

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Květoslava Šupáková

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Enterokokové infekce  
Bakalářská práce

2024

Květoslava Šupáková

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Květoslava Šupáková**  
Osobní číslo: **C21233**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Enterokokové infekce**  
Téma práce anglicky: **Enterococcal Infections**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte rešerši zaměřenou na charakteristiku rodu *Enterococcus*.
2. Shrňte onemocnění způsobená enterokoky.
3. Popište laboratorní průkaz zástupců rodu *Enterococcus*.
4. Vyhodnoťte možnosti prevence a léčby.
5. Zaměřte se na rezistenci enterokoků na antibiotika.
6. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se směrnicí č. 7/2019 Univerzity Pardubice "Pravidla pro odevzdání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací".

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Markéta Vyržalová, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.**  
děkan

L.S.

**doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

**Prohlašuji:**

Práci s názvem Enterokokové infekce jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 12.6.2024

Květoslava Šupáková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat RNDr. Markétě Vydržalové, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce, cenné rady a pomoc při jejím zpracování. Ráda bych také poděkovala své rodině za podporu během studia.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce se zabývá bakteriemi rodu *Enterococcus* a infekcemi, které způsobují. V práci je shrnuta historie enterokoků, taxonomie, morfologie, biochemické vlastnosti a faktory virulence. Rovněž je popsána laboratorní diagnostika enterokoků. Pozornost je také věnována problematice antibiotické rezistence.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Enterokoky, infekce, antibiotika

## **TITLE**

Enterococcal infections

## **ANNOTATION**

The bachelor thesis deals with bacteria of the genus *Enterococcus* and infections that cause. The thesis summarizes the history of enterococci, taxonomy, morphology, biochemical properties and virulence factors. It also describes the laboratory diagnosis of enterococci. Attention is also paid to the issue of antibiotic resistance.

## **KEYWORDS**

Enterococci, infections, antibiotics

<b>OBSAH</b>	
<b>SEZNAM ILUSTRACÍ .....</b>	<b>10</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>10</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....</b>	<b>11</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>12</b>
<b>1 Charakteristika rodu <i>Enterococcus</i> .....</b>	<b>13</b>
1.1 Historie.....	13
1.2 Základní rozdělení enterokoků .....	14
1.3. Morfologie bakteriálních buněk a antigenní struktura.....	15
1.3.1 Bakteriální stěna .....	15
1.4. Faktory virulence .....	16
1.4.1 Agregační látka .....	16
1.4.2 Želatináza.....	17
1.4.3 Enterokokový fibronektin vázající protein A .....	17
1.4.4 Pili.....	18
1.4.5 Hyaluronidáza.....	18
1.4.6 Cytolysin.....	19
1.5 Epidemiologie.....	19
1.5.1 Výskyt.....	20
1.5.2 Přestup ze střeva do krevního řečiště.....	21
<b>2 Onemocnění vyvolaná enterokoky .....</b>	<b>22</b>
2.1. Bakteriémie.....	22
2.2. Infekce močových cest.....	23
2.3 Akutní pyelonefritida.....	24
2.4 Nitrobřišní infekce .....	25
2.5 Endokarditida.....	25
2.6. Meningitida.....	26
2.7 Endoftalmitida .....	28
<b>3 Laboratorní diagnostika.....</b>	<b>30</b>
3.1 Vyšetřovaný materiál.....	30

3.1.1 Biofilm .....	30
3.2 Kultivace .....	30
3.2.1 Krevní agar .....	30
3.2.2 Slanetz-Bartley agar .....	31
3.2.3 Bile Esculin Agar .....	32
3.2.4 Agar s kolistinem a kyselinou nalidixovou .....	32
3.3 Biochemické testy .....	33
3.3.1 Katalázový test .....	33
3.3.2 Hydrolýza eskulinu .....	33
3.3.3 Fermentace cukrů .....	34
3.3.4 Test utilizace citrátu .....	34
3.4. Molekulární metody .....	35
3.4.1 Polymerázová řetězová reakce .....	35
3.4.2 Gelová elektroforéza v pulzním poli .....	35
3.4.3 Multilokusová sekvenční typizace .....	36
3.5 Serologické testy .....	36
3.5.1 ELISA .....	37
3.5.2 Western blot .....	37
3.6 Testy citlivosti na antibiotika .....	37
3.6.1 Disková difúzní metoda .....	38
3.6.2 Antimikrobiální gradientová metoda .....	38
3.6.3 Bujónová diluční metoda .....	38
<b>4 Citlivost enterokoků na antibiotika .....</b>	<b>40</b>
4.1 Rezistence .....	41
4.1.1 Rezistence na $\beta$ -laktamová antibiotika .....	41
4.1.2 Rezistence na glykopeptidová antibiotika .....	41
4.1.3 Rezistence na linezolid .....	42
4.1.4 Rezistence na aminoglykosidy .....	42
4.1.5 Rezistence na tetracykliny .....	43
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>44</b>
<b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>45</b>

## **SEZNAM ILUSTRACÍ**

<b>Obrázek 1</b> Cesty přenosu enterokoků .....	21
<b>Obrázek 2</b> Krevní agar Columbia .....	31

## **SEZNAM TABULEK**

<b>Tabulka 1</b> Seznam druhů enterokoků .....	14
<b>Tabulka 2</b> Citlivost na antibiotika .....	40

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

<b>DNA</b>	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)
<b>HAI</b>	Nemocniční infekce (Healthcare-Associated Infections)
<b>MSCRAMM</b>	Mikrobiální povrchové komponenty rozpoznávající molekuly adhezivní matrice
<b>PFGE</b>	Gelová elektroforéza v pulzním poli (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)
<b>MIC</b>	Minimální inhibiční koncentrace (Minimum inhibitory concentration)
<b>rRNA</b>	Riozomální ribonukleová kyselina (Ribosomal ribonucleic acid)
<b>E.</b>	Enterokok (Enterococcus)
<b>CylM</b>	Protein-methyltransferáza (Protein-methyltransferase)

## ÚVOD

Enterokoky jsou běžně přítomné gram-positivní bakterie ve střevní mikroflóře člověka. Nicméně, pokud se dostanou do nevhodného prostředí nebo když je oslaben imunitní systém hostitele, mohou způsobit infekce s různou závažností a komplikacemi. Tyto bakterie jsou známé svou schopností vykazovat rezistenci vůči mnoha antibiotikům, což vážně komplikuje léčbu jejich infekcí.

Tato bakalářská práce si klade za cíl poskytnout ucelený přehled o enterokokových infekcích, zahrnující jejich epidemiologii, patofyziologii, klinický průběh a možnosti léčby. Dále se zaměřuje na aktuální trendy v diagnostice enterokokových infekcí pro jejich prevenci. Vzhledem k rostoucí rezistenci enterokoků vůči léčivům je důležité neustále vyvíjet nové přístupy k jejich kontrole.

První část práce detailně popisuje charakteristiku enterokoků, jejich výskyt v přirozeném prostředí člověka a faktory, které ovlivňují jejich virulenci.

Druhá část se zabývá klinickým významem enterokokových infekcí, včetně typických syndromů, které mohou vyvolat, a faktorů ovlivňujících jejich výskyt.

Závěrečná část se věnuje současným strategiím diagnostiky, léčby a prevence těchto infekcí. Tato práce přispívá k hlubšímu porozumění problematice enterokokových infekcí a poskytuje relevantní informace pro lékařskou praxi a veřejné zdraví, s důrazem na jejich potenciální závažnost a rostoucí výzvy v oblasti léčby.

# 1 Charakteristika rodu *Enterococcus*

Rod *Enterococcus* zahrnuje grampozitivní, fakultativně anaerobní bakterie, které jsou přirozenou součástí střevní mikroflóry lidí a zvířat. Jsou kulovitého tvaru (koky) a často se vyskytují ve dvojicích nebo krátkých řetězcích. Enterokoky jsou schopné přežít v různých prostředích, včetně vysoké koncentrace soli, teplotních extrémů a širokého rozmezí pH (Selleck, 2019; Lebreton, 2014).

## 1.1 Historie

Enterokoky jsou bakterie, které dnes známe jako běžné obyvatelé lidského střevního traktu. Poprvé je popsal Thiercelin (1899). Ve svém výzkumu identifikoval grampozitivní diplokoky, které se běžně nacházely v gastrointestinálním traktu, a navrhl pro ně označení "Enterocoque" zdůrazňující střevní původ. Dále bylo prokázáno, že může pronikat do krevního řečiště a způsobit závažné zdravotní komplikace. MacCallum a Hastings (1899) popsali úmrtí 37letého pacienta na sepsi spojenou s endokarditidou. Mikroorganismus, který prokázali pojmenovali *Micrococcus zymogenes* dnes označovaný jako *Enterococcus faecalis*. Pacientovi se dařilo stále hůř, a přes veškerou snahu lékařů, se infekce rozšířila natolik, že jeho stav se stal kritickým. Endokarditida vedla k těžkému poškození srdce a vedla ke smrti pacienta. MacCallum a Hastings (1899) ve svém hlášení podrobně popsali, jak přítomnost těchto enterokoků přispěla ke zhoršení pacientova stavu, a nakonec k jeho úmrtí. Tento případ byl jedním z prvních, který ukázal, jak nebezpečný může být enterokok, když opustí střevo a infikuje jiné části těla (Selleck, 2019; Lebreton, 2014).

V roce 1906 použili Andrewes a Horder (1906) jméno *Streptococcus faecalis* k popisu organismu, který pocházel z fekálních zdrojů a měl schopnost srážet mléko. Název "*faecalis*" byl zvolen proto, aby zdůraznil, že tento streptokok je charakteristický pro střevní prostředí. V roce 1937 Sherman (1937) navrhl systém, který rozděloval streptokoky do čtyř skupin: pyogenní, viridans, mléčné a enterokoky. Mikroorganismy se dělily do skupin podle výskytu, růstových vlastností a citlivosti k vnějším vlivům. K rozdělení enterokoků a streptokoků do dvou rodů došlo v 60. letech 20 století (Lebreton, 2014).

V roce 1970 navrhl Kalina (1970) vytvoření taxonu *Enterococcus* na základě buněčného uspořádání a fenotypových charakteristik druhů ve skupině enterokoků. Ale formálně byl tento rod přijat až v roce 1984, kdy dva objevitelé Schleifer a Kilpper-Balz (1984) poskytlí genetický důkaz o tom, že se *S. faecalis* a *S. faecium* od ostatních členů rodu *Streptococcus* liší. V roce 2002 už byl rozsáhlý přehled o existenci 23 odlišných druhů rodu *Enterococcus* (Schwartzman a kol., 2023).

## 1.2 Základní rozdělení enterokoků

Enterokoky jsou bakterie, které jsou známé svými schopnostmi mléčného kvašení. S více než 50 druhy je tento rod třetí největší v rámci bakterií mléčného kvašení, za rody *Lactobacillus* a *Streptococcus*. Rod *Enterococcus* se vyznačuje značnou rozmanitostí a jeho klasifikace byla postupně zpřesňována pomocí moderních molekulárních technik, jako je sekvenování 16S rRNA a DNA-DNA hybridizace. Tyto bakterie jsou přirozenou součástí mikrobiomu mnoha organismů, včetně lidí, a často se nacházejí v gastrointestinálním traktu. V tabulce 1 jsou popsány druhy a výskyt enterokoků. Enterokoky se vyskytují i v prostředí, což je důvodem, proč se některé druhy považují za indikátory fekální kontaminace (Braňek, 2019).

Tabulka 1 Seznam druhů enterokoků

Upraveno dle: (Torres a kol., 2018)

<b><u>Druh</u></b>	<b><u>Výskyt</u></b>	<b><u>Druh</u></b>	<b><u>Výskyt</u></b>	<b><u>Druh</u></b>	<b><u>Výskyt</u></b>
<i>E.faecium</i>	Člověk	<i>E.faecalis</i>	Člověk	<i>E.casseliflavus</i>	Půda
<i>E.ratti</i>	Krysa	<i>E.haemoperoxidus</i>	Voda	<i>E.cecorum</i>	Kuře
<i>E.durans</i>	Mléko	<i>E.silesiacus</i>	Voda	<i>E.columbae</i>	Ptáci
<i>E.hirae</i>	Prase,kuře	<i>E.moraviensis</i>	Voda	<i>E.saccharolyticus</i>	Mléko
<i>E.mundtii</i>	Rostliny	<i>E.caccae</i>	Člověk	<i>E.italicus</i>	Sýry
<i>E.villorum</i>	Prase	<i>E.termitis</i>	Termiti	<i>E.sulfureus</i>	Rostliny
<i>E.thailandicus</i>	Ferment	<i>E.quebecensis</i>	Voda	<i>E.gallinarum</i>	Slepice
<i>E.phoeniculicola</i>	Ptáci	<i>E.asini</i>	Osel	<i>E.aquimarinus</i>	M. voda
<i>E.dispar</i>	Člověk	<i>E.canintestini</i>	Pes	<i>E.canis</i>	Pes
<i>E.pallens</i>	Člověk	<i>E.raffinosis</i>	Člověk	<i>E.avium</i>	Člověk
<i>E.hermannensis</i>	Pes	<i>E.gilvus</i>	Člověk	<i>E.devriesei</i>	Skot
<i>E.malodoratus</i>	Sýry				

Poznámka: E. – *Enterococcus*

V roce 2018 rod *Enterococcus* obsahoval přes 50 druhů a mezi nejvýznamnější patřily *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*. Tyto druhy jsou celosvětově považovány jako nejrozšířenější nozokomiální patogeny. Byly také jako jedny z prvních detekovány v lidském střevě. Mezi nejnovější druhy v roce 2023 přibylo osmnáct nových enterokoků, kteří se zařazují do celkového počtu rodu *Enterococcus*. Mezi ně zařazujeme *E. clewelli*, *E. dunnyi*, *E. courvalini*, u kterých je hostitel africký šváb. Další hostitel, který ovládl rod je vážka, a tak vznikl *E. ikei*, *E. lemimoi*, *E. palustris*. Také želva jako hostitel u *E. moelleringi*, *E. ferrettii*, *E. murrayi*, *E. testudinum*. A další druhy, u kterých je hostitel motýl, kuře či krocan je *E. willemsii*, *E. leclercqi*, *E. mangunii*, *E. huntleyi* (Schwartzman a kol., 2023).

### **1.3. Morfologie bakteriálních buněk a antigenní struktura**

Enterokoky jsou typem grampozitivních bakterií, které mají kulovitý nebo vejčitý tvar a obvykle se vyskytují v párech nebo řetězcích. (Lebreton, 2014). Buňky enterokoků nejsou schopné tvořit spory a nejsou pohyblivé. Enterokoky reagují pozitivně s antisérem skupiny D dle Lancefieldové, což je jedna z klíčových vlastností, která je odlišuje od jiných bakterií. Tato reakce pomáhá při jejich identifikaci v laboratorních testech. (Sedláček a kol., 2013).

#### **1.3.1 Bakteriální stěna**

Grampozitivní bakterie mají buněčný obal složený převážně z peptidoglykanu. Na rozdíl od gramnegativních bakterií, které mají vnější membránu tak mají grampozitivní bakterie silnější vrstvy peptidoglykanu, což jim poskytuje dodatečnou strukturu a ochranu. Připojeny k peptidoglykanovým vrstvám jsou teichoové kyseliny, což jsou dlouhé aniontové polymery, které hrají roli v pevnosti buněčné stěny i v patogenezi. Existují dvě hlavní podtřídy teichoových kyselin, a to lipoteichoové kyseliny, které jsou přichyceny k lipidům ve vnitřní membráně a stěnové teichoové kyseliny, které jsou kovalentně spojené s peptidoglykanem. Kromě těchto struktur vylučují grampozitivní bakterie i další glykopolymery, známé jako exopolysacharidy. Tyto exopolysacharidy jsou dlouhé řetězce, které se propojují a vytvářejí biofilm, ochrannou vrstvu, která pomáhá bakteriím přilnout k povrchům a bránit se vnějším vlivům, včetně antibiotik a imunitních buněk (Rajagopal, 2017).

## 1.4. Faktory virulence

Enterokoky hrají hlavní roli v lidském těle díky mnoha faktorům virulence spojených s tvorbou buněčné stěny, želatinázy, enterokokového povrchového proteinu, tvorby biofilmu a agregační látky (Farahání, 2016). Faktory virulence se podílejí na přichycení k hostitelským buňkám nebo proteinům jako je extracelulární matrix a podílejí se také na imunitním úniku (Abril a kol., 2022).

### 1.4.1 Agregační látka

Agregační látka je velký povrchový protein produkovaný bakterií *E. faecalis*, který hraje klíčovou roli v bakteriální agregaci neboli shlukování. Tato schopnost agregace může být pro bakterie užitečná, například při tvorbě biofilmů nebo přenosu genetického materiálu.

Dosud byly identifikovány tři různé typy agregační látky: Asa1, Asc10 a Asp1. Každý z těchto proteinů je kódován vlastním konjugovaným plazmidem, což je malý kruhový fragment DNA, který může být přenášén mezi bakteriemi. Plazmidy, které kódují tyto proteiny, jsou označovány jako pAD1, pCF10 a pPD1, v tomto pořadí. Tyto plazmidy umožňují bakteriím sdílet genetickou informaci a mohou hrát významnou roli v šíření faktorů virulence nebo rezistence vůči antibiotikům. Schopnost enterokoků přenášét takové plazmidy přispívá k jejich adaptabilitě a odolnosti, což může představovat výzvu zejména v klinickém prostředí, kde mohou způsobovat vážné infekce a podporovat šíření rezistence vůči lékům (Madsen a kol., 2017). Asc10, také známý jako agregační faktor, je nejpoužívanějším z agregačních proteinů a je kódován plazmidem pCF10, který se vylučuje v krevním řečišti savců. Tento faktor pomáhá bakteriím přilnout nejen k jiným bakteriím, ale také k eukaryotickým buňkám, což přispívá k jejich přežití a schopnosti vytvářet biofilmy. Když bakterie typu F+ (které mají plazmidy schopné konjugace) detekují malé peptidy známé jako pohlavní feromony, začnou produkovat agregační látku Asa1 na svém povrchu. Tento proces usnadňuje spojování bakterií, což je základní mechanismus, který zvyšuje jejich rezistenci vůči antibiotikům. Když se agregační látka váže na enterokokovou vazebnou látku, dochází k shlukování bakterií, což nejen posiluje jejich odolnost, ale také napomáhá tvorbě biofilmů. Agregační látka hraje také významnou roli při interakci s imunitním systémem hostitele. Pomáhá enterokokům snižovat aktivitu superoxidu, což je mechanismus, kterým makrofágy (buňky imunitního systému) likvidují patogeny. Díky tomu může *E. faecalis* přežít déle uvnitř makrofágů, čímž se zvyšuje jeho schopnost způsobovat infekce (Şchiopu a kol., 2023).

### 1.4.2 Želatináza

Želatináza neboli GeIE je extracelulární zinko-metaloproteáza produkovaná bakterií *E. faecalis*. Tato proteáza je známá svým významným příspěvkem k virulenci bakterií díky své schopnosti rozkládat různé substráty v hostitelském organismu. Mezi tyto substráty patří kolagen, fibrin, fibrinogen a některé složky komplementu, konkrétně C3 a C3a. Rozpad těchto klíčových proteinů oslabuje strukturu tkání a může narušit imunitní odpověď, což usnadňuje infekci. GeIE je často označována jako želatináza, protože je schopná rozkládat želatinu. Tato zinko-metaloproteáza je jednou ze dvou hlavních proteáz produkovaných *E. faecalis* a tou druhou je serinová proteáza. Tyto proteázy spolupracují na rozkládání různých bílkovin a zvyšují schopnost bakterie šířit se v hostitelských tkáních (Madsen a kol., 2017). Želatináza je enzym tvořený 318 aminokyselinami. Aby se projevila její proteázová aktivita, musí se odstranit 14 C-terminálních aminokyselin. Regulace produkce želatinázy probíhá pomocí dvousložkového systému. První složkou je membránově vázaná histidinkináza, která reaguje na změny v extracelulárním prostředí, jako je pH, osmolarita nebo přítomnost nebezpečných látek. Když histidinkináza detekuje tyto změny, autofosforyluje se. Druhou složkou je regulátor odezvy, který ovlivňuje transkripci DNA, což vede k buněčné odpovědi. Želatináza hraje důležitou roli ve tvorbě biofilmu, zejména tím, že snižuje hladinu kolagenového adhezního proteinu, což pomáhá bakteriím přilnout k jiným buňkám nebo povrchům. Adhezní protein je adhezin ukotvený v buněčné stěně a má klíčovou roli v přilnavosti *E. faecalis* k imobilizovanému kolagenu. Kromě toho má želatináza vliv na enzym N-acetylglukosaminidázu, který se podílí na tvorbě extracelulární DNA, což je důležitý krok v procesu tvorby biofilmu. Zatímco želatináza stimuluje N- cetylglukosaminidázu, serinová proteáza funguje jako inhibitor tohoto procesu. N- cetylglukosaminidáza je autolysin, což znamená, že může rozkládat vlastní buněčnou stěnu, což vede k uvolňování dalších složek do extracelulárního matrixu, čímž podporuje tvorbu biofilmu a zvyšuje odolnost bakterií (Șchiopu a kol., 2023).

### 1.4.3 Enterokokový fibronektin vázající protein A

Enterokokový fibronektin vázající protein A neboli EfbA je adhezin, což je protein nacházející se na povrchu bakterie *E. faecalis*, který hraje klíčovou roli v jejím přilnutí k fibronektinu. Fibronektin je glykoprotein, který se vyskytuje v různých částech těla, mimo jiné i v extracelulárním matrixu srdečního endotelu. Když dojde k poškození tkáně srdce, například kvůli zánětu nebo poranění, tělo začne reagovat tvorbou sraženin. Fibrin a krevní destičky se hromadí v místě poškození a společně vytvářejí sterilní vegetaci, což je

forma ochranné vrstvy, která má podpořit hojení. *E. faecalis* se díky EfbA může připojit k této vegetaci, což mu umožňuje kolonizovat poškozenou oblast. To je obzvláště problematické, protože takové přilnutí může vést k vážným infekcím, jako je endokarditida, což je zánět vnitřní výstelky srdce a srdečních chlopní. Porozumění tomu, jak EfbA umožňuje bakteriím přilnout k srdeční tkáni, je klíčové pro vývoj nových léčebných strategií a prevenci těchto nebezpečných infekcí (Chilambi a kol., 2021, Madsen a kol., 2017)

#### **1.4.4 Pili**

Pili jsou vláknité proteinové struktury, které se nacházejí na povrchu bakterií. Slouží jako klíčové spojení mezi bakteriemi a jejich okolním prostředím. Díky pilům mohou bakterie přilnout k povrchům, k jiným buňkám, nebo dokonce k hostitelským tkáním, což je zásadní pro infekční proces. Studie, které zkoumaly sadu mutantů Ebp což je soustava genů a proteinů v bakteriích ukázaly, že pro tvorbu těchto pilů jsou nezbytné tři geny, známé jako Ebp A, B, C. Zejména EbpC hraje zásadní roli při polymeraci pilů. Tyto pili se stávají viditelné pro imunitní systém hostitele, což spouští imunitní reakci během infekce. Výzkumy také odhalily, že mutace v genových proteinech EbpA a sortázaC výrazně omezují schopnost bakteriálních kmenů vytvářet biofilmy. Biofilmy jsou husté kolonie bakterií, které jsou připojené k povrchům a obklopené ochrannou matricí, což je činí odolnějšími vůči antibiotikům a imunitnímu systému. Tvorba biofilmů je klíčová pro dlouhodobé přežití a šíření infekcí (Hancock a kol., 2014, Madsen a kol., 2017).

#### **1.4.5 Hyaluronidáza**

Extracelulární hyaluronidáza je enzym, který může rozkládat kyselinu hyaluronovou, která je hlavní složkou tělního matrixu. Tato schopnost umožňuje bakteriím poškodit tkáňové struktury a pronikat do hlubších vrstev hostitelského organismu. V genomu enterokoků byly nalezeny dva geny, které kódují extracelulární hyaluronidázu, hylA a hylB. Tyto dva geny jsou nejčastější mezi enterokoky a hrají významnou roli ve schopnosti těchto bakterií rozkládat kyselinu hyaluronovou, což je kritické pro jejich patogenitu. Rozpad kyseliny hyaluronové oslabuje extracelulární matrix, což usnadňuje bakteriím šíření a může vést k vážným infekcím. Tato schopnost poškozovat tělní matrix dělá z hyaluronidázy významný faktor virulence, který může ovlivnit průběh bakteriální infekce a představuje klíčový cíl pro léčbu a prevenci šíření enterokoků (Akter, 2023).

### 1.4.6 Cytolysin

Cytolysin je toxin složený ze dvou malých peptidů, známých jako CylL L (velká podjednotka a CylL S (malá podjednotka), které mají schopnost působit na savčí buňky i grampozitivní bakterie. I když jejich toxicita je relativně nízká, projevuje se významnou terminální aktivitou vůči těmto buňkám. Tyto dva peptidy patří do skupiny ribozomálně syntetizovaných a posttranslačně modifikovaných peptidů. Ty jsou odvozeny z prekurzorových peptidů, které obsahují dvě klíčové části, a to vedoucí N-koncový peptid a C-koncový jadrový peptid. Vedoucí část působí jako rozpoznávací motiv pro posttranslační modifikační enzymy, které katalyzují změny v jadrovém peptidu. CylL\_L a CylL\_S obsahují celkem šestnáct modifikovaných zbytků, které jsou součástí specifických struktur, známých jako lanthipeptidy. Proces jejich instalace je řízen enzymem CylM. Tento proces je zásadní pro vytvoření aktivní formy cytolysinu, což umožňuje těmto peptidům působit na cílové buňky, narušovat jejich membrány a způsobovat buněčnou smrt (Rahman a kol., 2021). Když cytolysin působí v prostředí, dochází k narušení buněčných membrán, což vede k uvolnění obsahu buňky, včetně DNA. Tato extracelulární DNA může následně sloužit jako spoj při tvorbě biofilmu, čímž poskytuje strukturu a stabilitu bakteriálním koloniím (Şchiopu a kol., 2023).

### 1.5 Epidemiologie

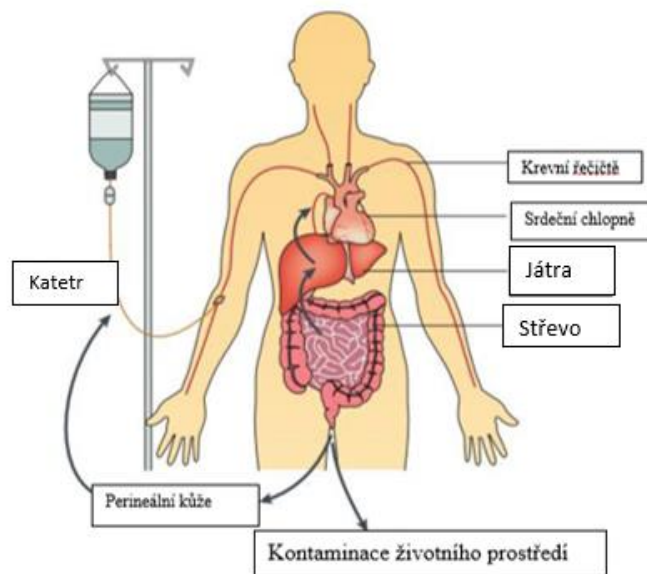
*E. faecalis* je oportunní patogen schopný zapříčinit infekce, včetně endokarditidy nebo infekcí močových cest (Parthasarathy a kol., 2020). Tento rod je známý svou schopností přežít v náročných podmínkách, což mu umožňuje odolávat různým vlivům a také se stát jednou z hlavních příčin multirezistentních nemocničních infekcí. Enterokoky mají pozoruhodnou schopnost vyvinout rezistenci vůči antibiotikům, což je činí zvláště obtížně léčitelnými v klinickém prostředí. Tato rezistence je důsledkem jejich adaptabilního charakteru a schopnosti odolávat nepříznivým podmínkám, což je činí nebezpečnými, zejména v nemocnicích a zdravotnických zařízeních (Gaca, Lemos, 2019). K přenosu dochází jak kontaktem se zdravotnickým personálem a neživými předměty tak i předměty jako jsou zábradlí, nemocniční závěsy a teploměry se sondami do uší nebo klávesnice ošetřovatelské stanice (Selleck a kol., 2019). Jen v roce 2017 bylo ve Spojených státech přibližně 55 000 infekcí vyvolané enterokoky, což vedlo k 5 400 úmrtím. Infekce ve zdravotnických zařízeních, jsou více objevovány u pacientů s oslabenou imunitou (Revtovich a kol., 2021). K infekci dochází většinou, když enterokoky překonají obranyschopnost hostitele a patologické změny jsou z přímé aktivity toxinu nebo také nepřímo z poškození v důsledku zánětlivé reakce (Selleck a kol., 2019).

### 1.5.1 Výskyt

Druhy *E. faecalis* a *E. faecium*, se běžně vyskytují jako střevní komenzálové a jsou často lokalizované u lidí nebo zvířat (Revtovich a kol., 2021). Primární bariérou pro invazi do střeva a kolonizaci orálně získanými mikroby je pH žaludku (Selleck a kol., 2019). pH lidského gastrointestinálním traktu se může odlišovat až o šest řádů od vysoce kyselého prostředí spodního žaludku až po mírně zásadité prostředí v distálním tenkém střevě (Gaca a kol., 2019). Výzkum ukázal, že bakterie rodu *Enterococcus* mají schopnost přizpůsobit se extrémně kyselým podmínkám. Bylo prokázáno, že když jsou vystaveny pH 4,8 po dobu 15–30 minut, dokážou se chránit před smrtícími účinky extrémnějších kyselin při pH 3,2. Tento mechanismus adaptivní reakce umožňuje enterokokům přežít v měnících se kyselých podmínkách. Kromě rezistence vůči antibiotikům ovlivňují vlastnosti enterokoků i imunitní faktory. Například *E. faecalis* produkuje extracelulární superoxid, což může poškodit DNA buněk v tlustém střevě a způsobit chromozomovou nestabilitu. To může vést k lokálnímu zánětu a narušení funkce střevní sliznice, což může být spojené s rozvojem karcinomů. Tyto charakteristiky enterokoků jsou spojovány s onemocněními, jako je zánět střev, Crohnova choroba nebo ulcerózní kolitida. Pacienti s těmito stavy často podstupují vyšetření stolice, aby se zjistila přítomnost těchto bakterií a další markery zánětu (Selleck a kol., 2019). Pacientům, kteří už někdy byli osídleni mikrobem, a nejen enterokokem nákaza střev někdy vůbec nezmizí. Mikroorganismus se vyskytuje v těle řadu měsíců a může se nacházet i v okolí nakaženého po nějakou dobu (Bayjanov a kol., 2019). Enterokoky se také nacházejí na jiných místech v lidském těle, a to v dutině ústní, na kůži nebo v ženském urogenitálním traktu. Enterokoky lze prokázat v potravinách, v půdě a ve vodě (Gaca a kol., 2019).

### 1.5.2 Přestup ze střeva do krevního řečiště

Enterokoky se přirozeně vyskytují ve střevním traktu, zejména v tlustém střevě. Když se přemnoží, zvyšuje se riziko, že se dostanou do krevního řečiště a rozšíří se do dalších částí těla, kde mohou vyvolat infekci. Tento proces, známý jako enterokoková translokace, může být důsledkem přechodu bakterií střevní bariérou (Obrázek1). Některé studie dokonce naznačují, že enterokoky mohou být fagocytovány buňkami ve střevě nebo jinými buňkami lymfatického systému, což jim umožňuje cestovat skrze lymfatické cévy. Pokud se dostanou do krevního řečiště nebo do lymfatického systému ve větším množství, může to způsobit infekce, jako jsou abscesy nebo systémové šíření bakterií v těle. Bakterie v nízkých hladinách mohou také proniknout střevní bariérou a tímto způsobem získat přístup do krevního řečiště. Když k tomu dojde, zejména u lidí s oslabeným imunitním systémem, může to vést k vážným infekcím a potenciálně život ohrožujícím komplikacím (Chaguzaa kol., 2023, Selleck a kol., 2019).



**Obrázek 1** Cesty přenosu enterokoků ze střevního rezervoáru hospitalizovaného pacienta

(Upraveno z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6629438/>)

## 2 Onemocnění vyvolaná enterokoky

Infekce způsobené bakteriemi rodu *Enterococcus* se nejčastěji vyskytují u hospitalizovaných pacientů. Enterokoky jsou zodpovědné za různé typy infekcí, včetně infekcí močových cest, endokarditidy, intraabdominální infekce a bakteriémie. Jsou jedním z nejběžnějších patogenů způsobujících nemocniční infekce (HAI) a zároveň jsou spojovány s komunitní endokarditidou. Tyto bakterie se snadno izolují z různých hostitelů, jako jsou hmyz, savci a bezobratlí. Kvůli jejich výskytu u lidí a zvířat je možné je najít i v domácím prostředí, které sdílí lidé a zvířata. Mohou se vyskytovat na rostlinách, ve vodě a v půdě. Přestože se v těchto prostředích nacházejí, obvykle se zde nerozmnožují ve velkém množství (Selleck a kol., 2019)

### 2.1. Bakteriémie

Bakteriémie znamená, že se bakterie dostaly do krevního oběhu. Tato situace je závažná, protože může vést k vážným komplikacím a je spojena s vysokou úmrtností. Bakteriémie je jedním z nejčastějších způsobů, jak se infekce šíří po těle, a může být předzvěstí dalších nebezpečných stavů, jako je sepsa nebo infekce srdečních chlopní (Selleck a kol., 2019). Hlavním zdrojem bakteriémie způsobené enterokoky je urogenitální trakt, ale infekce může také vznikat z intraabdominálních oblastí, nebo z infekcí měkkých tkání. Enterokoková bakteriémie se liší od bakteriemií způsobených *Staphylococcus aureus* tím, že enterokoky obvykle neosidlují vzdálené orgány nebo nevytvářejí abscesy tak často jako *S. aureus*. Přesto je úmrtnost u enterokokové bakteriémie vysoká, dosahuje až 46 %, což poukazuje na náročnost léčby a vážnost tohoto stavu. Enterokoková bakteriémie je častější u druhu *E. faecium* než u *E. faecalis*, což může být způsobeno jak šířením bakterie, tak oslabením imunitního systému hostitele. Výzkumy ukazují, že starší pacienti jsou náchylnější k enterokokové bakteriémii, zejména pokud mají jiné zdravotní problémy, jako je diabetes mellitus, srdeční onemocnění, nebo pokud prošli chirurgickými zákroky či transplantacemi (Higuira a kol., 2014).

Studie zkoumaly různé zdroje enterokoků, od endodontických onemocnění až po translokaci komenzálních enterokoků v gastrointestinálním traktu. Výsledky často ukazovaly, že bakterie mohou pronikat do krevního oběhu prostřednictvím přímých cest, jako je katetrizace nebo kontaminace zdravotnických prostředků. Existují také nepřímé cesty, kde enterokoky kolonizují močové nebo gastrointestinální cesty, což může vést k bakteriémii. Hlavním problémem spojeným s těmito bakteriemi je riziko vzniku endokarditidy, což je zánět vnitřní výstelky srdce. Enterokoková endokarditida může být akutní, s rychlým nástupem,

nebo chronická, která je obtížněji léčitelná a nese větší riziko úmrtnosti. Zajímavé je, že enterokoková bakteriémie bez endokarditidy je častější než ta s endokarditidou. Navzdory tomu, že enterokoky jsou běžnými obyvateli ústní dutiny a jsou také důležitým faktorem v endodontických onemocněních, nezdá se, že by byly častou příčinou infekcí vycházejících z ústní dutiny. To je pozoruhodné, protože by se dalo očekávat, že ložiska v ústní dutině by byla spojena s vyšším rizikem infekcí. Výzkum neprokázal, že by infekce ústní dutiny byly běžným zdrojem enterokokových infekcí, což je zajímavý závěr, který vyžaduje další výzkum (Barnes a kol., 2021).

## 2.2. Infekce močových cest

Infekce močových cest představují celosvětově jedno z nejběžnějších onemocnění vyvolané bakteriemi napříč všemi pohlavími a věkovými skupinami (Anjum a kol., 2023). Infekce dolních močových cest, jako jsou cystitida, prostatitida a epididymitida, se vyskytují především u starších mužů. Infekce horních močových cest, které mohou způsobit bakteriémii, jsou rovněž častější u starších mužů a často jsou spojeny s pobytem v nemocnici. Na odděleních intenzivní péče jsou tyto infekce obzvláště běžné, často kvůli nedostatečnému dodržování zdravotnických postupů nebo z důvodu zavádění katetrů a dalších zdravotnických nástrojů (Higuita a kol., 2014). Infekce močových cest jsou jednou z nejrozšířenějších zdravotních problémů na světě, postihující více než 404,6 milionů lidí. Bohužel přes 200 000 lidí ročně na tuto nemoc umírá. Nejvíce ohroženi jsou těhotné ženy a starší muži. Ačkoli ženy mají tendenci tuto infekci prodělat alespoň jednou za život, jejich tělo si s ní obvykle poradí lépe než u mužů (Anjum a kol., 2023).

U pacientů, kteří podstoupili transplantaci ledviny, jsou infekce močových cest nejčastějším onemocněním během prvního roku po transplantaci. Zhruba polovina těchto pacientů navíc vyvine bakteriurii, což znamená přítomnost bakterií v moči. Pokud dojde ke kolonizaci močových cest enterokoky, často to vede k symptomatické infekci. Léčba těchto infekcí může být složitá, zejména vzhledem k omezeným možnostem léčby antibiotikem vankomycinem a vysoké mutagenitě enterokoků. Z tohoto důvodu je klíčové zaměřit se na prevenci a včasnou léčbu, i když pacient nevykazuje žádné příznaky.

Asymptomatická bakteriurie, tedy přítomnost bakterií v moči bez zjevných příznaků, je běžná a normální u mnoha lidí. U pacientů, kteří jsou v nemocnici delší dobu, je pravděpodobné, že kontrola moči odhalí enterokokovou kolonizaci v močových cestách. To zdůrazňuje potřebu pečlivého sledování a vhodných preventivních opatření, aby se předešlo vážnějším infekcím, zejména u pacientů po transplantaci ledviny, kteří jsou náchylnější

k infekcím a komplikacím (Selleck a kol., 2019, Anjum a kol., 2023).

Mezi lety 2011 a 2014 byly enterokoky nejčastějšími grampozitivními bakteriemi, které způsobovaly infekce močových cest spojené s katetrem u nemocniční populace. Tento trend poukazuje na významnou roli enterokoků v infekcích spojených s používáním katetrů a zdůrazňuje potřebu zvýšené pozornosti při prevenci a léčbě těchto infekcí (Selleck a kol., 2019). Nejúčinnějším způsobem, jak zabránit šíření infekcí spojených s katetry, je prevence. To zahrnuje především minimalizaci zbytečné katetrizace a co nejrychlejší odstranění katetrů, jakmile už nejsou klinicky nezbytné. Studie ukázaly, že jedním z efektivních preventivních opatření je potažení silikonových katetrů speciálními nevyluhovatelými kationtovými filmy. Tato úprava dosahuje téměř stoprocentní účinnosti v prevenci infekcí močových cest spojených s katetrem. Další inovativní metodou, jak zabránit tvorbě biofilmu na katetrech, je použití nízkoenergetických akustických vln. Tato metoda pracuje s piezoelektrickým ovladačem připojeným ke katétru, který vytváří vibrace o frekvenci mezi 100 a 300 kHz (kilohertz). Tyto vibrace pomáhají narušit adhezi bakterií na povrchu katetru a tím zabraňují tvorbě biofilmu. Vzhledem k riziku infekcí spojených s katetry nemocnice často provádějí pravidelnou výměnu katetrů, aby snížily riziko infekce a zajistily optimální péči o pacienty. Prevence je klíčová pro snížení výskytu infekcí a komplikací souvisejících s katetry (Anjum a kol., 2023).

### **2.3 Akutní pyelonefritida**

V roce 2016 byl zaznamenán případ infekce způsobené bakterií *Enterococcus hirae* u 78leté pacientky. Tato žena byla převezena do nemocnice s anamnézou fibrilace síní a chronického onemocnění ledvin, přičemž vykazovala příznaky jako náhlé mdloby, nevolnost a celkovou slabost. *E. hirae* je bakterie běžně spojovaná s infekcemi u zvířat, zejména u koček, potkanů a ptáků. U lidí obvykle pronikne do těla při onemocnění ledvin nebo během hospitalizace. Známé případy infekcí způsobených *E. hirae* zahrnují infekce nativních a protetických srdečních chlopní, spondylodiscitidu, septikémii a akutní pyelonefritidu. Je pravděpodobné, že skutečný výskyt infekcí způsobených touto bakterií je podhodnocen, protože může být nesprávně identifikována kvůli nedostatečným testům nebo nesprávné klasifikaci enterokoků na základě jejich schopnosti fermentovat cukry (Päosinho a kol., 2016). Infekce způsobené bakterií *E. hirae* jsou u zvířat poměrně běžné, ale přenos na člověka je vzácný. Jedním z takových případů byl v roce 2021 57letý muž, pravděpodobně alkoholik, který byl převezen do nemocnice s horečkou a zimnicí. Zpočátku se lékaři domnívali, že se jedná o příznaky jaterního selhání. Při vyšetření pomocí CT (počítačová

tomografie) se však objevil mírný otok ledvin, a analýza moči následně potvrdila přítomnost *E. hirae*. Pacient popíral jakýkoliv kontakt se zvířaty, což ztěžovalo určení zdroje infekce. Přesto byla bakterie jednoznačně identifikována a potvrdilo se, že způsobila infekci močového traktu (Nakamura a kol., 2021).

## 2.4 Nitrobřišní infekce

Podle popisu Patricie Mbouche (2023) byla identifikována bakterie *Enterococcus thailandicus*, která způsobila závažnou infekci nitrobřišních tkání. Tento případ byl zaznamenán u pacienta s dlouhodobým alkoholismem, který utrpěl perforaci sigmoidní divertikulitidy, což vedlo k fekální peritonitidě. Oslabení imunitního systému, způsobené chronickou konzumací alkoholu, tabáku a konopí, přispělo k rozvoji této vážné infekce. Bakterie byla ve vzorku odebraném při chirurgickém zákroku a její přítomnost v takovém kontextu byla poprvé zaznamenána. Tento objev vyvolal otázky o tom, zda bakterie *E. thailandicus* je způsobena přímo konzumací alkoholu, nebo zda její výskyt souvisí se změnou prostředí, jako je střevní mikroflóra oslabená dlouhodobým zneužíváním látek. Tento první nález podtrhuje potřebu dalšího výzkumu, aby se lépe pochopily příčiny a rizikové faktory spojené s tímto druhem (Mbouche a kol., 2023). Peritonitida je závažná infekce, která postihuje výstelku břišní dutiny, známou jako peritoneum. Tato infekce se často spojuje s onemocněním jater, zejména s jaterní cirhózou, nebo se objevuje u pacientů, kteří podstupují peritoneální dialýzu. V těchto situacích mohou enterokoky způsobit monomikrobiální infekci, což znamená, že infekce je způsobena pouze těmito bakteriemi. Monomikrobiální infekce způsobené enterokoky mohou být obzvláště nebezpečné, protože tyto bakterie jsou často rezistentní vůči antibiotikům a mohou snadno proniknout do břišní dutiny, kde způsobují zánět a další komplikace. U pacientů s oslabeným imunitním systémem nebo jinými zdravotními problémy může být peritonitida zvláště závažná a vyžaduje rychlou a účinnou léčbu (Higuita a kol., 2014).

## 2.5 Endokarditida

Z infekcí způsobených enterokoky je infekční endokarditida terapeuticky nejnáročnější. Endokarditidu způsobuje nejčastěji druh *E. faecalis* (Selleck a kol., 2019). Enterokoky jsou příčinou 5 až 15 % případů infekční endokarditidy, a tato hodnota zůstává poměrně stabilní i přes měnící se trendy v jiných oblastech medicíny. Infekce srdečních chlopní způsobená enterokoky se vyskytuje převážně u starších lidí a studie ukazují, že je častěji spojována s muži než se ženami. Typickým začátkem tohoto onemocnění je bakteriémie, která následně vede k endokarditidě. Bakterie obvykle pocházejí z gastrointestinálního nebo genitourinárního

traktu. Infekce postihuje převážně levou stranu srdce, což je obecně častější než infekce na pravé straně. Enterokoková endokarditida je většinou spojena se zdravotní péčí, podobně jako jiné enterokokové infekce. Klinicky je charakterizována spíše příznaky subakutní infekce, často projevující se srdečním selháním než embolickými příhodami. Nicméně může dojít i k rychle postupujícímu průběhu, což zvyšuje riziko komplikací (Higuira a kol., 2014).

U pacientů po transplantaci aortální chlopně je kladen velký důraz na prevenci infekcí, zejména těch způsobených enterokoky. Transplantace se provádí ve sterilním operačním sále s vysoce filtrovaným vzduchem nebo s moderními systémy laminárního proudění, které minimalizují riziko kontaminace. Přístup na takové operační sály je omezený, a zdravotničtí pracovníci používají standardní chirurgické pláště a roušky. Kromě toho jsou sestry na operačních sálech dobře vyškolené, aby zajistily, že postupy jsou dodržovány a sterilita není narušena. Pokud operace proběhne bez komplikací a bez kontaminace, pacient je co nejdříve propuštěn domů, aby se snížilo riziko infekce v nemocničním prostředí (Conen a kol., 2021, Pericàs a kol., 2021).

V roce 2021 byla 86letá pacientka převezena na pohotovost kvůli dušnosti a sípání. Její anamnéza zahrnovala hypertenzi, rektální karcinom, idiopatickou intersticiální pneumonii a chronické onemocnění ledvin. Rentgen hrudníku ukázal bilaterální intersticiální opacity, pleurální výpotek a mírnou dilataci srdce. Po provedení několika testů byla u pacientky diagnostikována infekce *Enterococcus casseliflavus*, která byla identifikována metodou MALDI-TOF (metoda desorpce/ionizace laserem asistovaná matricí-doba letu), tedy hmotnostní spektrometrie s asistovanou laserovou desorpcí/ionizací na matrici. Vzhledem k povaze infekce a zdravotnímu stavu pacientky bylo rozhodnuto o transplantaci aortální chlopně, kterou podstoupila třináctý den svého pobytu v nemocnici. Po úspěšné operaci byla pacientka okamžitě propuštěna z nemocnice a předepsána jí antibiotika ampicilin a gentamycin jako následná léčba. Tento rychlý postup po operaci byl nezbytný k minimalizaci rizika další infekce v nemocničním prostředí a k urychlení jejího zotavení doma (Okumura a kol., 2021).

## 2.6. Meningitida

Meningitida je vzácné onemocnění, které může být způsobeno oportunním patogenem *Enterococcus gallinarum*. Tento patogen způsobuje jak nozokomiální infekce, tak i infekce centrálního nervového systému. V posledních letech bylo pozorováno, že pacienti s oslabeným imunitním systémem jsou vůči infekci touto bakterií obzvláště náchylní. *E. gallinarum* je méně častý druh enterokoků, ale může vyvolat závažné komplikace, zejména u těch, jejichž imunitní obrana je již narušena. Meningitida způsobená tímto patogenem vyžaduje okamžitou lékařskou

péči a může představovat významnou výzvu pro léčbu kvůli rezistenci na některá antibiotika a tendenci k rychlému šíření v nemocničním prostředí. Tento stav zdůrazňuje potřebu důkladného sledování pacientů s oslabeným imunitním systémem a přísného dodržování hygienických protokolů v nemocnicích (Zhao a kol., 2018).

Infekce centrálního nervového systému způsobená rodem *Enterococcus* jsou vzácné. Studie podle Iffata Khanum (2019) zkoumala výsledky pacientů s bakteriální meningitidou za určité časové období, přičemž analyzovala klinické záznamy, mikrobiologické údaje a další laboratorní výsledky. Ze šesti pacientů, u kterých byla diagnostikována bakteriální meningitida způsobená enterokoky, všichni podstoupili neurochirurgické zákroky. Výskyt meningitidy po neurochirurgii může být spojen s komplikacemi během nebo po operaci, které poskytují bakteriím vstup do centrálního nervového systému. Enterokoky způsobující meningitidu jsou často rezistentní na antibiotika, což komplikuje léčbu a ztěžuje stanovení nejlepšího terapeutického postupu. To vyžaduje potřebu pečlivé prevence infekcí při neurochirurgických zákrocích a další výzkum k určení nejúčinnější léčby těchto vzácných, ale závažných infekcí (Khanum a kol., 2019).

Pacientka, která byla přijata do nemocnice s chronickou myelomonocytární leukémií, byla diagnostikována s akutní leukémií. Během hospitalizace byla léčena chemoterapií a antibiotiky, ale její stav se nelepšil. Po měsíci jí lékaři provedli transplantaci krvetvorných kmenových buněk, aby se pokusili zvrátit průběh onemocnění. Podstoupila náročné myeloablativní kondicionování s fludarabinem, melfalanem a ozářením celého těla. Několik dní po transplantaci začala mít horečku, což přineslo nové komplikace. Krevní kultury, odebrané z jejího centrálního žilního katétru a dvou dalších míst vpichu, ukázaly přítomnost bakterie *E. gallinarum*, což byl varovný signál. Tento patogen je totiž rezistentní na běžně používaný vankomycin. Pacientka začala pociťovat bolest očí a zaznamenala opacitu sklivce, což vedlo k odchlípení zadního sklivce a cévnatky. Lékaři provedli magnetickou rezonanci, která potvrdila podezření na meningitidu. Domnívali se, že infekce mohla vzniknout v důsledku chirurgického zákroku, který pacientka podstoupila. I přes veškeré snahy lékařského týmu se její stav zhoršoval, což vedlo k dalšímu hledání řešení a léčebných možností (Friedman a kol., 2021). Vzácným jevem je enterokoková meningitida, zejména se vyskytující u starší populace. Nicméně byl popsán případ, kdy čtyřletý chlapec, který byl nakažen žloutenkou, byl přivezen do nemocnice s vysokou horečkou, na kterou vankomycin nepůsobil. Navzdory různým antibiotikům podávaným postupně se stav chlapce nezlepšoval. Nakonec, i přes neúčinnost antibiotické terapie, byla provedena lumbální punkce patnáctý den od jeho přijetí do nemocnice. Z lumbální punkce byly odebrány vzorky mozkomíšního moku

a po kultivaci byla zaznamenána přítomnost *E. gallinarum*. Izolovaný kmen této bakterie prokázal citlivost na linezolid, vankomycin a tetracyklin. Tento nálezn poskytl cennou informaci pro další léčebný postup a umožnil lékařům zvolit účinnou antibiotickou terapii v boji proti infekci (Li a kol., 2018).

## 2.7 Endoftalmitida

Endoftalmitida je vzácná, ale velmi vážná forma očního zánětu způsobeného bakteriální infekcí. Pokud není léčena včas, může vést k nevratné ztrátě zraku. Tato choroba se dělí do dvou hlavních typů: exogenní a endogenní.

Exogenní endoftalmitida se objevuje, když patogeny způsobující infekci proniknou přímo do oka. To může nastat například po úrazu oka nebo po očním chirurgickém zákroku. Naproti tomu endogenní endoftalmitida vzniká, když se infekční agens dostane do oka prostřednictvím krevního oběhu, tedy z jiného ohniska infekce v těle. Včasná diagnóza a rychlý zásah lékařů jsou zásadní pro záchranu oka a zabránění vážným komplikacím. Pokud je endoftalmitida rozpoznána brzy, mohou lékaři zahájit vhodnou léčbu, která často zahrnuje podávání antibiotik nebo antifungálních léků přímo do oka, aby se potlačila infekce. Rychlá akce může být rozdílem mezi zachráněním zraku a jeho nevratnou ztrátou (Sheu, 2017).

*E. casseliflavus*, druh rodu *Enterococcus*, byl objeven v roce 1968 a je charakterizován svou pohyblivostí. Tento druh se běžně vyskytuje v přírodě, zejména na rostlinách a v půdě, ale může také kolonizovat lidskou populaci, což někdy vede k infekcím, zejména u lidí s oslabeným imunitním systémem nebo těch, kteří užívají drogy. Infekce způsobené *E. casseliflavus* mohou být zvláště problematické, protože tato bakterie, jako mnoho jiných enterokoků, vykazuje odolnost vůči vankomycinu, což ztěžuje léčbu. Obvykle se v těchto případech používá kombinace intravenózního ampicilinu a linezolidu, aby se infekce potlačila. Druh *E. casseliflavus* byl také izolován ze zeleniny a hospodářských zvířat, což ukazuje na jeho schopnost přežít v různých prostředích. To naznačuje, že kromě lidských hostitelů může tato bakterie kontaminovat i potravinový řetězec, což může být další zdroj infekcí (Kandarakis a kol., 2023). Čtyřletý chlapec byl přivezen do nemocnice s oteklým okem poté, co si hrál na zahradě s vodní pistolí. Zpočátku to vypadalo jako běžný dětský úraz, ale během dvou hodin se objevily alarmující příznaky: chlapec začal vidět bílé tečky a pomalu ztrácel zrak. Rodiče ho okamžitě odvezli do nemocnice, kde jej vyšetřil oftalmolog. Vyšetření odhalilo, že chlapec má endoftalmitidu, což je vážný oční zánět způsobený infekcí. Lékaři museli jednat rychle, protože tato situace může vést k nevratné ztrátě

zraku. Chlapec byl okamžitě přijat na operační sál, kde mu odebrali vzorek z oka pro diagnostiku. Mikrobiologické vyšetření vzorku potvrdilo přítomnost bakterie *E. casseliflavus*, což byl šokující nález, protože tento druh se obvykle vyskytuje v půdě a na rostlinách. Zřejmě byla vodní pistole kontaminovaná, což vedlo k této vážné infekci. Lékaři zahájili léčbu antibiotiky, na která *E. casseliflavus* není rezistentní, a díky včasné diagnóze a rychlé reakci se podařilo infekci potlačit a zachránit chlapcovo oko. Tento případ poukázal na rizika spojená s kontaminovanými hračkami a zdůraznil důležitost rychlé reakce na neobvyklé příznaky u dětí (Berenger a kol., 2015).

## 3 Laboratorní diagnostika

### 3.1 Vyšetřovaný materiál

V diagnostice enterokoků je vyšetřovaným materiálem nejčastěji krev, moč, stolice, hnis, mozkomíšni mok, různé stěry z ran a vaginální sliznice (Selleck a kol., 2019).

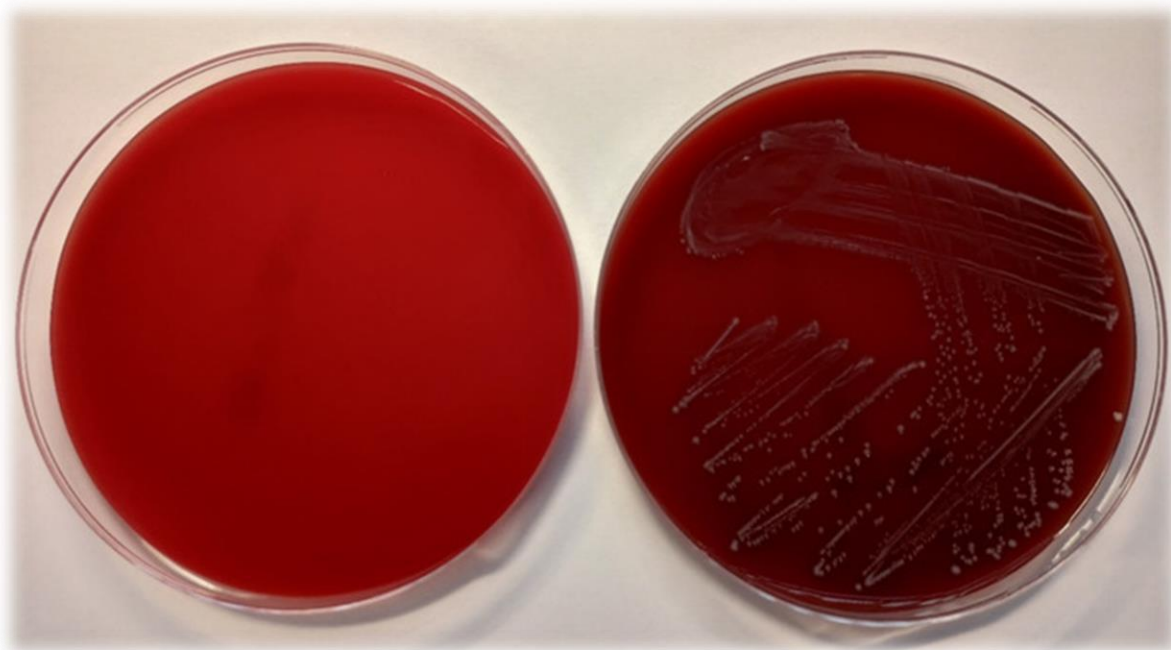
#### 3.1.1 Biofilm

V rámci experimentu pro docílení vícedruhového biofilmu byla kultura *E. faecalis* nejprve kultivována na krevním agaru při aerobních podmínkách. Po inkubaci byla bakterie přenesena do bujónu Brain Heart Infusion s přidavkem 5% sacharózy. Brain Heart Infusion je výživné médium bohaté na proteiny a sacharóza může stimulovat tvorbu biofilmů, což je důležité při studiu mechanismů bakteriální adheze a kolonizace. Následná inkubace probíhala při teplotě 37° C. Po této fázi byla kultura ponechána stát při stejné teplotě dalších 24 hodin. Tato statická fáze umožňuje lepší tvorbu biofilmů, což může být klíčové pro následnou analýzu. Zkoumání biofilmů je důležité, protože tyto struktury představují způsob, jakým se bakterie mohou uchytit na povrchích a tvořit složité společenství. Výsledky z experimentu odhalily přítomnost různých bakterií, což znamená, že *E. faecalis* je schopen spolupracovat s dalšími druhy při tvorbě vícedruhových biofilmů. Tento poznatek je významný, protože biofilmy často představují odolné struktury, které mohou být rezistentní vůči antibiotikům, a jsou běžné v klinických prostředích (Hage a kol., 2023).

### 3.2 Kultivace

#### 3.2.1 Krevní agar

Krevní agar, obohacený o 5% beraní krve, poskytuje bohaté prostředí pro růst bakterií a je často využíván k izolaci enterokoků. Toto médium umožňuje bakteriím růst a je užitečné pro pozorování hemolytických vlastností. Nejvýznamnějším krevním agarem pro enterokoky je Columbia agar (obrázek 2) (Kawano a kol., 2018).



**Obrázek 2** Krevní agar Columbia bez bakteriální kultury (vlevo) a nárůst *E. faecalis* (vpravo) po 18 hodinách inkubace při 35°C

Převzato z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8781533/>

### 3.2.2 Slanetz-Bartley agar

Selektivně diagnostickým agarem určeným pro kultivaci enterokoků je Slanetz-Bartley agar. Tento agar je vhodný pro izolaci enterokoků, zejména z odpadních a jiných vodních zdrojů. Je to důležité médium, protože enterokoky mohou indikovat kontaminaci vodních zdrojů a potenciální zdravotní rizika (Geissler a kol., 2024). Slanetz-Bartley agar byl například využit ve studii Raoudha Dziri (2016) v Tunisku, kde byl testován s přidavkem 8 µg/ml vankomycinu. Tato studie měla za cíl zjistit, zda se nově objevený druh *E. faecalis* z nemocničního prostředí v Tunisku ukáže jako rezistentní vůči vankomycinu, nebo zda na něj bude reagovat bez prokazatelných změn. Výsledky této studie prokázaly že v nemocničním prostředí se projevuje rezistence (Dziri a kol., 2016). Další výzkum proběhl v Itálii, kde byl Slanetz-Bartley agar použit pro kultivaci enterokoků z mořských vzorků. Byla prokázána prevalence rezistence na linezolid, což jsou další klíčová antibiotika používaná při léčbě bakteriálních infekcí. Agarové plotny byly obohaceny florfenikolem, což umožnilo rozpoznat enterokoky nesoucí specifické geny spojené s rezistencí na antibiotika (Fioriti a kol., 2021).

### 3.2.3 Bile Esculin Agar

Jedním z méně známých kultivačních médií používaných při práci s enterokoky je Bile Esculin Agar. Toto médium je zvláštní v tom, že obsahuje žlučové soli a eskulin, což jsou klíčové složky, které poskytují specifickou identifikaci enterokoků. Enterokoky totiž mají schopnost hydrolyzovat eskulin, a proto následkem této reakce rostou enterokoky v černých koloniích. Tato reakce je proto užitečná pro odlišení enterokoků od jiných bakterií. Další zajímavou vlastností tohoto média je vysoký obsah soli, konkrétně 6,5 % chloridu. Tato vysoká koncentrace soli vytváří selektivní prostředí, které upřednostňuje růst enterokoků, zatímco jiné bakterie, které nejsou schopny tolerovat vysoké koncentrace soli, nerostou. Díky tomu lze na tomto zařízení efektivně izolovat a identifikovat enterokoky i z komplexních vzorků. Bile Esculin Agar má také relativně vysoké pH, okolo 9,6, což může přispět k selektivnímu růstu některých bakterií. Toto médium je proto užitečné při diagnostice enterokokových infekcí a pro monitorování přítomnosti enterokoků v různých prostředích, například ve zdravotnictví nebo potravinářství (Khalidi a kol., 2019). Bile Esculin Agar je médium používané v různých mikrobiologických studiích, včetně výzkumu zaměřeného na zvířata. Ve studii Davedow (2020) byla prokázána rezistence na tylosin, což je antibiotikum, které se často používá v chovu dobytka. V této studii byl sledován skot, který byl krmen tylosin fosfátem, aby vědci zjistili, zda po určité době vznikne rezistence na toto antibiotikum.

### 3.2.4 Agar s kolistinem a kyselinou nalidixovou

Jedním z nejčastěji používaných kultivačních médií je médium obsahující kolistin a azid, známé také jako kolistin-nalidixová kyselina. Toto médium je vysoce selektivní a používá se pro izolaci gram-pozitivních bakterií, což je zvláště často užitečné při diagnostice různých infekcí. Jedna z nejčastějších nemocí, léčených kolistin-nalidixovou kyselinou, je infekce močových cest. Tato nemoc je velmi rozšířená, zejména mezi ženami. Ve studii zaměřené na identifikaci bakterií způsobujících infekce močových cest bylo zahrnuto 75 žen, které poskytly vzorky moči. Tyto vzorky byly testovány na kolistin-nalidixové kyseliny agaru v prostředí s 5% oxidem uhličitým. Spolu s tímto médiem byly přidány i další kultivační agary, aby bylo možné přesně určit, které mikroorganismy jsou zodpovědné za tyto infekce. Inkubace na agaru s kolistin-nalidixovou kyselinou probíhala po dobu 48 hodin při teplotě 35 °C. Po tomto inkubačním období bylo zjištěno, že ve většině vzorků se nacházela bakterie *E. faecalis*, která je jedním z hlavních původců infekcí močových cest. Díky tomu mohou lékaři přesně určit původ infekce a vybrat vhodnou léčbu pro pacienty (Price a kol., 2016).

### 3.3 Biochemické testy

#### 3.3.1 Katalázový test

Jedním z nejběžnějších biochemických testů v mikrobiologii je katalázový test. Tento test se používá k určení, zda bakterie má enzym katalázu, který rozkládá peroxid vodíku na vodu a kyslík. U většiny aerobních organismů, které potřebují kyslík k dýchání, je tento enzym přítomen a jeho činnost je důležitá pro odstranění škodlivých reaktivních forem kyslíku. Při provádění katalázového testu se vzorek bakteriální kultury smíchá s 3% roztokem peroxidu vodíku. Pokud bakterie obsahuje katalázu, rozklad peroxidu vodíku začne okamžitě a výsledkem je bouřlivá tvorba bublinek. Tento výsledek je zřetelným indikátorem pozitivního katalázového testu. Enterokoky jsou však specifické tím, že jsou kataláza-negativní. To znamená, že nemají enzym katalázu, a proto nedokážou rozložit peroxid vodíku tímto způsobem. Když se vzorek kmene *Enterococcus* smíchá s peroxidem vodíku, nedochází k žádné reakci, což potvrzuje negativní výsledek katalázového testu (Baureder a kol., 2014).

#### 3.3.2 Hydrolýza eskulinu

Jedním z důležitých biochemických testů v mikrobiologii je test na hydrolýzu eskulinu. Tento test umožňuje zjistit, zda bakterie obsahují enzymy, které dokáží rozkládat eskulin. Eskulin je glykosid, který při hydrolýze uvolňuje glukózu a eskuletin. Hydrolýza eskulinu je specifická pro určité bakterie, jako jsou některé druhy enterokoků. Při provádění testu na hydrolýzu eskulinu se bakterie kultivují na médiu, které obsahuje eskulin. Pokud bakterie dokáží eskulin hydrolyzovat, eskuletin reaguje s ionty železa v médiu a vytváří tmavý nebo černý pigment. Tento černý pigment je znakem pozitivního výsledku testu, což znamená, že bakterie jsou schopné hydrolýzy eskulinu. V Central Referral Hospital v Indii byl test na hydrolýzu eskulinu použit k rozlišení mezi bakteriemi z rodů *Enterococcus* a *Streptococcus*. Tato studie zahrnovala jak agarové plotny, tak zkumavky pro testování bakteriálních kmenů. Agarová metoda zahrnovala kultivaci bakterií na plotnách obohacených eskulinem a sledování tvorby černého pigmentu. Zkumavková metoda pracovala na podobném principu, ale s menším množstvím média ve zkumavkách. Výsledky této studie ukázaly, že některé druhy *Enterococcus* byly schopné hydrolýzy eskulinu, což se projevilo černým zbarvením média. *Streptococcus* tuto schopnost neměl, takže zůstávalo médium beze změny. Tento test je užitečný pro rozlišení mezi různými rody bakterií a pomáhá mikrobiologům identifikovat přítomnost enterokoků a dalších bakterií, které mohou být spojeny s určitými infekcemi nebo onemocněními (Yangzoma a kol., 2019).

### 3.3.3 Fermentace cukrů

Testy na fermentaci cukrů, jako je glukóza a laktóza, jsou klíčové pro identifikaci enterokoků a určení jejich druhové příslušnosti. Ve studii Javadem Raeisi (2017), byl zkoumán metabolismus turanózy, vzácného cukru, u izolátů *Enterococcus*, které byly rezistentní nebo citlivé na vankomycin. Metoda zahrnovala použití mikrotitračních destiček s 96 jamkami, do kterých bylo přidáno 150 µl živného bujónu bez cukru s různými koncentracemi turanózy (0,5 %, 0,7 % a 1 %). Následně byla do každé jamky přidána suspenze kultivovaných bakterií odpovídající 0,5 McFarlandovým standardům, což je metoda pro stanovení hustoty bakteriální kultury. Jako kontrola bylo použito živné médium s uranósou, ale bez bakterií. Mikrodestičky byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Po inkubaci byly výsledky vyhodnoceny metodou ELISA (enzymově spojený imunosorbentní test), která měří reakci enzymu spojenou s tvorbou kyseliny, což indikuje fermentaci. Tento test poskytl informace o schopnosti *Enterococcus* fermentovat turanózu a pomohl rozlišit mezi různými izoláty, což může být užitečné pro diagnostiku a další výzkum rezistence na antibiotika.

### 3.3.4 Test utilizace citrátu

Test utilizace citrátu jedním z méně obvyklých biochemických testů, který se používá například ve stomatologii. Je založen na schopnosti bakterií produkovat enzymy, které jim umožňují metabolizovat citrát, což je forma uhlíku. Tento test se provádí na speciálním médiu známém jako Simmonsův citrátový agar, který obsahuje citrát jako jediný zdroj uhlíku. Při pozitivním výsledku testu bakterie využívají citrát a uvolňují alkalické produkty. To způsobuje změnu barvy média z původní zelené na modrou. Tato změna barvy je jasným indikátorem toho, že bakterie jsou schopné metabolizovat citrát, což může být užitečné při identifikaci a klasifikaci různých mikroorganismů. Ve stomatologickém výzkumu byl tento test použit při zkoumání zubních náhrad, které mohou být kontaminované mikroorganismy. Během několika měsíců výzkumu byly ze zubních náhrad odebírány vzorky a prováděly se různé testy, včetně testu na citrát a testu na ureázu. Zatímco pozitivní výsledek testu na citrát indikuje, že bakterie mohou využívat citrát, testy na ureázu jsou u enterokoků obvykle negativní, což znamená, že nedokážou produkovat enzymy rozkládající močovinu (Singh a kol., 2023).

## 3.4. Molekulární metody

### 3.4.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce je extrémně citlivá a specifická metoda pro amplifikaci DNA, často využívaná při identifikaci enterokoků a dalších mikroorganismů. Tato metoda zahrnuje několik klíčových prvků, jako je templátová DNA, primery, nukleotidy a DNA polymeráza. Primery jsou krátké sekvence DNA, které se vážou na specifické oblasti cílové DNA, což umožňuje DNA polymeráze vytvořit nové řetězce. Polymerázová řetězová reakce začíná denaturací, kde se zahříváním DNA oddělí její komplementární řetězce. Následuje hybridizace, kdy primery vážou na DNA při nižší teplotě. Pak následuje prodlužování, při kterém DNA polymeráza přidává nukleotidy k primerům a vytváří nové DNA řetězce. Tento proces se opakuje několikrát, čímž se zvyšuje počet kopírovaných úseků DNA. Polymerázová řetězová reakce se provádí v termocykleru, který přesně řídí teplotu během každé fáze cyklu (Garibyan a Avashia, 2013). Polymerázová řetězová reakce může být využita k detekci specifických genů, jako je například gen *vanA* nebo *vanB*, které jsou spojeny s rezistencí vůči glykopeptidům, jako je vankomycin (Honarm a kol., 2012). Výsledky polymerázové řetězové reakce se obvykle vizualizují elektroforézou na agarózovém gelu, kde se DNA produkty oddělují podle velikosti. Na základě standartních molekulárních markerů se dá určit velikost amplifikovaných fragmentů (Garibyan a Avashia, 2013). Metoda polymerázová řetězová reakce byla použita k analýze endodontických vzorků z mléčných zubů s nekrotickou dření, kde převažovaly druhy *Enterococcus* a *Porphyromonas gingivalis*. I když předchozí výzkum naznačil, že *E. faecalis* tvoří malé procento mikrobiálních druhů v endodontických vzorcích, studie ukázala, že citlivější metody, jako je PCR, mohou přinést přesnější výsledky (Nalawade a kol., 2023).

### 3.4.2 Gelová elektroforéza v pulzním poli

Elektroforéza v pulzním poli (PFGE) je specializovaná technika používaná pro analýzu chromozomální DNA, která dokáže odhalit komplexní vzory a příbuznost mezi bakteriálními izoláty. Ve studii podle Rosany Huff (2020), která zkoumala enterokoky izolované ze vzorků stolice housenek *Heliconius erato phyllis*, byla tato metoda využita k určení přesného názvu bakterií, po předchozí detekci pomocí polymerázové řetězové reakce. Pro provedení PFGE bylo vybráno osm kmenů enterokoků, přičemž kritéria zahrnovala zdroj izolátu (například původ matky nebo vylíhlých larev), druh enterokoků a jejich antimikrobiální profil. Chromozomální DNA byla extrahována z těchto kmenů a elektroforéza byla provedena podle standardních postupů. PFGE se provádí ve speciálním zařízení, které využívá stupňované časy pulzů,

což umožňuje přesnější separaci větších fragmentů DNA. Po elektroforéze byly gely obarveny ethidium bromidem, což umožňuje vizualizaci DNA pod UV světlem. Pro analýzu vzorů PFGE byl použit software GelCompar II, který pomáhá interpretovat výsledky a vypočítat procento podobnosti mezi izoláty. K vyhodnocení příbuznosti mezi jednotlivými izoláty byl použit dendrogram, což je grafická reprezentace genetické příbuznosti. Hraniční úroveň podobnosti byla stanovena pro definici odlišnosti mezi izoláty. Výsledky ukázaly, že nejčastěji identifikovaným druhem byl *E. casseliflavus*, následovaný *E. mundtii* a *E. faecalis*. Tato studie demonstruje, jak může elektroforéza v pulzním poli pomoci identifikovat a charakterizovat různé druhy enterokoků a vyhodnotit jejich genetickou příbuznost.

### 3.4.3 Multilokusová sekvenční typizace

Základní genomová multilokusová sekvenční typizace spojuje výhody tradiční multilokusové sekvenční typizace podrobnými genetickými daty, které poskytuje celogenomová sekvenace. Tato komplexní metoda analyzuje celý genom a poskytuje detailní informace o genetické struktuře, variabilitě a potenciálních mechanismech rezistence nebo virulence u bakterií, jako je *E. faecalis*.

Ve studii podle Bernd Neumanna (2019) byla použita celogenomová sekvenace k sekvenaci genomu 146 různých kmenů *E. faecalis*, které pocházely z nemocničních infekcí, potravin, zvířat a zdravých lidí. Analýza vedla k vytvoření nového schématu základní genomové multilokusové sekvenční typizace s 1 972 genovými cíli, které umožňuje přesnější a podrobnější analýzu genomových dat. Tato metoda poskytuje cenné informace pro studium šíření a rozmanitosti *E. faecalis* v různých prostředích. Celogenomová sekvenace je komplexní metoda, která sekvenčně analyzuje celý genom enterokoků. Tato metoda poskytuje detailní informace o genetické struktuře, variabilitě a možných genetických mechanismech rezistence nebo virulence (Nakagawa a kol., 2018). Základní genomová multilokusová sekvenční typizace byla také použita ve výzkumu v Číně, kde se analyzovaly vzorky vepřového masa za účelem zjištění zastoupení enterokoků. Výsledky tohoto výzkumu mohou pomoci při monitorování a kontrole bakteriálních kontaminací v potravinách, což má zásadní význam pro veřejné zdraví a bezpečnost potravin (Zhaov a kol., 2022).

### 3.5 Serologické testy

Serologické testy slouží k detekci protilátek v séru, které se tvoří jako reakce na infekci nebo očkování. V případě enterokoků jsou tyto testy užitečné pro zjištění, zda došlo k infekci enterokoky. Protilátky jsou produkovány imunitním systémem těla jako obrana

proti patogenům, a proto jejich přítomnost může naznačovat probíhající nebo minulou infekci (Devi a kol., 2022).

### **3.5.1 ELISA**

Metoda využívá enzymatické značení, které umožňuje vizualizovat přítomnost protilátek. Tento test pracuje tak, že protilátky se vážou na antigeny, které jsou fixovány na povrchu mikrotitrační destičky. Jakmile dojde k přidání enzymu, který reaguje s konkrétním substrátem, vzniká chemická reakce, která slouží jako indikátor přítomnosti protilátek.

### **3.5.2 Western blot**

Technika zvaná Western blot umožňuje oddělit a detekovat specifické proteiny. Proces začíná elektroforézou, kde jsou proteiny odděleny podle velikosti na polyakrylamidovém gelu. Následně se proteiny přenesou na membránu, obvykle z polyvinylidenfluoridu, a inkubují se s protilátkami, které se specificky vážou na cílové proteiny. Po přenosu proteinů na membránu se tato membrána inkubuje s primárními protilátkami, které se rozpoznávají a vážou na specifické proteiny. Poté se použijí značené sekundární protilátky, které detekují a vážou se na primární protilátky. K vizualizaci těchto vazeb se často používá chemiluminiscence, která produkuje světlo, což umožňuje identifikovat přítomnost a množství cílových proteinů (Liu a kol., 2024). Ve studii podle Li Zhang (2014), která zkoumala *E. faecalis* u pacienta s rakovinou tlustého střeva, byl Western blot použit k analýze proteinů. Celkové proteiny byly extrahovány pomocí radioimunoprecipitačního testu s lyzačním pufrem obsahujícím inhibitory fosfatázy a proteázy. Proteiny byly poté kvantifikovány pomocí testu s kyselinou bicinchoninovou, což je metoda pro určení koncentrace proteinů. Tyto proteiny byly odděleny na 10% SDS-PAGE gelu a přeneseny na polyvinylidenfluoridovou membránu. Membrána byla blokována 5% BSA (bovinní sérový albumin), aby se zabránilo nespecifickému vázání, a následně byla inkubována s primárními protilátkami přes noc. Po promytí byly membrány inkubovány se sekundární protilátkou a následně byl použit chemiluminiscenční systém k vizualizaci proteinů. Tato metoda umožňuje identifikaci specifických proteinů a poskytuje důležité informace pro studium enterokoků v kontextu různých zdravotních stavů, jako je rakovina tlustého střeva.

## **3.6 Testy citlivosti na antibiotika**

Enterokoky jsou známé svou rezistencí vůči některým antibiotikům, což může komplikovat jejich léčbu. Proto je testování citlivosti k antibiotikům klíčové pro určení správné

terapie. Dvě nejčastěji používané metody k testování citlivosti na antibiotika jsou disková difúzní metoda a bujónová diluční metoda (Azad a kol., 2020).

### **3.6.1 Disková difúzní metoda**

Disková difúzní metoda je běžně používaný postup pro testování citlivosti mikroorganismů na různé látky, včetně antibiotik (Balouiri a kol., 2016). Při této metodě se na agarové plotny, které byly inokulovány mikroorganismem, umístí kotoučky z filtračního papíru napuštěné testovanou látkou. Petriho misky s těmito disky se poté inkubují, aby mikroorganismus měl čas růst. Po určité době inkubace se kolem disků vytvoří zóny inhibice, které naznačují, do jaké míry daná látka inhibuje růst mikroorganismu. Průměr těchto zón se měří a určuje, jak účinné je dané antibiotikum proti testovanému mikroorganismu. Pokud je zóna inhibice velká, znamená to, že mikroorganismus je citlivý na dané antibiotikum; pokud je zóna malá nebo neexistuje, mikroorganismus je rezistentní. Pro testování citlivosti enterokoků na antibiotika se používají disky s různými antibiotiky. Mezi ně patří penicilin, ampicilin, gentamicin, piperacilin s tazobaktamem, teikoplanin a vankomycin. Každý disk obsahuje specifické množství antibiotika a je určen pro určitou skupinu mikroorganismů nebo typ půdy (Weng a kol., 2019).

### **3.6.2 Antimikrobiální gradientová metoda**

Etest je metoda pro stanovení minimální inhibiční koncentrace, která kombinuje prvky dilučního a difúzního testování. Je navržena pro jednoduché a přesné určení hodnoty minimální inhibiční koncentrace u antibiotik, antimykotik a antimykobakterií. Při použití Etestu se na agarovou plochu, která byla inokulována mikroorganismy, umístí tenký proužek. Tento proužek obsahuje testovanou látku v postupně se zvyšujících koncentracích, tvořící gradient. Po inkubaci agarové plotny proužek uvolňuje antibiotikum nebo jinou testovanou látku do okolního média, což vytváří zónu inhibice růstu mikroorganismů. Místo, kde zóna inhibice dotýká proužku, ukazuje, při jaké koncentraci se růst mikroorganismu zastavil. Tato koncentrace odpovídá hodnotě minimální inhibiční koncentrace. Etest tak umožňuje stanovit, při jaké minimální koncentraci testovaného antibiotika nebo jiné látky dochází k inhibici růstu bakterií, plísní nebo mykobakterií (Balouiri a kol., 2016).

### **3.6.3 Bujónová diluční metoda**

Minimální inhibiční koncentrace je nejnižší koncentrace antibiotika, která dokáže účinně zastavit růst daného mikroorganismu. Hodnota minimální inhibiční koncentrace je zásadní pro posouzení, jak citlivý je mikroorganismus k určitému antibiotiku, a pomáhá

lékařům určit nejvhodnější léčebný postup. Minimální inhibiční koncentrace se obvykle stanovuje pomocí dilučních testů. V těchto testech se mikroorganismy vystavují různým koncentracím antibiotik a sleduje se, jak reagují na různé koncentrace léčiva. Nejnižší koncentrace, při které není pozorován růst mikroorganismu, se považuje za hodnotu minimální inhibiční koncentrace. Tato metoda je klíčová pro výběr účinných antibiotik a minimalizaci rizika rezistence. Pokud hodnota minimální inhibiční koncentrace naznačuje, že mikroorganismus je citlivý na antibiotikum, pak může být tento lék použit jako součást léčby. Naopak pokud je minimální inhibiční koncentrace vysoká, znamená to, že mikroorganismus je vůči antibiotiku rezistentní, a je třeba hledat jinou možnost léčby (Balouiri a kol., 2016).

## 4 Citlivost enterokoků na antibiotika

Enterokoky jsou bakterie, které mají vrozenou rezistenci vůči určitým antibiotikům, jako jsou cefalosporiny, aminoglykosidy, linkosamidy a streptograminy. To jim umožňuje snadno získat další rezistence z mobilních genetických prvků. U pacientů léčených antibiotiky se enterokoky mohou hromadit v těsném kontaktu s jinými mikroby rezistentními vůči antibiotikům, což zvyšuje pravděpodobnost přenosu rezistence (Selleck a kol., 2019).

Tabulka 2 Citlivost na antibiotika

Antibiotikum	MIC <i>E.faecalis</i>	Zdroje	MIC <i>E.faecium</i>	Zdroje
Ampicilin	0,5-4 ug/ml	Cusumano a kol., 2022	> 16 ug/ml	Komiyama a kol., 2016
Penicilin	<2 ug/ml	Cusumano a kol., 2022	> 16 ug/ml	Komiyama a kol., 2016
Vankomycin	1-4 ug/ml	Komiyana a kol., 2016	> 32 ug/ml	Komiyama a kol., 2016
Linezolid	<2 ug/ml	Mao a kol., 2021	<2 ug/ml	Mao a kol., 2021
Datomycin	<4 ug/ml	Smith a kol., 2015	<4 ug/ml	Smith a kol., 2015
Tigecyklin	<0,5 ug/ml	Hegstad a kol., 2023	<0,5 ug/ml	Hegstad a kol., 2023
Gentamicin	<500 ug/ml	Noh a kol., 2020	<500 ug/ml	Noh a kol., 2020

Poznámka: MIC-minimální inhibiční koncentrace

Stanovení hodnot MIC (minimální inhibiční koncentrace) je klíčové pro vývoj vztahů mezi strukturou a aktivitou. MIC hodnoty poskytují důležité informace pro další biologické hodnocení a pochopení mechanismu účinku sloučenin. Stanovení se provádí pro různou citlivost na antibiotika o hodnotách, které jsou uvedeny v tabulce 2 vůči enterokokům. Hodnoty MIC jsou vždy interpretovány v kontextu podmínek růstu, protože koncentrace potřebná k inhibici růstu bakterií může záviset na zdrojích živin a fyzikálním stavu média (kapalina

vs. agar). Hodnoty MIC na agaru, které jsou důležité pro tvorbu rezistentních mutantů, nemusí vždy odpovídat hodnotám MIC v kapalném médiu. Proto je důležité brát v úvahu oba typy médií při interpretaci výsledků (Wang, Boshoff, 2021).

## 4.1 Rezistence

Enterokoky, zejména *E. faecalis* a *E. faecium*, jsou významnými nozokomiálními patogeny díky své vrozené rezistenci vůči mnoha antimikrobiálním látkám a schopnosti získávat nové mechanismy rezistence. Tyto bakterie vykazují sníženou citlivost na penicilin a ampicilin a vysokou úroveň rezistence k většině cefalosporinů (Gagetti a kol., 2019).

### 4.1.1 Rezistence na $\beta$ -laktamová antibiotika

Proteiny vázající penicilin jsou cílové molekuly  $\beta$ -laktamových antibiotik, které hrají klíčovou roli v syntéze buněčné stěny bakterií. Enterokoky mohou měnit strukturu svých protein vázajících penicilin, což snižuje účinnost antibiotik. Tento mechanismus rezistence je zvláště běžný u *E. faecium*. Modifikované proteiny vázající penicilin mají nižší afinitu k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům, což znamená, že antibiotikum se méně účinně váže na svůj cílový enzym a tím nedokáže inhibovat syntézu buněčné stěny. Specifické geny kódující modifikované proteiny vázající penicilin, jako je gen *pbp5* u *E. faecium*, jsou zodpovědné za tuto rezistenci. Mutace v těchto genech mění strukturu proteinů vázajících penicilin, což snižuje jejich schopnost vázat  $\beta$ -laktamová antibiotika a vede k rezistenci (Hunashal a kol., 2023).

Dalším mechanismem rezistence je produkce  $\beta$ -laktamázy. Tyto enzymy hydrolyzují  $\beta$ -laktamový kruh antibiotik, čímž je inaktivují. U enterokoků je tento mechanismus méně běžný než u jiných bakterií, ale některé kmeny mohou produkovat  $\beta$ -laktamázy. Existují různé typy  $\beta$ -laktamázy, které mohou být produkovány enterokoky, včetně širokospektrých  $\beta$ -laktamázy (ESBL) a karbapenemázy. Tyto enzymy mohou hydrolyzovat různé typy  $\beta$ -laktamových antibiotik, včetně penicilinů, cefalosporinů a karbapenemů. Produkce  $\beta$ -laktamázy je často geneticky kódována a může být přenášena mezi bakteriemi pomocí mobilních genetických prvků, jako jsou plazmidy a transpozony (Gagetti a kol., 2019).

### 4.1.2 Rezistence na glykopeptidová antibiotika

Klíčovou roli v rezistenci na glykopeptidy hrají geny *van*, jako jsou *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* a *vanG*. Tyto geny kódují enzymy, které mění strukturu peptidoglykanového řetězce v buněčné stěně enterokoků. Normálně se peptidoglykan skládá z dipeptidu D-*la*-D-*la*, na který se vankomycin a teikoplanin vážou, čímž blokují syntézu buněčné stěny

a zabíjejí bakterii. Rezistentní enterokoky díky enzymům kódovaným geny van mění koncový dipeptid z D-Ala-D-Ala na D-Ala-D-Lac (laktát) nebo D-Ala-D-Ser (serin). Tato změna výrazně snižuje afinitu vankomycinu a teikoplaninu k jejich cílovému místu, což znamená, že antibiotika se nemohou efektivně vázat a inhibovat syntézu buněčné stěny. Výsledkem je, že bakterie zůstávají životaschopné a pokračují v růstu i v přítomnosti těchto antibiotik (Stogios, Savčenko, 2020).

Rezistence na glykopeptidy se často šíří mezi enterokoky pomocí mobilních genetických prvků, jako jsou plazmidy a transpozony. Plazmidy jsou malé kruhové DNA molekuly, které mohou být přenášeny mezi bakteriemi horizontálním přenosem genů. Transpozony jsou segmenty DNA, které se mohou přesouvat z jednoho místa genomu na druhé, často nesoucí geny rezistence. Tento mechanismus usnadňuje rychlé šíření rezistence mezi různými kmeny a druhy enterokoků. Například gen *vanA*, který kóduje vysokou úroveň rezistence na vankomycin, je často přenášen plazmidy mezi bakteriemi. Tento proces může probíhat nejen mezi enterokoky, ale také mezi jinými bakteriálními druhy, což zvyšuje riziko šíření rezistence (Cairns a kol., 2023).

#### **4.1.3 Rezistence na linezolid**

Rezistence k linezolidu je často způsobena mutacemi v doméně V 23S rRNA (ribozomová ribonukleová kyselina), což je klíčové cílové místo pro linezolid na ribozomu bakterie. Ribozom je komplexní molekulární stroj, který syntetizuje proteiny, a 23S rRNA je jeho součástí. Linezolid funguje tím, že se váže na 23S rRNA a brání bakteriím v syntéze proteinů, což vede k jejich smrti. Když dojde k mutacím v doméně V 23S rRNA, tato oblast se strukturálně změní, což snižuje schopnost linezolidu se efektivně vázat na ribozom. Výsledkem je, že linezolid nemůže inhibovat syntézu proteinů tak účinně, což vede k rezistenci bakterie vůči tomuto antibiotiku (Misiakou a kol., 2023).

#### **4.1.4 Rezistence na aminoglykosidy**

Enterokoky jsou díky své vnější bakteriální stěně relativně neprostupné pro aminoglykosidy, což je činí „strukturálně odolnými“ vůči běžným koncentracím těchto antibiotik. Kombinace aminoglykosidů s látkami, které narušují buněčnou stěnu (jako beta-laktamy nebo vankomycin), zvyšuje jejich účinnost tím, že zvyšuje permeabilitu stěny bakterií a umožňuje lepší pronikání antibiotik. Plazmidy mohou přenášet geny, které kódují enzymy jako fosfotransferázy, acetyltransferázy a nukleotidyltransferázy. Tyto enzymy mění strukturu aminoglykosidů, což vede k jejich inaktivaci. Nejčastěji se vyskytujícím enzymem je bifunkční AAC(6')-Ie-APH(2''), který způsobuje rezistenci

ke všem dostupným aminoglykosidů kromě streptomycinu. Dalšími důležitými enzymy jsou ANT (6')-Ia a APH(2'')-Ic, které jsou zodpovědné za rezistenci vůči streptomycinu a gentamycinu. Zatímco rezistence na streptomycin je omezená pouze na tento lék, rezistence na gentamycin obvykle znamená rezistenci na všechny ostatní aminoglykosidy kromě streptomycinu (Herrera-Hidalgo a kol., 2023).

#### **4.1.5 Rezistence na tetracykliny**

Rezistence enterokoků na tetracyklin je běžná a často zprostředkována ribozomálním ochranným mechanismem, který je kódován genem tet(M). Tento gen je často přenášen konjugativními transpozony (CTns) souvisejícími s Tn916. dalším mechanismem je efluxní systém, kódovaný geny jako tet(L), který také jezdí k rezistenci na tetracykliny. Tigecyklin, derivát minocyklinu, je široce účinný proti enterokokům, protože není citlivý na většinu běžných mechanismů rezistence na tetracykliny, včetně Tet(M) a Tet(L). Nicméně, byly zaznamenány kmeny *E. faecium*, které vykazují rezistenci na tigecyklin, což je ale předběžně připisováno nadměrné expresi genů tet(L) a tet(M), které jsou přenášeny plazmidy (García- Solache, Rice, 2019).

## ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zaměřila na problematiku enterokokových infekcí, které představují významný zdravotní problém jak v nemocničním prostředí, tak i ve veřejném zdravotnictví. Na základě analýzy dostupné literatury jsme identifikovali několik klíčových poznatků.

Prvním zjištěním je výrazný nárůst rezistence enterokoků vůči standardním antibiotikům, což ztěžuje jejich léčbu a má potenciál zhoršit prognózu pacientů s enterokokovými infekcemi. Druhým významným bodem je potvrzení výskytu enterokokových infekcí nejenom v nemocnicích, ale i v komunitním prostředí, což klade důraz na potřebu sledování a kontroly těchto infekcí na širší úrovni.

Dále jsem diskutovala o faktorech přispívajících k šíření enterokokových infekcí, jako jsou nedostatečná hygienická opatření, přenos z člověka na člověka a kontaminace zdravotnických prostředků. Moje práce také ukázala na potenciální rizikové skupiny, jako jsou imunokompromitovaní pacienti a jednotlivci s chronickými onemocněními.

Výsledky studií ukazují na nutnost dalšího výzkumu zaměřeného na identifikaci nových terapeutických možností a strategií kontroly šíření enterokokových infekcí. Doporučuji také posílení preventivních opatření a sledování rezistence enterokoků v rámci zdravotnických zařízení i veřejného prostoru.

V závěru lze konstatovat, že enterokokové infekce představují komplexní problém, který vyžaduje multidisciplinární přístup a spolupráci mezi zdravotnickými pracovníky, výzkumníky a veřejnými zdravotními autoritami. Doufám, že moje práce přispěje k lepšímu porozumění této problematice a podpoří snahu o zlepšení péče o pacienty s enterokokovými infekcemi.

## POUŽITÁ LITERATURA

1. ABRIL G., QUINTELA-BALUJA M., VILLA T., et al. (2022); Proteomic Characterization of Virulence Factors and Related Proteins in *Enterococcus* Strains from Dairy and Fermented Food Products; International Journal of Molecular Sciences; 10971; doi: 10.3390/ijms231810971
2. AKTER T., HAQUE N., EHSAN R., PAUL S., et al. (2023); Virulence and antibiotic-resistance genes in *Enterococcus faecalis* associated with streptococcosis disease in fish; Scientific Reports; 1551; doi: 10.1038/s41598-022-25968-8
3. AZAD A., ROSTAMIFAR S., MODARESI F., et al. (2020); Assessment of the Antibacterial Effects of Bismuth Nanoparticles against *Enterococcus faecalis*; BioMed Research International; 5465439; doi: 10.1155/2020/5465439
4. BALOUIRI M., SADIKI M., IBNOUDA S. (2016); Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity; Journal of Pharmaceutical Analysis; 71-79; doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005
5. BARNES A., FRANKOVÁ K., DALE J., et al. (2021); *Enterococcus faecalis* colonizes and forms persistent biofilm microcolonies on undamaged endothelial surfaces in a rabbit endovascular infection model; FEMS Microbiology Ecology; xtab014; doi: 10.1093/femsmc/xtab014
6. BAUREDER M., BERANE E., HADERSTENT L. (2014); In vitro assembly of catalase; Journal of Biological Chemistry; 28411–28420; doi:10.1074/jbc.M114.596148
7. BAYJANOV J., BANN J., ROGERS M., TROERSTA R., et al. (2019); *Enterococcus faecium* genome dynamics during long-term asymptomatic patient gut colonization; Microbial Genomics; e000277; doi: 10.1099/mgen.0.000277
8. BERENGER B., KULKARNI S., et al. (2015); Exogenous endophthalmitis caused by *Enterococcus casseliflavus*: A case report and discussion regarding treatment of intraocular infection with vancomycin-resistant enterococci; Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology; 330-332; doi: 10.1155/2015/784910
9. CAIRNS K., UDY A., PEEL T., ABBOTT I., et al. (2023); Therapeutics for Vancomycin-Resistant *Enterococcal* Bloodstream Infections; Clinical Microbiology Reviews; e0005922; doi: 10.1128/cmr.00059-22
10. CODELIA-ANJUM A., LERNER L., ELTERNAN D., et al. (2023); *Enterococcal* Urinary Tract Infections: A Review of the Pathogenicity, Epidemiology, and Treatment; Antibiotics (Basel); 778; doi: 10.3390/antibiotics12040778

11. CONEN A., STORTECKY S., MOREILLON P., et al. (2021); A review of recommendations for infective endocarditis prevention in patients undergoing transcatheter aortic valve implantation; *EuroIntervention*; 1135–1140; doi: 10.4244/EIJ-D-19-00993
12. CUSUMANO J., DAFFINEE K., PIEHL E., et al. (2022); Meropenem plus Ceftaroline Is Active against *Enterococcus faecalis* in an In Vitro Pharmacodynamic Model Using Humanized Dosing Simulations; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; e0042622; doi: 10.1128/aac.00426-22
13. DAVEDOW T., NARVAEZ-BRAVO C., ZAHEER R., SANDERSON H., et al. (2020); Investigation of a Reduction in Tylosin on the Prevalence of Liver Abscesses and Antimicrobial Resistance in *Enterococci* in Feedlot Cattle; *Frontiers in Veterinary Science*; 90; doi: 10.3389/fvets.2020.00090
14. DEVI M., GAFFAR S., HARTATI Y. (2022); A review post-vaccination SARS-CoV-2 serological test: Method and antibody titer response; *Analytical Biochemistry*; 114902; doi:10.1016/j.ab.2022.114902
15. DZIRI R., LOZANO C., SAID L., et al. (2016); Multidrug-resistant *enterococci* in the hospital environment: detection of novel vancomycin-resistant *E. faecium* clone ST910; *The Journal of infections in Developing Countries*; 799-806; doi: 10.3855/jidc.8014
16. FARAHANI A. (2016); State of Globe: *Enterococci*: Virulence Factors and Biofilm Formation; *Journal of Global Infectious Diseases*; 1–2; doi: 10.4103/0974-777X.176139
17. FIORITI S., COCCITTO S., CEDRARO N., et al. (2021); Linezolid Resistance Genes in *Enterococci* Isolated from Sediment and Zooplankton in Two Italian Coastal Areas; *Applied and Environmental Microbiology*; e02958-20; doi: 10.1128/AEM.02958-20
18. FRIEDMAN D., SHWETA F., MAHMOOD M. (2021); *Enterococcus gallinarum* endophthalmitis and meningitis in an allogeneic hematopoietic stem cell transplant patient; *Journal of the Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada*; 313-318; doi: 10.3138/jammi-2021-0016
19. GACA A., LEMOS J. (2019); Adaptation to Adversity: the Intermingling of Stress Tolerance and Pathogenesis in *Enterococci*; *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; e00008-19; doi: 10.1128/MMBR.00008-19
20. GAHETTI P., BONOFIGLIO L., GABARROT G., et al. (2019); *Revista Argentina de Microbiologia*; 179-183; doi:org/10.1016/j.ram.2018.01.007

21. GARCÍA-SOLACHE M., RICE L. (2019); The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its Environment; *Clinical Microbiology Reviews*; e00058-18; doi: 10.1128/CMR.00058-18
22. GARIBYAN L., AVASHIA N. (2013); Polymerase chain reaction; *Journal of Investigative Dermatology*; e6; doi:10.1038/jid.2013.1
23. GEISSLER M., SCHROTTNER P., OERTEL R., DUMKE R. (2024); *Enterococci*, Van Gene-Carrying *Enterococci*, and Vancomycin Concentrations in the Influent of a Wastewater Treatment Plant in Southeast Germany; *Microorganisms*; 149; doi: 10.3390/microorganisms12010149
24. HAGE W., SARKIS D., KALLASY M., et al. (2023); In vitro evaluation of three engineered multispecies endodontic biofilms on a dentinal disk substrate; *Biomater Investigations Dentistry*; 2281091; doi: 10.1080/26415275.2023.2281091
25. HANASHAL Y., KUMAR G., CHOY M., et al. (2023); Molecular basis of  $\beta$ -lactam antibiotic resistance of bacterium *E. faecium* Penicillin Binding Protein PBP5; *Nature Communications*; 4268; doi: 10.1038/s41467-023-39966-5
26. HANCOCK L., MURAY B., SILAMPAA J. (2014); *Enterococcal* Cell Wall Components and Structures; *Massachusetts Eye and Ear Infirmary*; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190431/>
27. HEGSTAD K., PONTINEN A., BJORNHOLT J., et al. (2023); The first tigecycline resistant *Enterococcus faecium* in Norway was related to tigecycline exposure; *Journal of Global Antimicrobial Resistance*; 112-115; doi: 10.1016/j.jgar.2023.12.002
28. HERRERA-HIDALDO L., FERNANDÉZ-RUBIO B., et al. (2023); Treatment of *Enterococcus faecalis* Infective Endocarditis: A Continuing Challenge; *Antibiotics (Basel)*; 704; doi: 10.3390/antibiotics12040704
29. HIGUITA N., HUYCKE M. (2014); *Enterococcal* Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment; *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*; PMID: 24649504
30. HONARM H., GHAVIDEL M., NIKOKAR I., TAROMSARI M. (2012); Evaluation of a PCR assay to detect *Enterococcus faecalis* in blood and determine glycopeptides resistance genes: van a and van B; *Iranian Journal of Medical Sciences*; 194-199
31. HUFF R., PEREIRA R., PISSETTI C., et al., (2020); Antimicrobial resistance and genetic relationships of *enterococci* from siblings and non-siblings *Heliconius erato* *phyllis* caterpillars; *PeerJ*; e8647; doi: 10.7717/peerj.8647

32. CHAGUZA CH., PONTINEN A., TOP J., et al. (2023); The population-level impact of *Enterococcus faecalis* genetics on intestinal colonization and extraintestinal infection; *Microbiology Spectrum*; e00201-23; doi: 10.1128/spectrum.00201-23
33. CHILAMBI G., NORDSTROM H., EVANS D., et al. (2021); Genomic and phenotypic diversity of *Enterococcus faecalis* isolated from endophthalmitis; *PLOS ONE*; e0250084; doi: 10.1371/journal.pone.0250084
34. KANDARAKIS S., SPERNOVASILIS N., GEORGALAS I., et al. (2023); Endophthalmitis caused by *Enterococcus casseliflavus*: a systematic review of literature; *Germs*; 343-351; doi: 10.18683/germs.2023.1404
35. KAWANO A., ISHIKAWA H., MUTOH M., et al. (2018); Higher *Enterococcus* counts indicate a lower risk of colorectal adenomas: a prospective cohort study; *Oncotarget*; 21459-21467; doi: 10.18632/oncotarget.25130
36. KHANUM I., ANWAR S., FAROQUE A. (2019); *Enterococcal* Meningitis/Ventriculitis: A Tertiary Care Experience; *Asian Journal of Neurosurgery*; 102-105; doi: 10.4103/ajns.AJNS\_260\_17
37. KOMIYAMA E., LEPESQUEUR L., YASSUDA C., et al. (2016); *Enterococcus* Species in the Oral Cavity: Prevalence, Virulence Factors and Antibacterial Susceptibility; *PLOS one*; e0163001; doi: 10.1371/journal.pone.0163001
38. LEBRETON F., WILLEMS R., GILMORE M. (2014); *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization; *Massachusetts Eye and Ear Infirmary*; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/>
39. LI X., FAN S., et al. (2018); The first case report of *Enterococcus gallinarum* meningitis in neonate; *Medicine*; e9875; doi:10.1097/MD.00000000000009875
40. LIU Y., WANG Z., et al. (2024); Rapid and simultaneous multiepitope antigen-based detection of *Enterococcus* by microscale thermophoresis and immunomagnetic separation; *Frontiers in Microbiology*; 1341451; doi:10.3389/fmicb.2024.1341451
41. MADSEN K., SKOY M., GILL S., KEMP M. (2017); Virulence Factors Associated with *Enterococcus faecalis* Infective Endocarditis: A Mini Review; *The Open Microbiology Journal*; 1–11; doi: 10.2174/1874285801711010001
42. MAO J., LI T., ZHANG N., WANG S., et al. (2021); Dose Optimization of Combined Linezolid and Fosfomycin against *Enterococcus* by Using an In Vitro Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model; *Microbiology Spectrum*; e0087121; doi: 10.1128/Spectrum.00871-21

43. MBOUCHE P., BLAIRON L., CUPAIOLO R., et al. (2023); *Enterococcus thailandicus*, an unusual pathogen in humans encountered in an intra-abdominal infection; New Microbes and New Infections; 101137; doi: 10.1016/j.nmni.2023.101137
44. MISIANKOU M., HERTZ F., SHONNING K., et al. (2023); Emergence of linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in a tertiary hospital in Copenhagen; Microbial Genomics; mgen001055; doi: 10.1099/mgen.0.001055
45. MOULOUK T., KEOUCHI M., SOLIGOTOVÁ C., et al. (2019); *Streptococcus macedonicus* strains isolated from traditional fermented milks: resistance to gastrointestinal environment and adhesion ability; Applied Microbiology and Biotechnology; 2759-2771; doi: 10.1007/s00253-019-09651-z
46. NAKAMURA T., ISHIKAWA K., MATSUO T., KAWAI F., et al. (2021); *Enterococcus hirae* bacteremia associated with acute pyelonephritis in a patient with alcoholic cirrhosis: a case report and literature review; BMC Infectious Diseases; 999; doi: 10.1186/s12879-021-06707-2
47. NAKAWAGA H., FUJITA M. (2018); Whole genome sequencing analysis for cancer genomics and precision medicine; Cancer Science; 513–522; doi:10.1111/cas.13505
48. NALAWADE T., BHAT K., KALE A., et al. (2023); Evaluation of Presence of *Enterococcus faecalis* in Root Canals of Deciduous Molars with Necrotic Pulp by Agar Culture and Polymerase Chain Reaction; International Journal of Clinical Pediatric Dentistry; 816–819; doi: 10.5005/jp-journals-10005-2706
49. NEUMANN B., PRIOR K., BENDER J., HARMSSEN D., et al. (2019); A Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecalis*; Journal of Clinical Microbiology; e01686-18; doi: 10.1128/JCM.01686-18
50. NOH E., KIM Y., SEO K., SON S., et al. (2020); Antimicrobial resistance monitoring of commensal *Enterococcus faecalis* in broiler breeders; Poultry Science; 2675-2683; doi: 10.1016/j.psj.2020.01.014
51. OKUMURA N., WATANABE T., TERANISHI S., SUZUKI D., et al. (2021); Successful treatment of aortic valve endocarditis caused by *Enterococcus casseliflavus*: a case report; BMC Infectious Diseases; 447; doi: 10.1186/s12879-021-06160-1
52. OLFA B., SLIM S. (2019); *Enterococci*: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics; BioMed Research International; 5938210; ISSN 23146141; doi: 10.1155/2019/5938210

53. PARTHASARATHY S., JORDAN L., SCHWARTING N., et al. (2020); Involvement of Chromosomally Encoded Homologs of the RRNPP Protein Family in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation and Urinary Tract Infection Pathogenesis; Journal of Bacteriology; e00063-20; doi: 10.1128/JB.00063-20
54. PERICAS J., LOPIS L., et al. (2021); Infective Endocarditis in Patients on Chronic Hemodialysis; Journal of the American College of Cardiology; 1629-1640; ISSN 07351097; doi:10.1016/j.jacc.2021.02.014
55. POSHINHO A., AZEVEGO T., ALVES J., et al. (2016); Acute Pyelonephritis with Bacteremia Caused by *Enterococcus hirae*: A Rare Infection in Humans; Case Reports in Infectious Diseases; 4698462; doi: 10.1155/2016/4698462
56. PRICE T., DUNE T., HILT E., et al. (2016); The Clinical Urine Culture: Enhanced Techniques Improve Detection of Clinically Relevant Microorganisms; Journal of Clinical Microbiology; 1216–1222; doi: 10.1128/JCM.00044-16
57. RAEISI J., SAIFI M., POURHAFIE M., HABIBI M., et al. (2017); Rapid Identification of Vancomycin Resistant *Enterococcus Faecalis* Clinical Isolates using a Sugar Fermentation Method; Journal of Clinical and Diagnostic Research for doctors; DC14–DC17; doi: 10.7860/JCDR/2017/19017.9568
58. RAHMAN I., SANCHEZ A., TANG W., et al. (2021); Structure-Activity Relationships of the *Enterococcal* Cytolysin; ACS Infectious Diseases; 2445-2454; doi: 10.1021/acsinfecdis.1c00197
59. RAJAGOPTAL M., WALKER S. (2017); Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria; Current Topics in Microbiology and Immunology; 1-44; doi: 10.1007/82\_2015\_5021
60. REVTOVICH A., TJAHJONO E., SINGH K., et al. (2021); Development and Characterization of High-Throughput *Caenorhabditis elegans* – *Enterococcus faecium* Infection Model; Frontiers in Cellular and Infection Microbiology; 667327; doi: 10.3389/fcimb.2021.667327
61. SEDLÁČEK I., HOLOCHOVÁ P., MAŠLAŇOVÁ I., et al. (2013); *Enterococcus ureilyticus* sp. nov. and *Enterococcus rotai* sp. nov., two urease-producing enterococci from the environment; International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology; 502-510; doi: 10.1099/ij.s.0.041152-0
62. SELLECK E., TYNE D., GILMORE M. (2019); Pathogenicity of *Enterococci*; Microbiology Spectrum Journal Homepage; ISSN 21650497; doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018

63. SHEUS S. (2017); Endophthalmitis; Korean Journal of Ophthalmology; 283-289; doi: 10.3341/kjo.2017.0036
64. SCHIOPU P., TOC D., COLOSI I., COSTACHE C., et al. (2023); An Overview of the Factors Involved in Biofilm Production by the *Enterococcus* Genus; International Journal of Molecular Sciences; 11577; doi: 10.3390/ijms241411577
65. SCHWARTZMAN J., LEBRETON F., SALMZADE R., et al. (2023); Global diversity of *enterococci* and description of 18 novel species; bioRxiv [Preprint]; e2310852121; doi: 10.1101/2023.05.18.540996
66. SINGH T., BHOHARAJU N., VINOD V., et al. (2023); Evaluation of microbial contamination in removable dental prosthesis at different time of usage; Journal of Oral and Maxillofacial Pathology; 333-339; doi:10.4103/jomfp.jomfp\_157\_23
67. SMITH J., BARBER J., RAUT A., ABOUTALEB M., et al. (2015);  $\beta$ -Lactam combinations with daptomycin provide synergy against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*; Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 1738-43; doi: 10.1093/jac/dkv007
68. STOGIOS P., SACHVENKO A. (2020); Molecular mechanisms of vancomycin resistance; Protein Science; 654-669; doi: 10.1002/pro.3819
69. TORRES C., ALONSO C., RAUIZ-RIPA L., et al. (2018); Antimicrobial Resistance in *Enterococcus spp.* of animal origin; American Society for Microbiology; doi:10.1128/microbiolspec.arba-0032-2018.
70. WANG O., BOSHOFF H. (2021); Determining Minimum Inhibitory Concentrations in Liquid Cultures or on Solid Medium; Methods in Molecular Biology; 595-609; doi: 10.1007/978-1-0716-1460-0\_26
71. WENG P., RAMLI R., HAMATL R. (2019); Antibiotic Susceptibility Patterns, Biofilm Formation and esp Gene among Clinical *Enterococci*: Is There Any Association?; International Journal of Environmental Research and Public Health; 3439; doi: 10.3390/ijerph16183439
72. YANGHZONA T., SINGH T. (2019); Study of vancomycin and high-level aminoglycoside-resistant *Enterococcus species* and evaluation of a rapid spot test for enterococci from Central Referral Hospital, Sikkim, India; Journal of Laboratory Physicians; 192–199; doi:10.4103/JLP.JLP\_5\_19
73. ZHANG L., DENG M., LIU J., ZHANG J., WANG F., YU W. (2024); The pathogenicity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* to colon cancer cells; BMC Infectious Diseases; 230; doi: 10.1186/s12879-024-09133-2

74. ZHAO B., YE M., ZHENG R. (2018); *Enterococcus gallinarum* meningitis: a case report and literature review; BMC Infectious Diseases; 231; doi: 10.1186/s12879-018-3151-4
75. ZHAO J., LIU R., SUN Y., YANG X., YAO J. (2022); Tracing *enterococci* persistence along a pork production chain from feed to food in China; Animal Nutrition; 223–232; doi: 10.1016/j.aninu.2022.01.005