. American Society for Microbiology. Microbiology Spectrum. 4:2
- 16) Braun Dominik, Eiser Maximilian, Puntschner Hannes, Marko Doris, Warth Benedikt. 2021. Natural contaminants in infant food: The case of regulated and emerging mycotoxins. Food Control. 123: 107676
- 17) Browne P.H., Shao Yan, Lawley D. Trevor. 2022. Mother–infant transmission of human microbiota. Current Opinion in Microbiology. 69: 102173
- 18) Bunešová Věra, Lacroix Christophe, Schwab Clarissa. 2016. Fucosyllactose and L-fucose utilization of infant Bifidobacterium longum and Bifidobacterium kashiwanohense . BMC Microbiology. 16: 248
- 19) Chen Chi-Chung, Lai Chih-Cheng, Huang Hui- Ling, Su Yu-Ting, Chiu Yu-Hsin, Toh Han-Siong, Chiang Shyh – Ren, Chuang Yin- Ching, Lu Ying-Chen, Tang Hung-Jen. 2021. Antimicrobial ability and mechanism analysis of Lactobacillus species against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 54 (3): 447-456
- 20) Chester B., Moskowitz B. L. 1987. Rapid catalase supplemental test for identification of members of the family Enterobacteriaceae. ASM Journals. Journal of Clinical Microbiology. 25:2

- 21) Chowdhry A. Shakeel, Cohen R. Alan. 2012. *Citrobacter* brain abscesses in neonates: early surgical intervention and review of the literature. *Child's Nervous System*. 28: 1715-1722
- 22) Clements Abigail, Young C. Joanna, Constantinou Nicholas, Frankel Grad. 2012. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*. 3(2):71-87
- 23) Cleusix Valentine, Lacroix Christophe, Vollenweider Sabine, Duboux Marc, Blay Le Gwenaelle. 2007. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiology*. 7: 101
- 24) Cobo-Simón Marta, Hart Rowan, Ochman Howard. 2022. *Escherichia Coli*: What Is and Which Are?. *Molecular Biology and Evolution*. 40 (1)
- 25) Collado MC., Isolauri E., Laitinen K., Salminen S. 2010. Effect of mother's weight on infant's microbiota acquisition, composition, and activity during early infancy: a prospective follow-up study initiated in early pregnancy. *American Journal of Clinical Nutrition*. 92:1023–1030
- 26) Davani-Davari Dorna, Negahdaripour Manica, Karimzadech Iman, Seifan Mostafa, Mohkam Milad, Masoumi Jalil Seyed, Berenjian Aydin, Ghasemi Younes. 2019. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods*. 8(3): 92
- 27) Davin-Regli Anne, Lavigne Jean-Philippe, Pages Jean-Marie. 2019. Enterobacter spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *American Society for Microbiology: Clinical Microbiology Reviews*. 32:4
- 28) De Filippo C., Cavalieri D., Di Paola M., Ramazzotti M., Poullet JB., Massart S., Collini S., Pieraccini G., Lionetti P. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* . 107:14691–14696.
- 29) Diab Hassan, Ravy Kelven, Jisr Tamima, Chaar El Mira, Abboud Edmond, Tokajian Sima. 2024. Phenotypic and molecular characterization of multidrug resistant *Klebsiella* spp. isolates recovered from clinical settings. *Infection, Genetics and Evolution*. 119: 105583
- 30) Domig K. J., Mayer H. K., Kneifel W. 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. *International Journal of Food Microbiology*. 88:165–188

- 31) Dong Ning, Yang Xuemei, Chan Wai-Chi Edward, Zhang Rong, Chen Sheng. 2022. *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *eBioMedicine*. 79: 103998
- 32) Erba Lachema s.r.o. 2019. MIKROLATEST. COLItest. Kat.č. MLT00035.
- 33) Farmer J. J., Farmer M. K., Holmes Barry. 2010. The *Enterobacteriaceae*: general Characteristics. *Topley & Wilson's Microbiology*. 1-43
- 34) Foulquie Moreno M. R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 106:1–24
- 35) Friedmann C. Herbert. 2014. Escherich and *Escherichia*. *American Society for Microbiology. EcoSal Plus*. 6:1
- 36) García Alexis, Fox G. James. 2021. A One Health Perspective for Defining and Deciphering *Escherichia coli* Pathogenic Potential in Multiple Hosts. *Comparative Medicine*. 71(1): 3-45
- 37) García-Solache Mónica, Rice B. Louis. 2019. The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its Environment. *American Society for Microbiology*. 32: 2
- 38) Gattupalli Nareshkumar, Gattupalli Archana. 2021. Potential of *Escherichia coli* Probiotics for Improved Health and Disease Management. *Escherichia coli – Old and New Insights*. 504
- 39) Geurtsen Jeroen, Been de Mark, Weerdenburg Eveline, Zomer Aldert, McNally Alan, Poolman Jan. 2022. Genomics and pathotypes of the many faces of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*. 46 (6)
- 40) Gevers Dirk, Huys Geert, Swing Jean. 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*. 205 (1): 31-36
- 41) Girlich Delphine, Ouzani Souad, Emeraud Cécile, Gauthier Lauraine, Bonnin A Rémy, Sache Le N., Mokhtari Mostafa, Langlois Isabelle, Begasse Christine, Arangia Nicolas, Fournier Sandra, Fortineau Nicolas, Naas Thierry, Dortet Laurent. 2021. Uncovering the novel *Enterobacter cloacae* complex species responsible for septic shock deaths in newborns: a cohort study. *The Lancet Microbe*. 2(10): 536-544
- 42) Gueimonde M., Sakata S., Kalliomaki M., Isolauri E., Benno Y., Salminen S. 2006. Effect of maternal consumption of *Lactobacillus GG* on transfer and establishment of fecal bifidobacterial microbiota in neonates. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 42:166–170

- 43) Hanson M. Blake, Weinstock M. George. 2016. The importance of the microbiome in epidemiologic research. *Annals of Epidemiology: The Microbiome and Epidemiology*. 26 (5): 301-305
- 44) Hernandez-Alonso Enrique, Bourgeois-Nicolaos Nadége, Lepointeur Margaux, Derouin Véronique, Barreault Simon, Waalkes Adam, Augusto A. Luis, Gera Stuti, Gleizes Orane, Tissieres Pierre, Salipante J. Stephen, Luca de Daniele, Doucet-Populaire Florence. 2022. Contaminated Incubators: Source of a Multispecies *Enterobacter* Outbreak of Neonatal Sepsis. *Microbiology Spectrum*. 10(4)
- 45) Hidalgo-Cantabrana C., Sanchez B., Milani C., Ventura M., Margolles A., Ruas-Madiedo P. 2014. Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology. 80:9
- 46) Hill C.J., Lynch D.B. , Murphy K., Ulaszewska M., Jeffery I.B., O'Shea C.A., Watkins C., Dempsey E., Mattivi F., Touhy K., Ross R.P., Ryan C.A., O'Toole P.W., Stanton C. 2017. Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTMET cohort. *Microbiome*. 5:4.
- 47) Hung Yuan-Pin, Lee Ching-Chi, Lee Jen-Chien, Tsai Pei-Jane, Hsueh Pon-Reh, Ko Wen-Chien. 2021. The Potential of Probiotics to Eradicate Gut Carriage of Pathogenic or Antimicrobial-Resistant *Enterobacterales*. *Antibiotics*. 10(9): 1086
- 48) Ihekweazu Faith D., Versalovic James. 2018. Development of the Pediatric Gut Microbiome: Impact on Health and Disease. *The American Journal of the Medical Sciences*. 356 (5): 413-423
- 49) Ingribelli Eugenio, Modráčková Nikol, Tejnecky Vaclav, Killer Jiri, Schwab Clarissa, Bunešová Neužil Věra. 2023. Culture-dependent screening of endospore-forming clostridia in infant feces. *BMC Microbiology*. 23:347
- 50) Ioannou Petros. 2019. *Escherichia hermannii* Infections in Humans: A Systematic Review. *Tropical Medicine and Infections in Humans: A Systematic Review*. 4(1):17
- 51) Izard D., Gavini F., Trinel P.A., Leclerc H. 1981. Desoxyribonucleic acid relatedness between *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter amnigenus* sp nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 31:35–42
- 52) Izumi Erika, Pires Dominuques Patricia, Marques de Bittencourt Elisa, Suzart Sérgio. 2005. Hemagglutinating and hemolytic activities of *Enterococcus faecalis* strains isolated from different human clinical sources. *Research in Microbiology*. 156 (4): 583-587

- 53) Janda Michael J., Abbott L. Sharon. 2021. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: "Enterobacterales"): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. *Clinical Microbiology Reviews*. 34:2
- 54) Kaewpoowat Quanhathai, Permpalung Nitipong, Sentochnik E. Deborah. 2013. Emerging Escherichia Pathogen. American Society for Microbiology. *Journal of Clinical Microbiolog.* 51: 8
- 55) Kaushal Jyoti, Mehandia Seema, Singh Gursahran, Raina Arun, Arya Kumar Shailendra. 2018. Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 16: 192-199
- 56) Kawalec Anna, Zwolinska Danuta. 2022. Emerging Role of Microbiome in the Prevention of Urinary Tract Infections in Children. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(2): 870
- 57) Kim Sik Kwang. 2016. Human Meningitis-Associated Escherichia coli. *EcoSal Plus*. 7 (1): 10
- 58) Kleerebezem Michiel, Hols Pascal, Bernard Elvis, Rolain Thomas, Zhou Miaomiao, Siezen J. Roland, Bron A. Peter. 2010. The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiology Reviews*. 34(2): 199-230
- 59) Klumpp Stefan, Zhang Zhongge, Hwa Terence. 2009. Growth Rate-Dependent Global Effects on Gene Expression in Bacteria. *Cell*. 139(7): 1366-1375
- 60) Kofr H.E. Imke, Meier-Kolthoff P. Jan, Adriaenssens M. Evelien, Kropinski M. Andrew, Nimtz Manfred, Rohde Manfred, Raaij van J. Mark, Wittmann Johannes. 2019. Still Something to Discover: Novel Insights into Escherichia coli Phage Diversity and Taxonomy. *Viruses, National Library of Medicine*. 11(5): 454
- 61) Kumar Vinod, Ashok Somasundar, Park Sunghoon. 2013. Recent advances in biological production of 3-hydroxypropionic acid. *Biotechnology Advances*. 31(6): 945-961
- 62) Laughon E. Barbara, Syed A. Salam, Loesche J. Walter. 1981. API ZYM System for Identification of *Bacteroides* spp., *Capnocytophaga* spp. and Spirochetes of Oral Origin. *Journal of Clinical Microbiology*. 97-102
- 63) Lee Jin-Hyung, Lee Jintae. 2010. Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*. 34 (4): 426-444
- 64) Leung K.C. Alexander, Wong H.C. Alex, Leung A.M. Amy, Hon L. Kam. 2019. Urinary Tract Infection in Children. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discover. National Library of Medicine*. 13(1): 2-18

- 65) Liao Huiping, Zhang Yuchao, Guo Wei, Wang Xi, Wang Hailong, Ye Haocheng, Wu Kai. 2021. Characterization of the Blood and Cerebrospinal Fluid Microbiome in Children with Bacterial Meningitis and Its Potential Correlation with Inflammation. *American Society for Microbiology, mSystems*. 6:3
- 66) Lugli G.A., Milani C., Turrone F., Duranti S., Mancabelli L., Mangifesta M., Ferrario C., Modesto M., Mattarelli P., Jiri K., van Sinderen D., Ventura M. 2017. Comparative genomic and phylogenomic analyses of the Bifidobacteriaceae family. *BMC Genomics*. 18:568
- 67) Luoto R., Ruuskanen O., Waris M., Kalliomaki M., Salminen S., Isolauri E. 2014. Prebiotic and probiotic supplementation prevents rhinovirus infections in preterm infants: a randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 133:405–413
- 68) Mady Eman A., Doghish Ahmed S., El-Dakrouy Walaa A., Elkhawaga Samy Y., Ismail Ahmed, El-Mahdy Hesham A., Elsakka Elsayed G.E., El-Husseiny Hussein M. 2023. Impact of the mother's gut microbiota on infant microbiome and brain development. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 150: 105195
- 69) Manero Albert, Blanch R. Anicet. 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. *American Society for Microbiology*. 65: 10
- 70) Marchesi Julian R., Ravel Jacques. 2015. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 3. 31
- 71) McGuire M.K., Bode L., Brooker S.L., Foster J., Kamau-Mbuthia E.W., Kamundia E.W., Kvist L.J., Lackey K.A., Manzano S., Mbugua S., McGuire M.A., Meehan C.L., Sellen D.W., Moore S.E., Otoo G.E., Prentice A.M., Price W.J., Shafii B., Placek C., Robertson B., Ruiz L., Rodriguez J.M., Pareja R.G., Williams J.E. 2017. What's normal? Oligosaccharide concentrations and profiles in milk produced by healthy women vary geographically. *American Journal of Clinical Nutrition*. 105:1086–1100
- 72) Milani Christian, Duranti Sabrina, Bottacini Francesca, Casey Eoghan, Turrone Francesca, Mahony Jennifer. 2017. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 81:4
- 73) Mitsuoka T. 2014. Establishment of Intestinal Bacteriology. *Biosci Microbiota Food Health*. 33(3): 99–116
- 74) Mitsuoka T., Hayakawa K. 1973. Die Faekal Flora bei Menschen I. Die Zusammensetzung der Faekalflora der verschiedenen Altersgruppen. *Zbl Bakt Hyg I Orig* 233: 333–342
- 75) Nataro P. James, Kaper B. James. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *American Society for Microbiology. Clinical Microbiology Reviews*. 11:1

- 76) Nunzio De Cosimo, Bartoletti Riccardo, Tubaro Andrea, Simonato Alchiede, Ficarra Vincenzo. 2021. Role of D-Mannose in the Prevention of Recurrent Uncomplicated Cystitis: State of the Art and Future Perspectives. *Antibiotics*. 10(4): 373
- 77) O'Hara Mohr Caroline, Brenner W. Frances, Miller Michael J. 2000. Classification, Identification, and Clinical Significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clinical Microbiology Reviews*. 13: 4
- 78) Oviano Marina, Gómara Marta, Barba José Maria, Revillo José Maria, Barbeyto Pedro Luis, Bou Germán. 2017. Towards the early detection of  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae by MALDI-TOF MS analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 72 (8): 2259-2262
- 79) Pakbin Babak, Brück Manuel Wolfram, Brück B. Thomas. 2023. Molecular Mechanisms of *Shigella* Pathogenesis; Recent Advances. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(3): 2448
- 80) Pakbin Babak, Brück Manuel Wolfram, Rossen A. W. John. 2021. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(18): 9922
- 81) Palmer Chana, Bik M. Elisabeth, DiGiulio B. Daniel, Relman A David, Brown O. Patrick. 2007. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biol* 5(7): e177
- 82) Parte A.C., Sardà Carbasse J., Meier-Kolthoff J.P., Reimer L.C. Göker M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 5607-5612; DOI: 10.1099/ijsem.0.004332  
<https://www.bacterio.net/>
- 83) Prell Christine, Koletzko Berthold. 2016. Breastfeeding and Complementary Feeding. *Deutsches Arzteblatt International*. 113(25): 435-444
- 84) Ratnam S., March S.B., Almed R., Bezanson G.S. Kasatiya S. 1988 *Journal of Clinical Microbiology*. 26: 2006-2012.
- 85) Roberfroid M., Gibson G.R., Hoyles L., McCartney A.L., Rastall R., Rowland I., Wolvers D., Watzl B., Szajewska H., Stahl B., Guarner F., Respondek F., Whelan K., Coxam V., Davicco M.J., Leotoing L., Wittrant Y., Delzenne N.M., Cani P.D., Neyrinck A.M., Meheust A. 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*. 104(2):S1–S63
- 86) Rossi Maddalena, Amaretti Alberto, Raimondi Stefano. 2011. Folate Production by Probiotic Bacteria. *Nutrients*. 3 (1): 118-134



- 87) Samonis G., Karageorgopoulos E. D., Kofteridis P. D., Matthaiou K. D., Sidiropoulou V., Maraki S., Falagas E. M. 2008. Citrobacter infections in a general hospital: characteristics and outcomes. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 28: 61-68
- 88) Seesahai Judi, Church T. P., Asztalos E., Eng-Chong M., Arbus J., Banihani R. 2021. Neonates with Maternal Colonization of Carbapenemase-Producing, Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: A Mini-Review and a Suggested Guide for Preventing Neonatal Infection. *Children*. 8(5): 399
- 89) Shokryazdan Parisa, Sieo Chin CHin, Kalavathy Ramasamy, Liang Boo Juan, Alitheen Banu Noorjahan, Jahromi Mohammad Faseleh, Ho Yin Wan. 2014. Probiotic Potential of Lactobacillus Strains with Antimicrobial Activity against Some Human Pathogenic Strains. *BioMed Research International*. 927268
- 90) Simonsen A. Kari, Anderson-Berry L. Ann, Delair F. Shirley, Davies H. Dele. 2014. Early-Onset Neonatal Sepsis. *American Society for Microbiology: Clinical Microbiology Reviews*. 27:1
- 91) Sonnenborn Ulrich, Schulze Jürgen. 2009. The non-pathogenic Escherichia coli strain Nissle 1917 – features of a versatile probiotic. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 21(3-4): 122-158
- 92) Splichalova Alla, Splichal Igor, Sonnenborn Ulrich, Rada Vojtěch. 2014. A modified MacConkey agar for selective enumeration of necrotogenic E. coli O55 and probiotic E. coli Nissle 1917. *Journal of Microbiological Methods*. 104: 82-86
- 93) Strydom Amy, Cawthorn Donna-Maree, Cameron Michelle, Witthuhn Corli R. 2012. Species of Cronobacter – A review of recent advances in the genus and their significance in infant formula milk. *International Dairy Journal*. 27(1-2): 3-12
- 94) Thum Caroline, Cookson Adrian L., Otter Don E., McNabb Warren C., Hodgkinson Alison J., Dyer Jolon, Roy Nicole C. 2012. Can Nutritional Modulation of Maternal Intestinal Microbiota Influence the Development of the Infant Gastrointestinal Tract? *The Journal of Nutrition*. 142 (11): 1921-1928
- 95) Vlasova N. Anastazia, Kandasamy Sukumar, Chattha S. Kuldeep, Rajashekara Gireesh, Sajf J. Linda. 2016. Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 172: 72-84
- 96) Wijetunge D. S. S., Gongati S., DebRoy C., Kim K. S., Couraud P. O., Romero I. A., Weksler B., Kariyawasam S. 2015. Characterizing the pathotype of neonatal meningitis causing Escherichia coli (NMEC). *BMC Microbiology*. 15: 211

- 97) Wlodarska M., Luo C., Kolde R., d'Hennezel E., Annand J. W., Heim C. E., Krastel P., Schmitt E. K., Omar A. S., Creasey E. A., Garner A. L., Mohammadi S., O'Connell D. J., Abubucker S., Arthur T. D., et al. 2017. Indoleacrylic acid produced by commensal *Peptostreptococcus* species suppresses inflammation. *Cell Host & Microbe* 22(1): 25–37.e6.
- 98) Yang Jing, Long Haiyan, Hu Ya, Feng Yu, McNally Alan, Zong Zhiyong. 2021. *Klebsiella oxytoca* Complex: Update on Taxonomy, Antimicrobial Resistance, and Virulence. *Antimicrobial Chemotherapy*. American Society for Microbiology. 35: 1
- 99) Yang Lan, Arbab Sakandar Hafiz, Sun Zhihong, Zhang Heping. 2021. Recent advances of intestinal microbiota transmission from mother to infant. *Journal of Functional Foods*. 87: 104719
- 100) Yu Keyi, Huang Zhenzhou, Lan Ruiting, Morris Glenn J., Xiao Yue, Fu Songzhe, Gao He, Bai Xuemei, Li Kun, Wang Duochun. 2023. Genomic Characterisation of Opportunistic Pathogen *Kluyvera* Reveals a Novel CTX-M Subgroup. *Microorganism*. 11(12): 2836
- 101) Zhang Yucheng, Tan Peng, Zhao Ying, Ma Xi. 2022. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: intestinal pathogenesis mechanisms and colonization resistance by gut microbiota. *Gut Microbes*. 14:1
- 102) Zhao Z.-H., Xin F.-Z., Xue Y., Hu Z., Han Y., Ma F., Zhou D., Liu X.-L., Cui A., Liu Z., Liu Y., Gao J., Pan Q., Li Y., Fan J.-G. 2019. Indole-3-propionic acid inhibits gut dysbiosis and endotoxin leakage to attenuate steatohepatitis in rats. *Experimental and Molecular Medicine* 51(9): 1–14.
- 103) Zhou Yang, Zhou Zuying, Zheng Lin, Gong Zipeng, Li Yueting, Jin Yang, Huang Yong, Chi Mingyan. 2023. Urinary Tract Infections Caused by Uropathogenic *Escherichia coli*: Mechanisms of Infection and Treatment Options. *International Journal of Molecular Sciences*. 24 (13): 10537

## **9 Samostatné přílohy**

### **9.1 API ZYM**

**Tabulka 1:** Kompletní tabulka API ZYM testu

Kmen	Druhová identita	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	ODEČTĚL
X12	<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Knobová K.
X29	<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Knobová K.
B65	<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Ingrhbelli E.
B66	<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Ingrhbelli E.
B68	<i>Enterobacter asubriae</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	Ingrhbelli E.
B69	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	Ingrhbelli E.
B5	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	Ingrhbelli E.
B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	Ingrhbelli E.
B4	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	Ingrhbelli E.
B52	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Ingrhbelli E.
X28	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-	+	+	-	-	-	Knobová K.
X1	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	+	+	-	-	-	Knobová K.
X17	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Knobová K.
B19	<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Ingrhbelli E.
X3	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+/-	-	-	-	-	Knobová K.
X5	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+/-	-	-	-	-	Knobová K.
X11	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Knobová K.
B11	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Ingrhbelli E.
B14	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Ingrhbelli E.
B15	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Ingrhbelli E.
B27	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Ingrhbelli E.
B28	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Ingrhbelli E.
B34	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Ingrhbelli E.
B35	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Ingrhbelli E.
B45	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Ingrhbelli E.
B46	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Ingrhbelli E.
B49	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Ingrhbelli E.
B50	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Ingrhbelli E.
NC	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Ingrhbelli E.
C	<i>Escherichia hermannii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Knobová K.
X18	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+	-	+/-	+	-	-	-	Knobová K.
B67	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Ingrhbelli E.
X19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Knobová K.
B70	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Ingrhbelli E.
B7	<i>Klebsiella variicola</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-	-	Knobová K.
B38	<i>Morganella morganii</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Knobová K.
B22	<i>Serratia marcescens</i>	-	+	+/-	+/-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Knobová K.