

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav mikrobiologie



**VZNIK A ŠÍŘENÍ BAKTERIÁLNÍ REZISTENCE K VYBRANÝM  
ANTIMIKROBNÍM PŘÍPRAVKŮM (SE ZAMĚŘENÍM NA  
VANKOMYCIN-REZISTENTNÍ ENTEROKOKY)**

Doktorská disertační práce

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli doc. MVDr. Janu Bardoňovi, Ph.D., MBA za pomoc v průběhu celého doktorského studia, za ochotu, vstřícnost, cenné rady a odborné vedení.

Poděkování také patří kolegům a kolegyním Ústavu mikrobiologie, kteří mi byli vždy nápomocni při realizaci této disertační práce. Konkrétně za cenné rady a připomínky děkuji Ing. Magdaléně Röderové, Ph.D., Mgr. Vendule Pudové, Ph.D., Mgr. Kristýně Novákové, Ph.D., Mgr. Pavle Kučové, Ph.D. a Mgr. Taťáně Štosové, Ph.D.. Poděkování za odborné rady a pomoc patří také MUDr. Miroslavě Htoutou Sedlákové, Ph.D. a MUDr. Kateřině Fišerové. V neposlední řadě patří poděkování také Prof. MUDr. Milanu Kolářovi, Ph.D. za možnost tuto disertační práci na Ústavu mikrobiologie realizovat.

Velké poděkování patří mé rodině a přátelům za jejich výraznou morální podporu.

### **Čestné prohlášení**

Čestně prohlašuji, že jsem disertační práci s názvem: „Vznik a šíření bakteriální rezistence k vybraným antimikrobním přípravkům (se zaměřením na vankomycin-rezistentní enterokoky)“ vypracovala samostatně. Použitou literaturu a podkladové materiály jsem uvedla v příloženém seznamu literatury.

V Olomouci dne .....

.....

podpis

Studium a předložená disertační práce byly realizované za finanční podpory vnitřního grantu Univerzity Palackého IGA LF 2023\_012, grantu AZV NV18-05-00340 „Epidemiologie vankomycin-rezistentních enterokoků v České republice: One Health concept“ a grantu AZV NU22-B-112 „Management antibiotické léčby u pacientů s kritickým stupněm COVID-19“.

## OBSAH

|          |  |    |
|----------|--|----|
| <b>1</b> | <b>ÚVOD</b> .....  | 8  |
| 1.1      | REZISTENCE K ANTIMIKROBNÍM PŘÍPRAVKŮM .....                                    | 8  |
| 1.2      | MECHANISMY REZISTENCE BAKTERIÍ K ANTIMIKROBNÍM PŘÍPRAVKŮM .....                | 9  |
| 1.2.1    | Enzymatická inaktivace .....   | 10 |
| 1.2.2    | Aktivní eflux .....  | 12 |
| 1.2.3    | Snížení permeability buněčné stěny .....                                       | 12 |
| 1.2.4    | Modifikace cílového místa .....  | 13 |
| 1.3      | CHARAKTERISTIKA ENTEROKOKŮ A JEJICH REZISTENCE K ANTIMIKROBNÍM PŘÍPRAVKŮM..... | 14 |
| 1.3.1    | Rod <i>Enterococcus</i> .....  | 14 |
| 1.3.2    | Vankomycin-rezistentní enterokoky (VRE) .....                                  | 16 |
| 1.3.3    | Rezistence enterokoků k dalším antibiotikům.....                               | 18 |
| 1.3.4    | Vybrané faktory podporující vznik rezistence enterokoků v prostředí ....       | 20 |
| 1.4      | FENOTYPOVÁ A GENETICKÁ DETEKCE VRE .....                                       | 21 |
| 1.4.1    | Fenotypová detekce .....   | 21 |
| 1.4.2    | Genetická detekce .....  | 21 |
| 1.5      | EPIDEMIOLOGIE VRE .....  | 22 |
| 1.5.1    | Výskyt v VRE v humánní populaci .....  | 23 |
| 1.5.2    | Výskyt VRE u zvířat.....   | 27 |
| 1.5.3    | Výskyt VRE v potravinách živočišného původu .....                              | 27 |
| 1.5.4    | Výskyt VRE v životním prostředí .....  | 28 |
| 1.5.5    | „One Health“ koncept.....  | 30 |
| <b>2</b> | <b>CÍLE PRÁCE</b> .....  | 31 |
| <b>3</b> | <b>MATERIÁL A METODY</b> .....   | 32 |
| 3.1      | ANALÝZA VRE U HUMÁNNÍ POPULACE .....   | 32 |
| 3.1.1    | Sběr, izolace a identifikace .....   | 32 |
| 3.1.1.1  | VRE u hospitalizovaných pacientů.....  | 32 |
| 3.1.1.2  | VRE u hematoonkologických pacientů .....                                       | 32 |
| 3.1.1.3  | VRE v komunitě a u hospitalizovaných pacientů (prospektivní studie) .....      | 33 |
| 3.1.1.4  | VRE u pacientů hospitalizovaných s onemocněním COVID-19 .....                  | 33 |
| 3.2      | ANALÝZA VRE U ZVÍŘAT A V POTRAVINÁCH .....                                     | 33 |
| 3.2.1    | Sběr, izolace a identifikace .....   | 33 |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.3      | ANALÝZA VRE V PROSTŘEDÍ POVRCHOVÝCH A ODPADNÍCH VOD .....                                 | 34        |
| 3.3.1    | Sběr, izolace a identifikace .....  | 34        |
| 3.3.2    | Odběr vod a kalů pro stanovení reziduí antibiotik .....                                   | 35        |
| 3.4      | GENETICKÁ ANALÝZA VRE .....   | 36        |
| 3.4.1    | Detekce genů kódujících rezistenci k vankomycinu .....                                    | 36        |
| 3.4.2    | Detekce genů kódujících vybrané faktory virulence .....                                   | 38        |
| 3.4.3    | Detekce genů kódujících rezistenci k tetracyklinu a makrolidům .....                      | 39        |
| 3.4.4    | Detekce genů kódujících enzymy modifikující aminoglykosidy.....                           | 43        |
| 3.5      | EPIDEMIOLOGICKÁ ANALÝZA VRE.....  | 45        |
| 3.5.1    | Izolace DNA pro restrikční analýzu .....  | 45        |
| 3.5.2    | Restrikce DNA .....   | 46        |
| 3.5.3    | Separace produktů pomocí PFGE .....   | 46        |
| 3.5.4    | Vyhodnocení genetické příbuznosti .....   | 46        |
| <b>4</b> | <b>VÝSLEDKY</b> .....   | <b>47</b> |
| 4.1      | MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÁ ANALÝZA VRE U HUMÁNNÍ POPULACE .....                               | 47        |
| 4.1.1    | VRE u hospitalizovaných pacientů .....  | 47        |
| 4.1.2    | VRE u hematoonkologických pacientů .....  | 57        |
| 4.1.3    | VRE v komunitě a u hospitalizovaných pacientů (prospektivní studie)....                   | 60        |
| 4.1.4    | VRE u pacientů hospitalizovaných s onemocněním COVID-19 .....                             | 61        |
| 4.2      | MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÁ ANALÝZA VRE U ZVÍŘAT A V POTRAVINÁCH.....                          | 64        |
| 4.3      | MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÁ ANALÝZA VRE V PROSTŘEDÍ POVRCHOVÝCH A<br>ODPADNÍCH VOD .....       | 65        |
| 4.3.1    | Korelace záchytu VRE s nálezy reziduí antibiotik v odpadních a<br>povrchových vodách..... | 67        |
| <b>5</b> | <b>DISKUZE</b> .....  | <b>71</b> |
| 5.1      | ANALÝZA VRE U HUMÁNNÍ POPULACE.....   | 71        |
| 5.1.1    | VRE u hospitalizovaných pacientů .....  | 71        |
| 5.1.2    | VRE u hematoonkologických pacientů .....  | 76        |
| 5.1.3    | VRE v komunitě a u hospitalizovaných pacientů (prospektivní studie)....                   | 78        |
| 5.1.4    | VRE u pacientů hospitalizovaných s onemocněním COVID-19 .....                             | 81        |
| 5.2      | ANALÝZA VRE U ZVÍŘAT A V POTRAVINÁCH .....  | 82        |
| 5.3      | ANALÝZA VRE V PROSTŘEDÍ POVRCHOVÝCH A ODPADNÍCH VOD .....                                 | 84        |
| 5.3.1    | Korelace záchytu VRE s nálezy reziduí antibiotik v odpadních a<br>povrchových vodách..... | 87        |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| <b>6</b>  | <b>ZÁVĚR</b> .....  | 90  |
| <b>7</b>  | <b>SOUHRN</b> .....   | 92  |
| <b>8</b>  | <b>SUMMARY</b> .....  | 96  |
| <b>9</b>  | <b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....                               | 100 |
| <b>10</b> | <b>PUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY</b> .....                             | 112 |
| 10.1      | Publikace související s disertační prací .....                | 112 |
| 10.1.1    | Publikace v časopisech s impakt faktorech.....                | 112 |
| 10.1.2    | Publikace v recenzovaných časopisech bez impakt faktoru ..... | 112 |
| 10.1.3    | Seznam přednášek a posterů s abstraktem.....                  | 112 |
| 10.2      | Ostatní publikace .....                                       | 113 |
| 10.2.1    | Publikace v časopisech s impakt faktorech.....                | 113 |
| 10.2.2    | Publikace v recenzovaných časopisech bez impakt faktoru ..... | 114 |
| 10.2.3    | Seznam přednášek a posterů s abstraktem.....                  | 115 |
| <b>11</b> | <b>SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ A GRAFŮ</b> .....                  | 117 |
| 11.1      | Seznam tabulek .....  | 117 |
| 11.2      | Seznam obrázků .....  | 118 |
| 11.3      | Seznam grafů.....   | 118 |
| <b>12</b> | <b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....                         | 119 |

# 1 ÚVOD

## 1.1 REZISTENCE K ANTIMIKROBNÍM PŘÍPRAVKŮM

Antibiotika zavedená do klinické praxe v šedesátých letech minulého století znamenala přelom ve zdravotnictví. Díky nim bylo možné se vypořádat s řadou do té doby smrtelných bakteriálních infekcí. Přestože existuje velmi velké množství antimikrobiálních látek, z nichž si můžeme vybírat pro potenciální terapii infekcí, je u všech těchto látek dokumentována antimikrobiální rezistence, která se může objevit i krátce poté, co je nový lék schválen k použití (Reygaert, 2018).

Selekční tlak používaných antimikrobiálních látek, který vedl k nárůstu počtu rezistentních izolátů, byl zapříčiněn i počáteční neuváženou aplikací antibiotik v neopodstatněných případech. Dříve se objevoval i přístup k terapii pomocí antibiotik ve smyslu: „Když to nepomůže, neublíží to“ (Kolář, 2011). Mezi faktory, které postupně přispívaly k rezistenci, lze tedy řadit zvýšenou spotřebu antimikrobiálních látek, jak u lidí, tak i u zvířat (ať už jako terapie, profylaxe, či růstový stimulátor) (Castanon, 2007, Kolář, 2019), nesprávně předepisovaná či zbytečně nadužívaná antibiotika (Reygaert, 2018).

Rezistenci bakterií k antimikrobiálním látkám můžeme definovat jako schopnost mikrobiální populace odolávat účinku inhibiční koncentrace dané skupiny antimikrobiálních látek (Kolář *et al.*, 2002). Z molekulárně-biologického pohledu se jedná o přítomnost genetické informace v genomu bakterie, která kóduje příslušný mechanismus odolnosti bakterie k danému antibiotiku (Kolář, 2019). Úrovně rezistence se mohou u příbuzných bakteriálních skupin velmi lišit (Reygaert, 2018). Příkladem i v rámci jednoho rodu mohou být enterokoky. Zatímco *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) a *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) jsou primárně citlivé k vankomycinu, *Enterococcus gallinarum* (*E. gallinarum*) a *Enterococcus casseliflavus* (*E. casseliflavus*) je vankomycin-rezistentní (EUCAST).

Rozlišujeme dva základní typy rezistence:

Primární (přirozená) rezistence je definována jako znak, který je sdílen univerzálně v daném bakteriálním druhu. Jedná se o geneticky podmíněnou odolnost bakteriálního druhu, která nemá souvislost s předchozím kontaktem s antibiotiky. Podstatou přirozené rezistence je nepřítomnost cílové struktury (Kolář *et al.*, 2002; Reygaert, 2018). Bakterie jsou v tomto případě schopné růstu a množení i v přítomnosti daného antibiotika, které je nijak neovlivní. Příkladem přirozené rezistence může být necitlivost gramnegativních bakterií ke glykopeptidům či grampozitivních bakterií na aztreonam (Reygaert, 2018). Enterokoky jsou primárně rezistentní na cefalosporiny, makrolidy, sulfonamidy a nízké hladiny aminoglykosidů (Kolář *et al.*, 2020).

Sekundární (získaná) rezistence znamená změnu původně citlivé bakterie na rezistentní. Důvodem je změna genomu bakterie způsobená buď spontánní mutací stávajících genů nebo získem nové genetické výbavy prostřednictvím horizontálního



přenosu genů (Kolář *et al.*, 2002). Spontánní mutace, mající za následek změnu bakteriálního genotypu, se dějí s frekvencí 1 mutace na  $10^6$ - $10^9$  dělení bakteriální buňky (Reygaert, 2018). Tento způsob vzniku a šíření rezistence je ovšem méně významný. Z klinického hlediska je mnohem závažnějším problémem antimikrobiální rezistence, která je způsobena horizontálním přenosem genů (Munita & Arias, 2016). Tento způsob umožňuje převzetí cizího DNA materiálu, nesoucí genetickou informaci podmiňující rezistenci. Je umožněn prostřednictvím extrachromozálních mobilních genetických elementů (plazmidy, transpozony, integrony) rekombinačními procesy. Mezi mechanismy zprostředkovávající tyto procesy řadíme konjugaci, transformaci a transdukcii (Kolář *et al.*, 2002).

Riziko související se získanou rezistencí představuje vyšší pravděpodobnost selhání antibiotické léčby. Klinickým dopadem bakteriální rezistence poté je vyšší morbidita a mortalita pacientů, spojená i s vyššími ekonomickými náklady na jejich léčbu (Reygaert, 2018).

Samostatnou kapitolou je možná přítomnost rezistentních bakterií jako součástí přirozené flory člověka. Jejich potenciální nebezpečí spočívá v tom, že mohou být zdrojem genů pro další bakterie a mohou se z nich stát potenciální etiologická agens, jejichž vysoká odolnost vůči antibiotické léčbě může způsobit selhání antibiotické terapie (Kolář, 2019). V roce 2001 byl problém bakteriální rezistence označen Světovou zdravotnickou organizací (WHO) jedním ze tří nebezpečí ohrožujících zdravotnictví 21. století (Horníková, 2011). V roce 2016 bylo na valném shromáždění OSN vysloveno následující prohlášení: „Lze odhadnout, že pokud se bude bakteriální rezistence zvyšovat stejným tempem jako doposud, budou v roce 2050 neléčitelné infekce vyvolané multirezistentními bakteriemi nejčastější příčinou úmrtí“ (Kolář, 2019).

Rezistence bakterií k antibiotikům je podmíněna řadou možných mechanismů. Jednotlivé mechanismy se mohou vzájemně kombinovat a potencovat. Jedná se o jev komplexní, zahrnující více faktorů. Pro vznik rezistentních bakteriálních kmenů je důležitý i neustálý selekční tlak používaných antibiotik. Velmi často rezistentní bakterie přetrvávají v prostředí, kde je soustavně používáno více druhů antimikrobních přípravků (Kolář *et al.*, 2002, Kolář, 2019). Navíc intenzivní používání antibiotik pro humánní, veterinární a zemědělské účely vede k jejich neustálému uvolňování do životního prostředí (Rizzo *et al.*, 2013).

## **1.2 MECHANISMY REZISTENCE BAKTERIÍ K ANTIMIKROBNÍM PŘÍPRAVKŮM**

Obecně jsou známy 4 hlavní mechanismy vzniku rezistentních bakterií (Kolář, 2020). Řadíme mezi ně následující: (1) enzymatická inaktivace antibiotika; (2) aktivní odčerpávání antibiotika z bakteriální buňky; (3) snížení propustnosti antibiotik do bakterie; (4) modifikace cílového místa pro antibiotikum. Pochopení těchto mechanismů

by mělo vést k lepším možnostem léčby infekčních onemocnění a k vývoji antimikrobiálních léčiv, která by odolala pokusům mikroorganismů o získání rezistence (Reygaert, 2018).

### 1.2.1 Enzymatická inaktivace

Jedním z mechanismů rezistence bakterií je možnost inaktivace antimikrobiálních látek pomocí enzymů, které bakterie vylučuje. Tyto enzymy mohou molekulu antibiotika rozrušit nebo ji modifikovat, přičemž mohou využívat různých mechanismů jako jsou hydrolýza, přenos funkční skupiny či redoxní mechanismy (zřídka) (Jana & Deb, 2006).

Nejnámějším příkladem mechanismu využívající hydrolýzu, je velmi početná skupina enzymů zvaná  $\beta$ -laktamázy, které narušením C-N vazby čtyřčlenného  $\beta$ -laktamového kruhu  $\beta$ -laktamových antibiotik (peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy, karbapenemy) způsobí ztrátu jejich antimikrobiální účinnosti (Kolář *et al.*, 2002, Majiduddin *et al.*, 2002).  $\beta$ -laktamázy mohou působit dvěma způsoby. Buď pomocí reaktivního serinového rezidua v aktivním místě, nebo účinkem těžkých kovů (nejčastěji  $Zn^{2+}$ ) spolu s rezidui histidinu a (nebo) cysteinu. Produkce  $\beta$ -laktamáz je příčinou rezistence k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům asi v 80 % případů (Kolář *et al.*, 2002).

Existuje více možností klasifikace  $\beta$ -laktamáz. Je možné klasifikovat podle hydrolytického spektra, citlivosti k inhibitorům  $\beta$ -laktamáz (kyselina klavulanová, sulbaktam, tazobaktam) či podle toho, zda jsou kódovány chromozomem nebo plazmidem. Od první klasifikace v roce 1968 Sawaiem a spol. proběhla řada reklasifikací (např. v letech 1970, 1973, 1976, 1981, 1989 a 1995). Největší reorganizace se uskutečnila v roce 1989 Bushovou a po následné revizi v roce 1995 jsou  $\beta$ -laktamázy klasifikované dle Bush-Jacoby-Mederois, založené na preferenci substrátu a citlivosti k inhibitorům, na 4 skupiny označované jako 1-4. Toto rozdělení nicméně nezohledňuje bodové mutace, které mohou způsobovat změnu substrátové specifity a citlivost k inhibitorům, což může pozměněnou  $\beta$ -laktamázu zařadit do jiné skupiny. To řeší klasifikace dle Amblera, která rozčleňuje  $\beta$ -laktamázy na základě sekvence aminokyselin a rozděluje je tak rovněž do 4 skupin označovaných jako A-D (Kolář *et al.*, 2002, Paterson & Bonomo, 2005). Bushová a Jacoby poté ještě v roce 2010 v návaznosti na svou dřívější práci uveřejnili nové rozšířené rozdělení  $\beta$ -laktamáz, které přidává nové funkční podskupiny (Bush & Jacoby, 2010). Neméně důležitým kritériem pro rozčlenění  $\beta$ -laktamáz je také jejich umístění v rámci bakteriálního genomu. Geny kódující tyto enzymy mohou být umístěny jak na chromozomu, tak na transpozonech, které pak umožňují šíření mezi plazmidy a dalšími bakteriemi (Kolář *et al.*, 2002). Geny  $\beta$ -laktamáz nesené plazmidy se nejčastěji vyskytují u enterobakterií, ale mohou se vyskytovat i u některých druhů grampozitivních bakterií, jako jsou *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *E. faecalis* a *E. faecium* (Reygaert, 2018).

Následující část je věnována významným  $\beta$ -laktamázám. První důležitou skupinu enzymů přispívající k rezistenci k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům, jsou tzv. AmpC enzymy.

Jedná to jedny z prvních charakterizovaných  $\beta$ -laktamáz, identifikovány byly u *Escherichia coli* a jsou kódovány chromozomálně – genem *ampC* (pojmenovaným podle rezistence k ampicilinu). Tento gen je sice konstitutivně exprimován na nízké úrovni, ale mutace mohou vést k jeho nadměrné expresi.  $\beta$ -laktamázy typu AmpC jsou nejúčinnější proti penicilínům a některým cefalosporinům první generace (Reygaert, 2018). Jde o skupinu cefalosporináz, spadajících do skupiny 1 podle Bush-Jacoby-Mederois a skupiny C podle Amblera. Jejich společnou vlastností je, že nejsou inhibovatelné inhibitory  $\beta$ -laktamáz (kys. klavulanovou a ve většině případů ani sulbaktamem či tazobaktamem) (Kolář *et al.*, 2002, Ambler, 1980, Bush *et al.*, 1995).

Další, početně velmi obsáhlou skupinou hydrolyzujících enzymů, představujících vážný klinický problém, jsou tzv. širokospektrální  $\beta$ -laktamázy (ESBL = z angl. extended-spectrum- $\beta$ -lactamases). Tento typ, v tomto případě již plazmidově-kódovaných  $\beta$ -laktamáz, představuje hlavní příčinu rezistence proti cefalosporinům s rozšířeným spektrem účinku, monobaktamům a penicilinům u čeledi *Enterobacteriaceae* (Kolář *et al.*, 2002, Paterson, 2006). ESBL spadají skupiny 2 podle Bush-Jacoby-Mederois a současně do skupiny A dle Amblera (Ambler, 1980, Bush *et al.*, 1995). Nejčastěji se vyskytující enzymy této skupiny jsou tzv. TEM a SHV enzymy. Dále pak také enzymy typu CTX-M a OXA. Charakteristickým znakem této skupiny je, že jsou inhibovatelné inhibitory  $\beta$ -laktamáz (Kolář *et al.*, 2002, Paterson, 2006, Ryagert, 2018).

Další skupinou enzymů jsou tzv. karbapenemázy. Na léčbu infekcí způsobených ESBL či AmpC pozitivními kmeny jsou lékem volby rezervní  $\beta$ -laktamová antibiotika – karbapenemy. Bohužel, rezistence se nevyhnula ani této skupině antibiotik. Karbapenemázy jsou členěny, stejně jako ostatní  $\beta$ -laktamázy, dle klasifikace navržené Bushovou, případně dle Amblera. V těchto klasifikačních systémech se vzájemně překrývají a jsou zařazeny ve třech skupinách. Mezi nejvýznamnější zástupce patří enzymy serinové karbapenemázy (KPC, GES, SME) či metalo- $\beta$ -laktamázy (MBL) (VIM, IMP, NDM), případně OXA karbapenemázy. Je pro ně charakteristické, že jsou inhibovány kyselinou 3-aminofenylboritou (3-APB), vyjma MBL, které jsou inhibovatelné EDTA (Htoutou-Sedláková *et al.*, 2011; Hrabák *et al.*, 2012).

Rezistence zprostředkovaná  $\beta$ -laktamázami je stále více spojována právě s plazmidově kódovanými  $\beta$ -laktamázami, a to jak u ESBL a u karbapenemáz. Konkrétně s rodinou ESBL (CTX-M), rodinou serinových karbapenemáz (KPC) či metalo- $\beta$ -laktamázami (VIM, IMP a NDM-1) (Bush, 2010).

Kromě  $\beta$ -laktamových antibiotik existují ale i další antimikrobiální látky, které mohou být inaktivovány mechanismem hydrolýzy, a tím je např. tetracyklin, a to prostřednictvím genu *tetX* (Reygaert, 2018).

### 1.2.2 Aktivní eflux

Další možným mechanismem rezistence k antimikrobiálním látkám je aktivní odčerpávání antimikrobiální látky ven z bakteriální buňky prostřednictvím proteinové efluxní pumpy zabudované v cytoplazmatické membráně. Efluxní pumpy jsou schopny selektivně vychytávat pro buňku toxické látky (které se do nich dostaly z vnějšího prostředí) z cytoplazmy a snižovat tak jejich koncentraci v buňce. Vyskytují jak u grampozitivních, tak u gramnegativních bakterií (Stavri *et al.*, 2007; Hricová & Kolář, 2014). Bakterie mají geny pro efluxní pumpy chromozomálně zakódované, vyskytují se ovšem i na plasmidech. Některé se exprimují konstitutivně, jiné jsou indukovány nebo nadměrně exprimovány (vysoká úroveň rezistence je obvykle způsobena mutací modifikující transportní kanál) při určitých podnětech z prostředí nebo při přítomnosti vhodného substrátu (Reygaert, 2018). Rezistence může být způsobena dvěma způsoby. Buď zvýšenou expresí genů kódujících proteiny efluxních pump, což vede k jejich vyššímu počtu a rychlejšímu vypuzení antibiotika nebo tím, že je přítomen takový substrát, který zvýší afinitu k dané antimikrobiální látce a tím zefektivní její průchod ven z buňky (Piddock, 2006).

Pumpy mohou být specializované buď na jeden typ substrátu nebo pro řadu strukturálně nepříbuzných látek. V případě schopnosti vylučovat různá antibiotika jsou pak označovány jako MDR (multiple drug resistance) pumpy (Webber & Piddock, 2003).

Klasifikace efluxních pump je z důvodů jejich rozmanitosti řešena pomocí fylogenetického seskupení, na základě proteinových sekvencí. Lze je rozdělit do 5 skupin. RND pumpy (resistance-nodulation-division), MF pumpy (major facilitator), MATE pumpy (multidrug and toxic efflux), SMR (small multi-drug resistance/staphylococcal multiresistance family) a ABC pumpy. První 4 zmiňované využívají jako zdroj energie pro transport dané látky protonový gradient na membráně, zatímco poslední zmiňovaná jako zdroj používá hydrolýzu ATP (Webber & Piddock, 2003; Li *et al.*, 2015).

Jednou z nejprostudovanějších pump je AcrAB-TolC u *E. coli*, spadající do skupiny RND pump. Tato pumpa se skládá ze 3 na sebe navazujících částí procházejících skrz celou buněčnou stěnu bakterie. Zbylé skupiny pump jsou lokalizované pouze na vnitřní membráně (Reygaert, 2018, Du *et al.*, 2014).

### 1.2.3 Snížení permeability buněčné stěny

Je-li snížena propustnost buněčné stěny, jako první bariéry vstupu, je znesnadněno antimikrobní látce pronikat ke svým cílovým místům. Vstup do většiny antibiotik do gramnegativních bakterií je zajištěn pomocí pasivních přenašečů, tzv. porinů. Dojde-li ke strukturální změně porinu, ztrátě či k jeho snížené expresi, neproniká antibiotikum do bakteriální buňky a získá tím pádem určitý stupeň rezistence (Giedraitienė *et al.*, 2011).

Studie Tsai *et al.*, 2011 potvrzuje tuto skutečnost u *Klebsiella pneumoniae*, která disponuje 2 hlavními hydrofilními poriny pro průchod  $\beta$ -laktamů, a to OmpK35 a OmpK36. Zvyšující se rezistence, z důvodu produkce širokospektrých  $\beta$ -laktamáz, ale komplikuje léčbu těmito antibiotiky. U většiny ESBL negativních kmenů *Klebsiella pneumoniae* se exprimovaly oba typy porinů, nicméně u ESBL pozitivních kmenů byl ve většině případů detekován pouze OmpK36 porin. Absence OmpK35 může být jedním z faktorů přispívajících k antibiotické rezistenci (Tsai *et al.*, 2011).

Vzhledem k tomu, že grampozitivní bakterie nemají vnější membránu, tak tento mechanismus rezistence u nich není tak častý. U enterokoků navíc je možné zmínit skutečnost, že polární molekuly antibiotika mají potíže proniknout buněčnou stěnou, což umožnilo vnitřní rezistenci k aminoglykosidům (Reygaert, 2018).

#### 1.2.4 Modifikace cílového místa

V bakteriální buňce existuje mnoho složek, které mohou být cílem antimikrobiálních látek, a stejně tak existuje mnoho cílů, které mohou být bakteriemi modifikovány tak, aby umožnily rezistenci vůči těmto léčivům (Reygaert, 2018). V následující části bude uvedeno, několik příkladů tohoto mechanismu rezistence k antimikrobiálním látkám.

Rezistence spojená s modifikací cílového místa může hrát roli u antibiotik zaměřených na syntézu DNA. Příkladem mohou být (fluoro)chinolony, jejichž antimikrobiální aktivita je způsobena inhibicí replikace DNA. Jejich konkrétním terčem jsou enzymy typu topoizomeráz (DNA gyráza u grampozitivních, topoizomeráza IV u gramnegativních bakterií), které modifikují dvoušroubovici DNA tím, že její dvojitý řetězec přerušují a opět navazují čímž zamezují jejímu druhotnému stáčení (Hricová *et al.*, 2017). Inhibicí aktivity tohoto typu enzymu dojde k usmrcení buňky. Vývoj bakteriální rezistence k chinolonovým antibiotikům je multifaktoriální proces chromozomálního i plazmidového původu (Briales *et al.*, 2011). Rezistence je v tomto případě způsobena bodovými mutacemi, které mají za následek, že cílový enzym (topoizomeráza) je změněn (často v blízkosti jeho aktivního místa), případně může být snížena jeho afinita k antimikrobiální látce (Hricová *et al.*, 2017).

Další z možností modifikace cílového místa je mechanismus, kdy bakterie získá gen kódující cílovou strukturu se sníženou afinitou k antimikrobiální látce. Jedním z významných příkladů tohoto typu mechanismu je rezistence vůči  $\beta$ -laktamovým antibiotikům, které používají téměř výhradně grampozitivní bakterie. Jedná se o změnu struktury a/nebo počtu PBP (proteinů vázících penicilin), což jsou transpeptidázy, které se podílejí na stavbě peptidoglykanu v buněčné stěně. Získá-li bakterie gen *mecA*, změní se PBP na PBP2a, přičemž si tento modifikovaný enzym zachovává svou enzymatickou aktivitu, ale již není schopen vázat peniciliny. Bakterie tedy přežívá i v přítomnosti antimikrobiální látky (Reygaert, 2018). Praktickou ukázkou je např. rezistence k meticilinu u *S. aureus*, vzniklou přijetím genu *mecA*, který se často nachází ve velkém

fragmentu DNA označovaném jako stafylokoková chromozomální kazeta mec (SCCmec). Jedná se jeden z více faktorů vzniku tzv. MRSA (meticilin rezistentního stafylokoka) (Munita & Arias, 2016; Mundy *et al.*, 2000).

Další možným mechanismem založeným na modifikaci cílového místa, v tomto případě na modifikaci buněčné stěny, konkrétně peptidoglykanu jako její hlavní složky, je např. rezistence enterokoků k vankomycinu. Glykopeptidy se za normálních podmínek navazují koncové části na peptidoglykanových prekurzorů, které jsou tvořeny dvojicí aminokyselin D-alanyl-D-alanyl. Po navázání na tyto prekurzory antibiotikum prostorově brání zesíťování vznikajícího peptidoglykanu, čímž je inhibována tvorba buněčné stěny, zastavuje se růst buňky, mající za následek smrt bakterie. Přijetím některého z *van* genů za pomoci rekombinačních procesů se terminální části peptidoglykanu mohou změnit na D-alanyl-D-laktát nebo D-alanyl-D-serin. Tím je znemožněna vazba antibiotika a bakterie se vůči němu stává rezistentní. (Kolář, 2018, Courvalin, 2006).

### **1.3 CHARAKTERISTIKA ENTEROKOKŮ A JEJICH REZISTENCE K ANTIMIKROBNÍM PŘÍPRAVKŮM**

Aby antibiotikum mohlo působit antimikrobiálně, musí vstoupit do bakteriální buňky, kde musí zůstat stabilní nebo být aktivováno, přičemž musí být akumulováno na danou inhibiční koncentraci. Poté může vyhledat a interagovat se svým cílem a provést antimikrobiální účinek. Změny v kterémkoli z těchto kroků vedou k rezistenci bakterií vůči antibiotiku bez ohledu na způsob účinku, chemickou strukturu či spektrum účinku (Hochvaldová *et al.*, 2022).

#### **1.3.1 Rod *Enterococcus***

Enterokoky jsou ovoidní grampozitivní koky uspořádané v řetězcích či dvojicích. Jedná se o bakterie kataláza negativní, nesporeující, fakultativně anaerobní. Jsou schopny růstu v teplotním rozmezí 5-50 °C, a to díky přítomnosti membránových lipidů a mastných kyselin v buněčné stěně. Nепropustnost bakteriální stěny pro kyseliny a zásady je důvodem proč jsou schopny přežít rozmezí pH 4,8-9,6. Enterokoky mohou žít i v prostředí s 6,5 % NaCl. Jsou také rezistentní k velké většině chemických desinfekčních látek používaných ve zdravotnictví a potravinářském průmyslu (Kolář, 2018, Vu & Carvalho, 2011, Fisher & Phillips, 2009).

Zástupci rodu *Enterococcus* představují přirozenou mikroflóru gastrointestinálního traktu (GIT) lidí a teplokrevných zvířat. Nicméně, pokud je narušen komenzální vztah s hostitelem, mohou enterokoky způsobit invazivní infekce (Ramos *et al.*, 2020). A to jak komunitního, tak nozokomiálního charakteru. Enterokoky jsou celosvětově jedním z nejčastějších původců infekcí spojených se zdravotní péčí. Mohou vyvolat infekce močového traktu, měkkých tkání, krevního řečiště, respiračního traktu, infekce břicha a pánve. Dále mohou vyvolat endokarditidy nebo zapříčinit infekci v místě

operačního výkonu (Vu & Carvalho, 2011, Kolář, 2018, García-Solache & Rice, 2019). U zdravých jedinců jsou enterokoky obvykle neškodné. Oportunními patogeny se mohou stát u pacientů s těžkým základním onemocněním, u pacientů na jednotkách intenzivní péče (JIP), u pacientů s oslabenou imunitou či po předchozí terapii širokospektrými antibiotiky (Vágnerová & Kolář, 2003; Ramos *et al.*, 2020).

Enterokoky, které byly v lidské fekální floře objeveny v roce 1899 (Zhou *et al.*, 2020), se staly základem podrobných biochemických analýz a kultivačních vlastností, samostatným rodem oddělením od rodu *Streptococcus* roku 1984, v kterém byly do té doby klasifikovány jako streptokoky skupiny D (García-Solache & Rice, 2019). Nyní je do rodu *Enterococcus* řazeno přes 50 jednotlivých druhů, přičemž mezi nejběžnější zástupce řadíme *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* (Vu & Carvalho, 2011, Ramos *et al.*, 2020). To potvrzuje i studie Kučové *et al.* z roku 2021, kteří ve práci posuzovali enterokokové infekce u pacientů ve Fakultní nemocnici Olomouc (FNOL) v období let 2015-2019. *E. faecalis* a *E. faecium* tvořily více jak 90 % nejčastěji izolovaných druhů. Nejčastěji je poté z humánního klinického materiálu izolován *E. faecalis* (Moghimbeigi *et al.*, 2018). Tento druh je sice patogenější, ale *E. faecium* začíná mít stále větší význam, protože je často odolnější vůči antimikrobiálním látkám (Ramos *et al.*, 2020). Mezi další druhy, které jsou ale identifikovány jako původci onemocnění vzácně, lze řadit *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus durans* aj. (Kučová *et al.*, 2021).

Enterokoky jsou přirozeně rezistentní k celé řadě antibiotik, a to např. k cefalosporinům, makrolidům, sulfonamidům či nízkým hladinám aminoglykosidů (Kolář *et al.*, 2004, Kolář, 2018). Vyšší míra rezistence k antibiotikům je běžnější u druhu *E. faecium* (Asgin & Otlů, 2020). Lékem volby při infekcích způsobených *E. faecalis* jsou aminopeniciliny, které v případě těžších infekcí mohou být kombinované s gentamicinem. Onemocnění, jejichž původcem je *Enterococcus faecium* jsou léčeny glykopeptidy (vankomycin, teikoplanin), případně při selhání antibiotické léčby je indikován linezolid, popř. tigecyklin (Kučová *et al.*, 2021).

Enterokoky mohou disponovat různými faktory virulence, které jim napomáhají ke vzniku infekcí a hrají tak významnou roli v jejich patogenitě. Napomáhají jim v kolonizaci, invazi do tkáně hostitele, pomáhají jim vyhnout se imunitní odpovědi hostitele či podporují jejich adhezenci k povrchu v místě výskytu (Fisher & Phillips, 2009; Ben Braïek & Smaoui, 2019; Ramos *et al.*, 2020). Mezi nejběžnější a dobře popsané faktory virulence můžeme řadit agregační substanci (*agg/asa1*), cytolysin (*cyI*), želatinázu (*gelE*), enterokokový povrchový protein (*esp*) a hyaluronidáza (*hyl*).

Agregační substance (*agg/asa1*) je název glykoproteinu, který podporuje formaci bakteriálních buněk při feromonem indukované konjugaci, a to vytvořením spoje mezi dárcovskou a recipientní buňkou navázáním na příbuzný ligand. Také zprostředkovává specifické vazby k epiteliálním buňkám pro kolonizaci a následnou možnou výměnu

plazmidů. Těmi je poté může být umožněn horizontální transfer genů rezistence (Schlievert *et al.*, 1998). Agregační substance se vyskytuje převážně u druhu *E. faecalis* (Fisher & Phillips, 2009; Ben Braïek & Smaoui, 2019).

Cytolysin (*cyl*), někdy také označovaný jako hemolyzin, je bakteriální toxin, schopný vytvářet póry v cytoplazmě bakterií i eukaryotických buněk (Van Tyne *et al.*, 2013). Studie uvádějí přítomnost cytolysinu převážně u druhu *E. faecalis* (u~30 % kmenů), přičemž není podstatným faktorem patogenity, nicméně může klinicky zhoršit průběh infekce tím, že ničí buňky, jako jsou makrofágy a neutrofilové (Ramos *et al.*, 2020, Elsner *et al.*, 2000). Způsobí-li infekci enterokok disponující cytolysinem je možnost úmrtí daného jedince až 5x vyšší (Ben Braïek & Smaoui, 2019).

Želatináza (*gelE*) je extracelulární endopeptidáza, která je schopna podílet se na hydrolyze želatiny, kolagenu, hemoglobinu, kaseinu či bioaktivních peptidů (Fisher & Phillips, 2009; Ben Braïek & Smaoui, 2019). Tato proteáza může hrát důležitou roli ve tvorbě biofilmu, který umožní enterokokům kolonizovat tkáň a přetrvávat tak v místě infekce (Ben Braïek & Smaoui, 2019). Předpokládá se, že také poskytuje bakteriím živiny rozkladem tkáň hostitele (Ramos *et al.*, 2020).

Enterokokový povrchový protein (*esp*) se vyskytuje jak u *E. faecalis* tak u *E. faecium* (Oancea *et al.*, 2004). Byl jedním z prvních popsaných faktorů virulence u rodu *Enterococcus*, a to v roce 1999. Enterokokový povrchový protein umožňuje vysokou přilnavost k hostitelské tkáni, následnou kolonizaci a perzistenci (Jovanović *et al.*, 2018). Může tedy mít i přímou souvislost se vznikem biofilmu např. v močovém traktu. Studie ukazují, že po narušení genu *esp* se tvorba biofilmu zhoršuje a naopak, že po přijetí genu plazmidovým přenosem do *esp*-negativního enterokoka se jedinec stane producentem biofilmu (Fisher & Phillips, 2009). Povrchový protein (*Esp*) může mít kromě role v adhezi také funkci při vyhýbání se imunitní odpovědi hostitele a v rezistenci vůči antibiotikům (Ramos *et al.*, 2020).

Hyaluronidáza (*hyl*) je hydrolytický enzym, který degraduje kyselinu hyaluronovou, a tím poškozuje okolní tkáň a umožní tak další šíření enterokokům. Dle studií je její výskyt je častější u klinických izolátů než u izolátů z GIT (Fisher & Phillips, 2009; Biswas *et al.*, 2016).

### 1.3.2 Vankomycin-rezistentní enterokoky (VRE)

Mezi tři hlavní důvody vzniku (multi)rezistentních enterokoků patří (i) přirozená rezistence k antimikrobiálním látkám, jako jsou  $\beta$ -laktamy a aminoglykosidy, (ii) získaná rezistence prostřednictvím mobilních elementů (jako jsou transpozony a plazmidy) proti glykopeptidům, chinolonům a tetracyklinům, makrolidům a streptograminům nebo (iii) a umožnění dalších přenosů genů rezistence (Mundy *et al.*, 2000).

Nejběžněji se vyskytující druhy *E. faecalis* a *E. faecium* jsou přirozeně rezistentní k cefalosporinům, makrolidům, sulfonamidům či nízkým hladinám aminoglykosidů.



Přirozenou rezistenci k vankomycinu vykazují pouze druhy *E. gallinarum* a *E. casseliflavus* (EUCAST), které ale nepatří mezi často izolované druhy. Prvním lékem volby u infekcí s etiologickou rolí *E. faecalis* jsou aminopeniciliny, v případě závažnějších infekcí poté v kombinaci s aminoglykosidy, zejména gentamicinem. U kmenů *E. faecium* se volí k léčbě glykopeptidy, v případě potvrzení VRE jsou indikovány linezolid či tigecyklin (Kolář, 2018, Kučová *et al.*, 2021).

Limitujícím faktorem v léčbě enterokokových infekcí je právě rezistence získaná, kdy původně citlivá bakterie přijme horizontálním přenosem genetický materiál nesoucí některý z *van* genů, který má za následek necitlivost k použitému glykopeptidovému antibiotiku (= vankomycin). Infekce vyvolané vankomycin-rezistentními kmeny (VRE) představují tedy terapeutický problém a ohrožení pacienta (Kolář, 2018). Získanou rezistencí disponuje zejména *E. faecium*, u druhu *E. faecalis* je takový typ rezistence vzácný (Werner *et al.*, 2008). Antibiotická rezistence u druhů *Enterococcus* může být přenášena konjugativními plazmidy či transpozony a přičemž geny rezistence se mohou přenášet nejen na enterokoky citlivé na antibiotika, ale i na jiné patogeny (Fisher & Phillips, 2009).

Mechanismus rezistence enterokoků k vankomycinu je popsán v kapitole 1.2.4. Jeho základem je tedy změna standardně přítomných peptidoglykanových prekurzorů D-alanyl-D-alanyl v buněčné stěně bakterie za D-alanyl-D-laktát, který má 1000krát nižší afinitu k vankomycinu, nebo za D-alanyl-D-serin, který má jen sedmkrát nižší afinitu k vankomycinu (Ahmed & Baptiste, 2017). Nicméně se jejich přítomností odstraní původní citlivý cíl. Tři hlavní nejdůležitější typy rezistence jsou kódovány klastry *vanA*, *vanB* a *vanC* (Fisher & Phillips, 2009). U enterokoků bylo ovšem celkově popsáno 9 odlišných genových klastrů. Za syntézu D-alanyl-D-laktát jsou odpovědné geny *vanA*, *vanB*, *vanD* a *vanM* a za změnu na D-alanyl-D-serin poté geny *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* a *vanN* (Kristich *et al.*, 2014).

Gen *vanA* je často lokalizován na transpozonu Tn1546, který může být umístěn na chromozomu nebo na přenosných plazmidech, je u enterokoků široce rozšířen. VanA fenotyp poté vykazuje rezistenci k vankomycinu a teikoplaninu (Kolář, 2018, Courvalin, 2006). Gen *vanB* je nejčastěji přenášen transpozonem Tn5382 (v některých publikacích označovaným také jako Tn1549) a v rámci fenotypu izoláty vykazují rezistenci k vankomycinu se zachovalou citlivostí k teikoplaninu (Kolář, 2018; García-Solache & Rice, 2019). Gen *vanC*, způsobuje u enterokoků vnitřní rezistenci a ta specifická pro *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* a *E. flavescens*, přičemž operon *vanC* je umístěn chromozomálně a není přenosný (Fisher & Phillips, 2009).

V Evropě se nejčastěji vyskytuje fenotyp *vanA* (Talaga *et al.*, 2018), ale začínají se objevovat již i dominantní klony *vanB* (Vehreschild *et al.*, 2019), které byli dříve typické spíše pro Austrálii a jihovýchodní Asii (Asgin & Otlů, 2020). V České republice dominuje fenotyp *vanA*, který je charakteristický vysokou rezistencí k vankomycinu a teikoplaninu.

Zatímco enterokoky fenotypu vanB jsou rezistentní k vankomycinu, ale mají zachovanou citlivost k teikoplaninu (Kučová *et al.*, 2021).

### 1.3.3 Rezistence enterokoků k dalším antibiotikům

Enterokoky jsou přirozeně rezistentní vůči několika antibiotikům a snadno akumulují mutace a exogenní geny, které jim propůjčují další rezistenci (Arias & Murray, 2012).

*E. faecalis* a *E. faecium* se vyznačují sníženou citlivostí k mnoha látkám, které jsou poměrně účinné proti streptokokům a stafylokokům. Z  $\beta$ -laktamů jsou primárně rezistentní prakticky ke všem cefalosporinům, dále pak k makrolidům, sulfonamidům či k nízkým hladinám aminoglykosidů (García-Solache & Rice, 2019; Kolář, 2018). *E. faecalis* je navíc primárně rezistentní i ke klindamycinu a ke quinopristinu/dalfopristinu (Kolář, 2018).

Rezistence enterokoků vůči  $\beta$ -laktamům je způsobena expresí nízkoafinitního proteinu vázajícího penicilin (PBP), označovaného PBP4 u *E. faecalis* a PBP5 u *E. faecium* (García-Solache & Rice, 2019), na které se  $\beta$ -laktamová antibiotika vážou slabě. V důsledku toho jsou minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro peniciliny jsou obvykle 2-8 mg/ml pro *E. faecalis* a 8-16 mg/ml pro *E. faecium*, což je mnohem více než MIC pro streptokoky a příbuzné grampozitivní organismy, které neobsahují chromozomálně kódované nízkoafinitní geny PBP (Hollenbeck & Rice, 2012). Rezistence vůči klinicky dosažitelným koncentracím aminoglykosidů se připisuje špatnému průniku těchto látek buněčným obalem enterokoků. Důvod tohoto slabého pronikání není jasný, ale bylo předpokládá se, že metabolismus enterokoků je v podstatě anaerobní, což vylučuje transport aminoglykosidů přes cytoplazmatickou membránu, který je závislý na kyslíku (García-Solache & Rice, 2019).

Kromě primární rezistence jsou enterokoky mimořádně úspěšní v rychlém získávání rezistence prakticky na všechny antimikrobiální látky zavedené do klinického použití. Po zavedení chloramfenikolu, erytromycinu a tetracyklinů rychle následoval vznik rezistence, která v některých případech dosáhla takové prevalence, že znemožnila jejich empirické použití (Kristich *et al.*, 2014). Získaná rezistence u enterokoků, způsobená ojedinělými mutacemi nebo prostřednictvím získáním cizího genetického materiálu horizontálním přenosem, je příčinou rezistence i k dalším antibiotikům (Hollenbeck & Rice, 2012).

Jak již bylo uvedeno, enterokoky jsou primárně rezistentní vůči velké většině  $\beta$ -laktamů, citlivé jsou pouze na omezený počet penicilinů. Získaná rezistence k těmto penicilinům je dosažitelná dvěma mechanismy. Prvním je produkce  $\beta$ -laktamázy, která je dle studií identická s  $\beta$ -laktamázou produkovanou *S. aureus*. Nicméně exprese  $\beta$ -laktamázy u *E. faecalis* se liší od exprese u *S. aureus* tím, že její transkripce není indukovatelná působením  $\beta$ -laktamových látek a zdá se, že enzym zůstává vázán na

membránu. Zprávy o produkci  $\beta$ -laktamázy u kmenů *E. faecium* jsou ale poměrně vzácné (García-Solache & Rice, 2019) a převážně byly popsány u *E. faecalis* (Hollenbeck & Rice, 2012). Druhý důležitý mechanismus rezistence k penicilinu je způsoben expresí nízkofinitního PBP5 u *E. faecium*, přičemž nejčastějším důvodem je mutace v genu *pbp5* vedoucí k záměně aminokyselin v aktivním místě enzymu nebo v jeho blízkosti. Tyto vysoce rezistentní kmeny vůči ampicilinu spadají do relativně malého počtu linií, které se ale široce rozšířily převážně v nemocnicích a způsobují klinické infekce a kolonizaci pacientů (Galloway-Peña *et al.*, 2009).

Zatímco primární mechanismy vedou pouze k nízké rezistenci vůči aminoglykosidům, získáním mobilních genetických prvků je typicky základem vysoké rezistence vůči aminoglykosidům jak u *E. faecium*, tak u *E. faecalis*. Mezi geny, které kódují vysokou rezistenci, jsou nejvíce znepokojující ty, které vedou k rezistenci vůči gentamicinu a streptomycinu, protože tato antibiotika se používají k synergické terapii závažných enterokokových infekcí (Hollenbeck & Rice, 2012). Mechanismem rezistence je v tomto případě přítomnost enzymu(ů), které katalyzují kovalentní modifikaci amino- a hydroxy- skupiny v molekule aminoglykosidů, což výrazně snižuje afinitu vazby mezi antibiotikem a bakteriálním ribozomem (Arias & Murray, 2012). Jeden z prvních byl mezi enterokoky znám gen, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, který zprostředkovává vysokou rezistenci vůči gentamicinu, následován byl brzy dalšími (*aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, and *aph(2'')-Id*). Mezi další geny, které kódují rezistenci enterokoků k různým aminoglykosidům, ale ne ke gentamicinu jsou řazeny *aph(3')-IIIa* a *ant(4')-Ia* (Vakulenko *et al.*, 2003).

Dalším získaným mechanismem rezistence může být příklad metylace ribozomů. Výsledkem tohoto mechanismu je snížená schopnost makrolidů vázat se na ribozomy. Jedná se o jeden z nejčastějších mechanismů rezistence k erytromycinu, která má za následek rezistenci enterokoků k makrolidům (Ahmadpoor *et al.*, 2021). Tato genetická informace je nesena na genu *ermB*. Předpokládá se, že je gen *ermB* je kotransferován společně s genem rezistence k vankomycinu (*vanA*), protože oba geny jsou přítomny na stejném konjugativním plazmidu (Raza *et al.*, 2018). Tímto faktem by mohla být podpořena hypotéza, že tato vazba by mohla být příčinným faktorem přetrvávající perzistence VRE (Ramos *et al.*, 2020). Druhým mechanismem, jak se může rezistence k makrolidům projevit je eflux této antimikrobiální látky, zprostředkovaný efluxními pumpami, kódovanými geny *mef* a *msr* (Malhotra-Kumar *et al.*, 2005; Ahmadpoor *et al.*, 2021).

Mezi další příklady mechanismů získané rezistence u enterokoků můžeme řadit např. modifikace v tzv. QRDR (quinolone resistance-determining region) oblasti mající za následek rezistenci k fluorochinolonům (*gyrA*, *parC*) či eflux tetracyklinů z bakteriální buňky (*tetL*) (García-Solache & Rice, 2019).

### 1.3.4 Vybrané faktory podporující vznik rezistence enterokoků v prostředí

Aplikace antibiotik je nedílnou součástí terapie bakteriálních onemocnění. Nicméně jejich nadměrná spotřeba, či špatná indikace má však negativní dopad na zvyšování četnosti rezistentních bakterií (Lochmannová *et al.*, 2004). Celosvětově je zaznamenáván nárůst rezistence bakterií vůči používaným antimikrobiálním látkám. Vývoj bakteriální rezistence vůči antibiotikům je způsoben rychlou evolucí bakteriálního genomu pod selekčním tlakem antibiotik a selekčním tlakem prostředí. Rezistence se může vyvinout vůči jakémukoli antibiotiku. Důležitým předpokladem nárůstu multirezistentních kmenů je trvalý selekční tlak rutinně používaných antibiotik (Kolář *et al.*, 2001).

Mezi faktory, které přispěly k rostoucímu problému rezistence tedy lze řadit zvýšenou spotřebu antimikrobiálních léčiv u lidí i zvířat a nesprávné předepisování antimikrobiální léčby. Příkladem může být prvotní předepsání širokospektrého léku, který je zbytečný nebo se nakonec ukáže jako neúčinný na mikroorganismy způsobující infekci. Nebezpečí pak spočívá v tom, že toto nadměrné užívání antibiotik u lidí vede ke vzniku rezistentních mikroorganismů (Reygaert, 2018).

Antibiotika se již mnoho let používají k léčbě nebo prevenci onemocnění v chovech potravinových zvířat. Antibiotika v množstvích, která se pohybují od nižších, než terapeutických hladin až po plné terapeutické hladiny se vyskytují i v krmivu pro zvířata, přičemž se jedná o antibiotika, která pocházejí z většiny antimikrobiálních tříd používaných u lidí. Existují studie podporující teorii, že podávání antibiotik potravinovým zvířatům může mít za následek, že tímto původem vzniklé rezistentní organismy mohou být přeneseny na lidi. A to buď konzumací potravin pocházející z těchto zvířat či přímým kontaktem (Landers *et al.*, 2012, Reygaert, 2018).

Vzhledem k tomu, že rozvoj antimikrobiální rezistence (AMR) a její šíření v životním prostředí je v současné době velkým problémem v oblasti veřejného zdraví, ustanovila WHO (World Health Organisation) skupinu bakterií, které jsou hlavní příčinou život ohrožujících infekcí ve zdravotnických zařízeních. Jedná se o tzv. skupinu ESKAPE (*Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*). V posledních letech se navíc ukázalo se šíření bakterií ESKAPE se neomezuje pouze na lékařské a zdravotnické systémy, ale zahrnuje také stanoviště s antropogenním nebo zemědělským vlivem (Savin *et al.*, 2020).

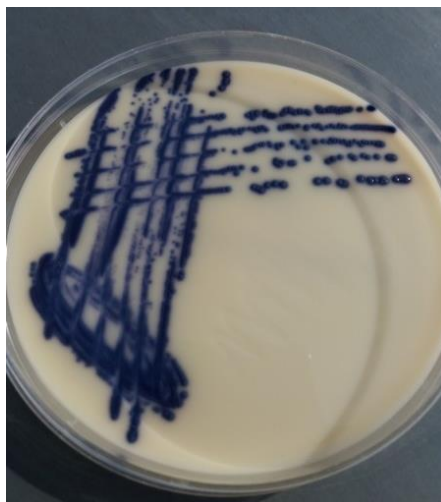
Je potvrzeno, že konkrétně také VRE mají široký výskyt v různých environmentálních a klinických nikách (Raza *et al.*, 2018). Původních zdrojů VRE tedy může být celá řada, ať už lidský gastrointestinální trakt, animální oblast, nemocniční prostředí či rovněž odpadní vody (Arias & Murray, 2012; Nnadozie & Odume, 2019; Asgin & Otlu, 2020; Hassoun-Kheir *et al.*, 2020; Hricová *et al.*, 2020; Wist *et al.*, 2020).

## 1.4 FENOTYPOVÁ A GENETICKÁ DETEKCE VRE

### 1.4.1 Fenotypová detekce

K základním metodám identifikace enterokoků patří identifikace na základě typických růstových vlastností na krevním agaru. Na něm enterokoky narůstají po 24 hodinové aerobní kultivaci při 37 °C svou typickou morfologií v podobě drobných modrošedých kolonií, často se zónou viridace. Pro zrychlenou identifikaci VRE lze využít chromogenní půdy (např. Brilliance VRE Agar chromogenní půdy (Oxoid, Brno, Česká republika), které umožňují identifikaci vankomycin-rezistentních *E. faecium* a *E. faecalis* z klinických vzorků do 24 hod. *E. faecium* na půdě naroste v podobě tmavě fialových kolonií (Obr.1), *E. faecalis* ve světle modrých koloniích.

**Obrázek 1:** Kultura vankomycin-rezistentního *E. faecium* na vyhledávací půdě Brilliance Oxoid (foto autor, 2020)



Diagnostika, po nárůstu na krevním agaru, následně pokračuje identifikací za pomoci systému MALDI-TOF MS (Biotyper Microflex, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Poté je stanovena citlivost k antibiotikům standardní diluční mikrometodou podle kritérií EUCAST. K protokolované kontrole kvality je používán referenční kmen *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. U identifikovaných VRE je dále dotestována citlivost k linezolidu a vankomycinu pomocí E-testu podle metodiky EUCAST.

### 1.4.2 Genetická detekce

Pro rychlou identifikaci zástupců druhu *Enterococcus* jsou využívány metody molekulární biologie. Jsou založeny především na polymerázové řetězové reakci (PCR), např. broad-range PCR, multiplex PCR či real-time PCR. Dalšími možnostmi může být použití metod fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) či amplifikace 16S a 23S sekvencí ribozomálních genů pro microarray analýzu (Dongyou, 2011).

Pro detekci VRE bývají PCR metody bývají většinou založené na identifikaci jednoho ze čtyř genotypů glykopeptidové rezistence popsanych u enterokoků (*vanA*, *vanB*, *vanC-1* či *vanC-2/3*) u klinicky významných druhů enterokoků (Dutka-Malen *et al.*, 1995).

Přímou identifikaci VRE z klinických materiálů poskytují některé komerční přístroje. Přístroj BD MAX™ System umožňuje přímo z perianálních a/nebo rektálních stěrů (případně i z kolonií) detekovat a provést diferenciaci genů *vanA* a *vanB*. Tento přístroj využívá automatizovanou extrakci DNA, následovanou PCR v reálném čase. DNA z je z daného klinického materiálu detekována s použitím sond s fluorescenčním reportérovým barvivem specifickým pro geny *vanA* a *vanB*. Dalším z přístrojů, které umožňují přímou detekci z klinického materiálu je Eazyplex® VRE od firmy Amplex, který je založen na technologii LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification). Klinický materiál je bez nutnosti izolace podroben izotermní amplifikační reakci s vizualizací v reálném čase měřením fluorescence.

Díky genetickým analýzám, založených na PCR, lze identifikovat faktory virulence, kterými mohou enterokoky disponovat. Mezi často testované patří agregační substanci (*agg/asa1*), cytolysin (*cyl*), želatinázu (*gelE*), enterokokový povrchový protein (*esp*) či hyaluronidáza (*hyl*). První čtyři jmenované jsou častěji k nalezení u *E. faecalis*, zatímco poslední dva jsou více identifikovány u druhu *E. faecium* (Vankercckhoven *et al.*, 2004).

## 1.5 EPIDEMIOLOGIE VRE

Enterokoky jsou komenzály gastrointestinálního traktu (GIT) člověka i zvířat, jejichž schopnost snášet těžké podmínky jim umožnila kolonizovat velmi rozmanitá prostředí. Byla izolována z půdy, povrchových vod i mořské vody, z potravin, fermentovaných potravin a krmiv a také ve spojitosti s rostlinami (García-Solache & Rice, 2019, Ramos *et al.*, 2020).

Vankomycin-rezistentní enterokoky se nečekaně rychle rozšířily a dnes jejich výskyt celosvětově roste. Evropské země a Spojené státy však zaznamenaly rozdíly ve výskytu a epidemiologii VRE. Zatímco v USA v 90. letech 20. století došlo k rychlému výskytu VRE, kterému předcházela výskyt *E. faecium* rezistentního k ampicilinu na počátku 80. let, se následně kolonizace hospitalizovaných pacientů VRE od prvního záchytu VRE velmi rychle zvyšovala. V Evropě byly první klinické izoláty VRE zjištěny až v roce 1986 a jejich prevalence v nemocnicích byla dlouhodobě mnohem nižší a začala se zvyšovat až od roku 2000. První zprávy o VRE v Evropě se týkaly enterokoků, které byly často izolovány od zdravých lidí, hospodářských zvířat, domácích mazlíčků a potravinářských výrobků v maloobchodě, což naznačuje velký komunitní rezervoár, zatímco v USA takový rezervoár v komunitě zřejmě chybí. (Ramos *et al.*, 2020).

Předpokládá se, že výskyt VRE v evropských zemích byl způsoben používáním avoparcinu (glykopeptidové antibiotikum), které byl v 70. letech 20. stol. využíván jako růstový stimulátor hospodářských zvířat. VRE, které se u těchto zvířat vyvinuly, se poté mohly do prostředí dostat kontaminací potravinového řetězce (Ramos *et al.*, 2020). Po zákazu používání antibiotik jako růstových stimulátorů v Evropské unii všeobecně (v roce 1997), byl pozorován zřetelný pokles výskytu VRE ve stolici u zvířat určených k produkci potravin, u samotných potravinových produktů, a také u zdravých lidí (Torres *et al.*, 2018).

### 1.5.1 Výskyt v VRE v humánní populaci

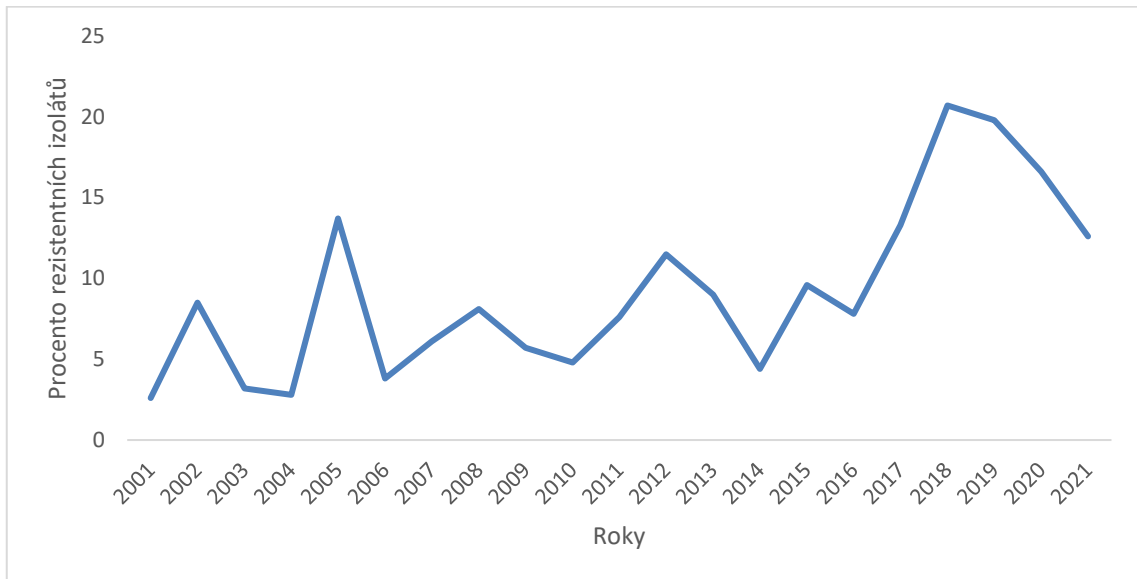
Infekce člověka vankomycin-rezistentními enterokoky představují závažný terapeutický problém (Yadav *et al.*, 2017; Kirkizlar *et al.*, 2020; Prematunge 2016, Hricová *et al.*, 2021), a to zejména u hospitalizovaných pacientů, kde se mohou stát oportunními patogeny. Jedná se hlavně o pacienty s těžkým základním onemocněním, pacienty na JIP, pacienty s oslabenou imunitou či po předchozí terapii antibiotiky (Vágnerová & Kolář, 2003; Ramos *et al.*, 2020).

Dříve většinu všech enterokokových infekcí způsoboval *E. faecalis* (80-90 %), avšak v poslední době se zvyšuje podíl infekcí způsobených *E. faecium*, který převyšuje prevalenci *E. faecalis* (Ramos *et al.*, 2020). Je to zřejmě způsobeno rozšířením izolátů *E. faecium* rezistentních k ampicilinu v nemocnicích, zatímco rezistence k ampicilinu a vankomycinu u *E. faecalis* je stále méně častá (García-Solache & Rice, 2019). S nemocničními (nozokomiálními) infekcemi je spojována subpopulace *E. faecium*, spadající do klonálního komplexu CC-17, charakterizovaná právě vysokou rezistencí k ampicilinu, zvýšeným výskytem genů rezistencí a genů faktorů virulence, které podporují tvorbu biofilmu a kolonizaci (Zhou *et al.*, 2020).

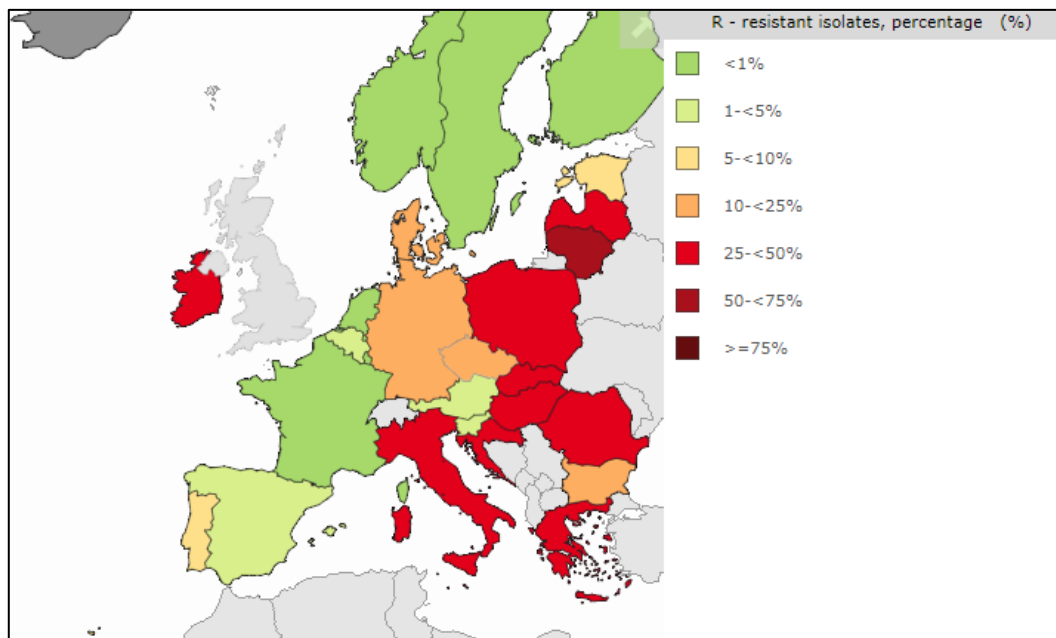
Poprvé byl VRE (typu VanA) zaznamenán v roce 1988 ve Francii a ve Spojeném království (Zhou *et al.*, 2020). V České republice byl první VRE zachycen roku 1997 u pacientů na Hemato-onkologické klinice ve Fakultní nemocnici Olomouc (Vágnerová & Kolář, 2003).

Stoupající tendence výskytu VRE je za poslední roky znatelná v databázi EARS-NET (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network). Tato významná evropská databáze ovšem podává informace o výskytu VRE pouze u invazivních izolátů (tj. z krve a z mozkomíšního moku). Na grafu 1 je vidět prevalence VRE v České republice v průběhu let 2001–2020. Na obrázku 2 je k dispozici přehled o prevalenci VRE v evropských státech v roce 2020. Graf 2 porovnává prevalenci VRE v ČR ve srovnání se státy evropských zemí (EU/EEA) v období 2012-2019 (ECDC).

**Graf 1:** Prevalence VRE (*E. faecium*) u invazivních izolátů v ČR v časovém období 2001 – 2021; dle: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4> (2023 01 17)

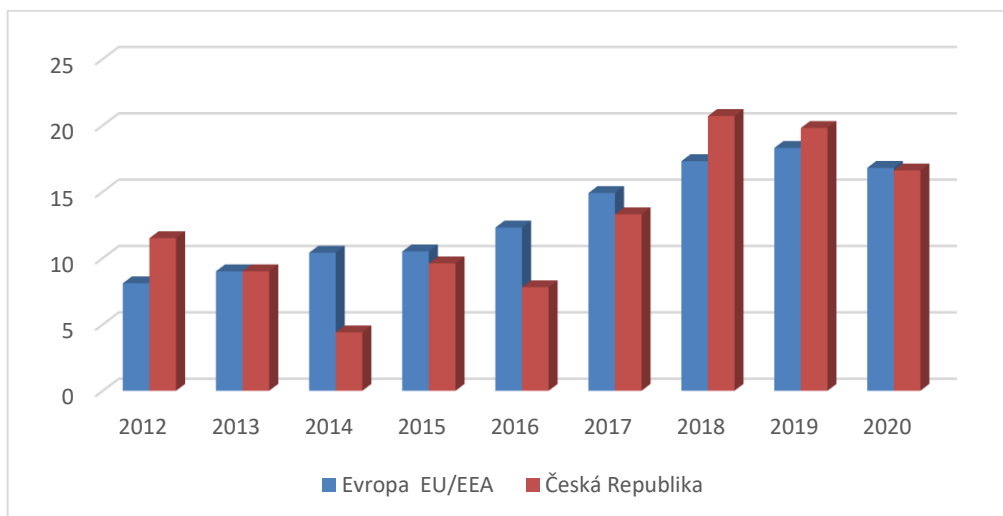


**Obrázek 2:** Prevalence VRE (*E. faecium*) u invazivních izolátů v evropských státech v roce 2021 - <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4> (2023 01 17)





**Graf 2:** Prevalence VRE (*E. faecium*) u invazivních izolátů v evropských zemích (EU/EEA) a v České Republice dle databáze EARS-NET (v procentech)



Vankomycin rezistentní enterokoky se v posledních dvou desetiletích staly významným oportunním patogenem způsobujícím život ohrožující infekce pacientů v nemocnicích. Zařadily se tak společně s MRSA (meticylin-rezistentní *Staphylococcus aureus*), multirezistentními gramnegativními bakteriemi, či *Clostridioides difficile* mezi nejčastější bakterie, způsobující nozokomiální infekce, které se vyskytují přibližně u 4 až 10 % hospitalizovaných pacientů (Zalipour *et al.*, 2019).

VRE často kolonizují nemocniční prostředí. Důvodem může být kombinace schopností enterokoků přežít dlouhou dobu i v nepříznivých podmínkách s možnými cestami přenosu, mezi něž patří ruce pacientů i ošetřujícího personálu. Tyto hlavní rizikové hlavní faktory, jsou podpořeny dlouhodobou hospitalizací pacientů či pobytem na společném pokoji, čímž je umožněna kolonizace touto nozokomiální bakterií (Hricová *et al.*, 2020; Kolář *et al.*, 2006 B, Jovanović *et al.*, 2018). Kolonizace enterokoky rezistentními k vankomycinu se vyskytuje především u na vysoce rizikových odděleních, jako jsou jednotky intenzivní péče (JIP) a hematologická oddělení (Kirkizlar *et al.*, 2020). To potvrzuje i studie Kučové *et al.*, 2021, která zmiňuje, že klinicky významné enterokoky byly v jejich 5leté studii v největší míře izolovány od pacientů s onkologickou diagnózou (22 %). Kolonizaci VRE kmeny u 29 % pacientů na JIP uvádí studie Amberpet *et al.*, 2016. Dodržování prevence kolonizace je cílem zejména na jednotkách intenzivní péče (Orsi & Ciorba, 2013).

Významnými rizikovými faktory pro suspektní infekce způsobenými VRE mohou být: přeložení pacienta na JIP ze standartního oddělení, selhání ledvin, delší pobyt na JIP a užívání cefalosporinů třetí generace, gentamicinu nebo ciprofloxacinu (Moemen *et al.*, 2015).

Výskyt VRE u hospitalizovaných pacientů se liší. Ve studii Haghi *et al.* z roku 2019 byly u pacientů, kteří měli symptomatické infekce močových cest a kteří byli hospitalizováni déle jak 48 hod, detekovány VRE z moči v 21 % (Haghi *et al.*, 2019). Systematický přehled, zahrnující 53 iránských publikací, uvádí prevalenci VRE u 14 % hospitalizovaných pacientů (Moghimbeigi *et al.*, 2018). Znatelný nárůst VRE izolovaných z krve nozokomiálních pacientů je viditelný v Irsku. Prevalence VRE vzrostla z 33 % v roce 2007 na 45 % v roce 2012 (Ryan *et al.*, 2015). V roce 2019 má Irsko dle ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) hodnotu prevalence VRE 38 % (ECDC 2). Ve studii z roku 2021, zabývající se enterokokovými infekcemi ve FNOL (v letech 2015–2019) uvádí Kučová *et al.*, že v případě *E. faecium* byl prokázán výskyt VRE u 24 % izolátů (Kučová *et al.*, 2021).

Invazivním infekcím způsobenými VRE kmeny často předchází gastrointestinální kolonizace, což může činit problémy zejména u onkologických pacientů, pacientů na jednotkách intenzivní péče a příjemců transplantací solidních (zejména břišních) orgánů (Patel, 2003; Vehreschild *et al.*, 2019). Weber *et al.*, 2019 zmiňuje, že pacienti s kolonizací VRE mají až 24x větší pravděpodobnost vzniku infekce krevního řečiště vyvolanou těmito kmeny (Weber *et al.*, 2019). Dle souhrnné analýzy Vehreschild *et al.*, 2019, která z vícero studií stanovila hodnotu kolonizace GIT VRE na 20,9 %, prodělalo infekci krevního řečiště, kde etiologickým agens bylo identifikováno VRE 5,7 % kolonizovaných pacientů oproti 2,4 % pacientům, kteří kolonizováni nebyli. Ještě vyšší hodnotu – 14 % infekcí krevního řečiště způsobenou VRE uvádí konkrétně u kolonizovaných hematoonkologických pacientů kolonizovaných VRE (Vehreschild *et al.*, 2019). Dle souhrnné studie, která čítá 45 zdrojů a posuzuje přes 8000 pacientů s malignitou, se kolonizace VRE v GIT pohybovala okolo 20 % (Alevizakos *et al.*, 2016). Studie Hricová *et al.*, 2020, zjistila prevalenci VRE v GIT u 7 % hemato-onkologických pacientů. Studie Ballo *et al.* z roku 2019 dokonce u onkologicky nemocných uvedla hodnotu prevalence VRE v GIT 74 %, přičemž posuzovala kolonizaci GIT rezistentními bakteriemi u pacientů s akutní myeloidní leukémií (Ballo *et al.*, 2019).

Výskyt VRE jako součásti flory GIT v komunitě je v ČR poměrně nízký. Dokazují to data ze 3 českých studií z let 2004 – 2006, kdy byl prokázán výskyt od 0,4 % - 1,6 % (Kolář *et al.*, 2004; Kolář *et al.*, 2005; Kolář *et al.*, 2006 A). V nepublikované prospektivní studii z roku 2019 byla hodnota prevalence v VRE v komunitě v Olomouckém regionu nulová. Hodnoty VRE v GIT v komunitě v ostatních evropských státech se pohybují ve vyšších hodnotách, od 4,9 % ve Švýcarsku (r. 2001), přes 12 % v Německu (r. 1995) i Francii (r. 2000) až po 28 % v Belgii (r. 1996). Z mimoevropských zemí má velmi vysoké hodnoty Taiwan, a to 24,9% (r. 2013) (Hannaoui *et al.*, 2016).

### 1.5.2 Výskyt VRE u zvířat

Enterokoky jsou přirození obyvatelé střeva nejen gastrointestinálního traktu lidí, ale i mnoha zvířat. Poprvé byly hlášeny případy VRE izolované z jiných než lidských zdrojů v roce 1993 ve Spojeném království, přičemž se jednalo o izoláty *E. faecium* a pocházely od hospodářských zvířat (Bates *et al.*, 1993). VRE byly identifikovány jak u volně žijících zvířat, např. u myšice křovinné, jezevce lesního (Mallon *et al.*, 2002) či havrana polního (Oravcová *et al.*, 2013), tak u domácích zvířat jako jsou psi, kočky, papoušci či koně. Mezi potravinová zvířata, u kterých byly VRE identifikovány můžeme řadit např. drůbež či prasata (Wada *et al.*, 2021). Nejčastěji zjištěným mechanismem rezistence u VRE v animální oblasti byla přítomnost genu *vanA*, a to zejména u druhu *E. faecium*, *vanB* gen se vyskytoval pouze ojediněle (Torres *et al.*, 2018).

Stejně jako v humánním lékařství, jsou i ve veterinární sféře používány antibiotika pro terapii či profylaxi infekčních onemocnění. V animální oblasti mohou enterokoky způsobit infekce u řady druhů zvířat, například mastitidu u krav, amyloidní encefalopatii, artritidu a osteomyelitidu u drůbeže a průjem u psů, koček a prasat (Lawpidet *et al.*, 2021). Antibiotika ale mohou být v některých státech světa podávána i jako stimulatory růstu, které poté pozitivně ovlivňují užitkové vlastnosti zvířat. V Evropské unii (a tím pádem i v České republice) je od 1. ledna 2006 zakázáno podávat antimikrobiální látky v jakékoliv lékové formě pro účely stimulace růstu a produkce (Pokludová *et al.*, 2018). Po tomto zákazu se selekční tlak působící na bakterie sice snížil, nicméně VRE u zvířat perzistují i nadále (Torres *et al.*, 2018). Přesto, že byl avoparcin stažen z trhu před více než 20 lety, je rezistence na vankomycin stále zjišťována u enterokoků izolovaných ze zvířat určených k produkci potravin, ačkoliv již v nízkých až velmi nízkých hladinách (Ramos *et al.*, 2020). Perzistence VRE při absenci zjevného selekčního tlaku je tedy stále pozorována a předpokládá se, že může být důsledkem koselektce prostřednictvím terapeutického používání jiných antimikrobiálních látek, jako jsou makrolidy nebo tetracyklin (Wist *et al.*, 2020). Na stejném plazmidu, kde se nachází genetický základ pro rezistenci k těmto látkám, může být totiž nesena genetická informace pro rezistenci na vankomycin (Aarestrup *et al.*, 2000 A).

Prvním potvrzeným záchytem VRE u zvířete v České republice byl v roce 2000 záchyt u drůbeže. Z celkového počtu 561 testovaných zvířat bylo identifikováno 109 izolátů enterokoků (Kolář *et al.*, 2000).

V další studii Kolář *et al.* v roce 2005 neprokázali molekulárně-genetickou analýzou souvislost mezi zachycenými VRE u animálních vzorků a humánních vzorků, zajištěných ve stejném časovém období. Poukázali se spíše na vysokou variabilitu izolátů VRE bez znaků příbuznosti těchto dvou zdrojů (Kolář *et al.*, 2005).

### 1.5.3 Výskyt VRE v potravinách živočišného původu

Enterokoky obecně byly detekovány v potravinách jako jsou mléčné výrobky (sýry, syrové mléko), fermentované zelenina, maso, ryby či mořské plody. Některé studie

uvádějí, že více než 90 % vzorků potravin živočišného původu může být na jatkách kontaminovány enterokoky (*E. faecalis* a *E. faecium*) (Torres *et al.*, 2018).

Výskyt enterokoků v mléce je tradičně považován za důsledek fekální kontaminace, ale mnoho studií uvádí, že tento výskyt s ní nemusí vždy nutně souviset, a to z důvodu schopnosti rodu *Enterococcus* se adaptovat na různé substráty a podmínky růstu. Je totiž potvrzen výskyt jak v syrových, tak v pasterizovaných mlécích (kravském, ovčím, kozím nebo velbloudím mléce) (Ben Braïek & Smaoui, 2019). Portugalská studie Koluman *et al.* z roku 2009 identifikovala enterokoky u 50 % testovaných potravin rozdílného původu (maso, sýry, jogurty, jídla určená k přímé spotřebě) prodávaných v tržní síti. Nejčastější záchyt enterokoků byl u hovězího masa (88 %), dále pak u kuřecího masa (72 %). Nejvyšší hodnota rezistence (k 12 testovaných antimikrobním látkám) byla identifikována u izolátů ze vzorku smetanového sýra. Důvodem takto vysoké rezistence u toho typu výrobku může být fakt, že je vyráběn ze směsi různých druhů sýrů různého původu (Koluman *et al.*, 2009).

VRE z hospodářských zvířat mohou při nedodržení hygienických standardů snadno kontaminovat potravní řetězec (Torres *et al.*, 2018) a tím představovat potenciální riziko pro lidské zdraví. Souhrnná studie (posuzující 50 publikací zahrnujících roky 1998-2020) uvádí prevalenci VRE v potravinách živočišného původu na celém světě na 11,7 %. Prevalence VRE u hovězího skotu je v této studii stanovena na 6,9 %, u vepřového masa na 7,3 % a u drůbeže na 20,8 % (Lawpidet *et al.*, 2021). Potvrzením vysokých hodnoty VRE u drůbeže je studie Robredo *et al.* z roku 2000, která identifikovala VRE u 25 z 92 vzorků (27,2 %) kuřecího masa ze supermarketů či studie Song *et al.* z roku 2005, uvádějící 60 % záchyt VRE u syrového kuřecího masa (Robredo *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2005).

Stejně jako v humánní populaci patří mezi nejčastěji izolované druhy enterokoků, z potravin jako jsou sýr, ryby, mleté hovězí či vepřové maso, druhy *E. faecalis* a *E. faecium* (Ramos *et al.*, 2020). Většina publikací, týkající se zvířat určených k produkci potravin uvádí *E. faecium* jako hlavní identifikovaný druh, přičemž pokud vykazoval získanou rezistenci k vankomycinu, bylo to ve většině případů s genotypem *vanA* (Torres *et al.*, 2018).

#### **1.5.4 Výskyt VRE v životním prostředí**

Hlavními zdroji antibiotického „znečištění“ životního prostředí (pitná voda, povrchové vody, podzemní vody, odpadní vody, kal, půda atd.) je rozsáhlé používání těchto látek v humánní a veterinární medicíně, kde jsou využívány za účelem profylaxe nebo léčby infekcí (Kümmerer, 2009). Antimikrobiální látky se do životního prostředí mohou dostávat také ve formě lidských splašků či nesprávnou likvidací, například z domácností. Různé chemické látky, včetně antibiotik, by se mohou do životního prostředí dostat také ve formě odpadu z farmaceutického průmyslu (Polianciuc *et al.*, 2020).

Odpadní voda, která je kontaminována antibiotiky a produkty metabolismu antimikrobiálních látek, se v čistírnách odpadních vod upravuje kombinací různých procesů, aby se odstranily chemické či biologické škodliviny a snížil se tak jejich dopad na životní prostředí a lidské zdraví. Nicméně přítomnost antibiotik v metabolizované i nemetabolizované formě v přítomnosti velkého množství různorodých bakteriálních populací (komensálních, patogenních a environmentálních) a vhodných růstových podmínek (teplota, pH, vysoká nutriční koncentrace atd.), vedou k tomu, že čističky odpadních vod mohou představovat ideální místa ke vzniku bakterií rezistentních vůči antibiotikům (Nnadozie & Odume, 2019; Rizzo *et al.*, 2013; Kumar & Pal, 2018). Tato ohniska se tak mohou stát vhodným místem pro horizontální přenos genů zodpovědných za rezistenci mezi bakteriemi a umožní tak jejich následné šíření do prostředí (Karkman *et al.*, 2018). První záchyt VRE v odpadních vodách je zmíněn ve studii Bates *et al.* ve Spojeném království roce 1993 (Bates *et al.*, 1993). Záchyt VRE v odpadních vodách se pohybuje v hodnotách od 3–40 % (Rosenberg Goldstein *et al.*, 2014; Iversen *et al.*, 2002). Záchyt VRE v ČR v odpadních vodách u 11 % vzorků uvádí ve své studii z roku 2021 Hricová *et al.*

Čistírny odpadních vod a nemocniční odpadní vody jsou celosvětově vnímány jako hlavní přispěvatelé genů rezistence vůči antibiotikům a rezistentních bakterií do vodní prostředí (Nnadozie & Odume, 2019). Dle studie Dinh *et al.* z roku 2017 je koncentrace antibiotik v nemocniční odpadní vodě desetkrát vyšší než hodnoty naměřené městské odpadní vodě. Z 23 testovaných antibiotik tato studie zjišťuje 14 z nich na vstupu i výstupu v čističky odpadních vod, a to včetně vankomycinu (Dinh *et al.*, 2017).

Některá antibiotika, jako vankomycin či ceftotaxim, jsou striktně používána pouze v nemocničním sektoru (Dinh *et al.*, 2017). Vyšší koncentrace tohoto antibiotika, které byly v nemocničních odpadních vodách zjištěny nicméně nepřispívá k výraznější selekci VRE (Hricová *et al.*, 2021). Také studie Hassoun-Kheir *et al.* uvádí že, nemocnice k většímu výskytu VRE nepřispívají konzistentně (Hassoun-Kheir *et al.*, 2020).

Mezi druhy bakterií nejběžněji identifikovaných v odpadních vodách jsou řazeny fekální a koliformní bakterie, nejčastěji *Escherichia coli*. Nicméně, k těmto bakteriím byla zjištěna široká škála klinicky významných rezistentních bakterií jako jsou např. MRSA, rezistentní gramnegativní bakterie (zástupci r. *Acinetobacter*, enterobakterií či pseudomonád) nebo také zástupci rodu *Enterococcus* rezistentní na vankomycin (Karkman *et al.*, 2018). Z rezistentních enterokoků jsou nejčastěji identifikovány druhy *E. faecium* (78 %) a *E. faecalis* (22 %) (Rosenberg Goldstein *et al.*, 2014).

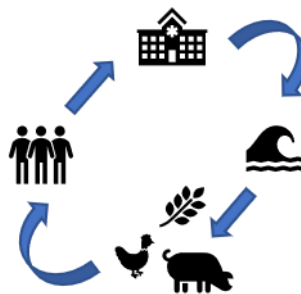
Do povrchových vod (řeky, jezera apod.) se mohou antimikrobní látky uvolňovat z různých zdrojů. Antibiotika, která jsou podávána hospodářským zvířatům, jsou z jejich těl vylučována ve formě fekálií. Těmi může být hnojena půda a při dešti se z ní mohou dostávat do podzemních i povrchových vod (Kümmerer, 2009). Ve formě odtoků ze

zemědělských pozemků, vypouštěním odpadních vod či prosakováním z půdy se antibiotika mohou dostat do vodního prostředí. Také zde se v kombinaci s vyšší hustotou bakterií vodě může vytvářet prostor vhodný pro rozvoj genů rezistence vůči antibiotikům (Nnadozie & Odume, 2019). Záchyty VRE v povrchových vodách jsou nicméně nízké. Studie Iversen *et al.* z roku 2002 uvádí záchyt 1 izolátu z 37 vzorků, studie Hricová *et al.* z roku 2021 eviduje 2 izoláty z 36 vzorků (Iversen *et al.*, 2002; Hricová *et al.*, 2021).

### 1.5.5 „One Health“ koncept

Zdraví lidí, zdraví zvířat a zdraví ekosystémů spolu neoddělitelně souvisí. Iniciativa "One Health" zahrnuje globální strategii na podporu mezioborové spolupráce a komunikace ve všech aspektech zdravotní péče o lidi, zvířata a životní prostředí (Obr.3). Důležitou součástí této koncepce jsou otázky související s infekčními chorobami a odolností bakterií vůči antibiotikům. Iniciativa usiluje o užší spolupráci mezi humánními lékaři, veterináři a odborníky na životní prostředí, aby bylo dosaženo výše uvedených cílů. Iniciativa "One Health" si klade za cíl zlepšit kvalitu života a zdraví lidí a zvířat prostřednictvím integrace humánní medicíny, veterinární medicíny a vědy o životním prostředí. <https://onehealthinitiative.com/>.

**Obrázek 3:** Grafické znázornění "One Health Concept" (autor, 2022)



Kontaminace VRE se z hlediska konceptu "One Health" týká v základu tří oblastí (lidé, zvířata a životní prostředí). Díky své schopnosti množit se v gastrointestinálním traktu hostitele (animální i humánní oblast) jsou VRE vylučovány výkaly hostitele, což vede ke kontaminaci životního prostředí. U zvířecích hostitelů mohou vylučované VRE kontaminovat potraviny živočišného původu. Kromě toho kontaminovaný hnůj může být používán jako hnojivo pro pěstování zeleniny a rostlin. V případě lidského hostitele se může VRE dostat do odpadních vod (zejména z nemocničních odpadních vod) a rozšířit se do vodního prostředí. V konečném důsledku může dojít až ke kontaminaci VRE dalších článků potravního řetězce, například zeleniny. Dalším důležitým zdrojem, který zvyšuje rezistenci vůči antibiotikům v životním prostředí jsou odpadní vody z farmaceutického průmyslu (Lawpidet *et al.*, 2021).

## 2 CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo zmapování výskytu VRE v humánní populaci, u zvířat a v potravinách živočišného původu, v prostředí a detailní charakteristika získaných izolátů. Zejména pak fenotypová rezistence k antimikrobním látkám, průkaz vybraných genů rezistence k antimikrobním látkám a genů virulence. Dále pak identifikace genetické příbuznosti vybraných izolátů.

Konkrétní cíle lze definovat následujícími body:

- 1) Výskyt a charakteristika VRE v humánní populaci:
  - a) V klinickém materiálu hospitalizovaných pacientů ve Fakultní nemocnici Olomouc (FNOL) a Vojenské nemocnici Olomouc (VNOL)
  - b) Výskyt VRE v GIT u hematologických pacientů
  - c) Prospektivní studie prevalence VRE v komunitě a u hospitalizovaných pacientů
  - d) Výskyt a charakteristika VRE u pacientů na Klinice anesteziologie a resuscitace a intenzivní medicíny (KARIM) hospitalizovaných s onemocněním COVID-19
- 2) Výskyt a charakteristika VRE u zvířat a v potravinách živočišného původu
- 3) Výskyt a charakteristika VRE v prostředí povrchových a odpadních vod

### **3 MATERIÁL A METODY**

#### **3.1 ANALÝZA VRE U HUMÁNNÍ POPULACE**

##### **3.1.1 Sběr, izolace a identifikace**

Prvním cílem disertační práce byla analýza VRE v humánní populaci, a to jak u hospitalizovaných pacientů ve FNOL a VNOL, tak v komunitě.

##### **3.1.1.1 VRE u hospitalizovaných pacientů**

V časovém období od 1.1.2018 – 31.12.2020 byly z různých klinických materiálů pacientů (stolice, moče, endosekrety, kanyly, hemokultury, stěry/výtěry aj.), hospitalizovaných ve FNOL a VNOL získávány izoláty rodu *Enterococcus*.

Na kultivaci vzorků byly použity standartní mikrobiologické postupy. Materiály byly vyočkovány na krevní agar a pro zrychlenou identifikaci VRE byly používány i chromogenní půdy Brilliance VRE Agar (Oxoid, Brno, Česká republika). Oba typy půd byly následně aerobně kultivovány při 37 °C po dobu 24 hod.

Na krevním agaru měly enterokoky typickou morfologii v podobě nárůstu drobných modrošedých kolonií, často se zónou viridace. Na chromagaru narostly přímo VRE, a to v denimově modré barvě kolonií – *E. faecium* a světlé modré barvě – *E. faecalis*. Následně byly suspektní kolonie identifikovány do rodu a druhů za pomoci přístroje Microflex LT/SH (Biotyper Microflex, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Německo), který provádí identifikaci za pomoci metody MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time – of – flight mass spectrometry). Citlivost k antibiotikům byla u všech získaných izolátů enterokoků stanovena standartní diluční mikrometodou určením hodnoty MIC (minimální inhibiční koncentrace) podle kritérií EUCAST, a to dle hraničních koncentrací pro citlivé kmeny: penicilin (0,25 mg/l), ampicilin (8 mg/l), tigecyklin (0,25 mg/l), cefalotin (2 mg/l), chloramfenikol (4 mg/l), tetracyklin (2 mg/l), erytromycin (0,5 mg/l), klindamycin (0,5 mg/l), vankomycin (4 mg/l), teikoplanin (2 mg/l), furantoin (64 mg/l), ciprofloxacin (4 mg/l).

Ke stanovení fenotypové rezistence izolátů byly použity tedy diagnostické soupravy a následně v případě rezistence na vankomycin, proběhlo dotestování na linezolid (4 mg/l) a vankomycin pomocí E-testů (BioMérieux, Francie). Od každého pacienta byl do analyzovaného souboru zařazen vždy jen jeden izolát VRE. Pro další analýzy byly získané izoláty uchovávány v hluboko mrazícím boxu při -80 °C za pomoci ITEST kryobanky B (ITEST plus s.r.o., Hradec Králové, Česká republika).

##### **3.1.1.2 VRE u hematoonkologických pacientů**

V časovém období 1.1.2016 – 31.12.2018 byly od pacientů hospitalizovaných na Hemato-onkologické klinice FNOL v rámci zavedeného dlouhodobě probíhajícího „screeningu“ získávány vzorky perianálních stěrů. Tyto materiály byly podrobeny standartní mikrobiologické kultivaci, včetně kultivace na chromogenní půdě Brilliance VRE Agar (Oxoid, Brno, Česká republika). Poté následovala fenotypová identifikace VRE



tak, jak je popsáno v kapitole 3.1.1.1. Jejich výběr a způsob uchování pro následné analýzy pobíhal tak, jak je popsáno v téže kapitole.

### **3.1.1.3 VRE v komunitě a u hospitalizovaných pacientů (prospektivní studie)**

V časovém období 10 týdnů (23.9.2019 – 29.11.2019) byly cíleně zpracovávány veškeré vzorky stolic a perianálních stěrů od pacientů hospitalizovaných FNOL a dále od osob v komunitním prostředí (Mikrochem s.r.o., Olomouc). Vzorky byly cíleně kultivovány na chromogenní půdě Brilliance VRE Agar. V případě nárůstu na chromogenním agaru následovala identifikace bakterií pomocí systému MALDI-TOF MS. V případě určení bakterií z rodu *Enterococcus* byla stanovena citlivost k antibiotikům standartní diluční mikrometodou. Poté následovala fenotypová identifikace VRE tak, jak je popsáno v kapitole 3.1.1.1. Jejich výběr a způsob uchování pro následné analýzy pobíhal tak, jak je popsáno v téže kapitole.

### **3.1.1.4 VRE u pacientů hospitalizovaných s onemocněním COVID-19**

V časovém období od 1.1.2021 – 31.5.2021 byly cíleně zpracovávány biologické vzorky (endosekret, BAL, moč, stolice aj.) od pacientů hospitalizovaných s onemocněním COVID-19 na KARIM (Klinika anesteziologie a resuscitace a intenzivní medicíny) ve FNOL. Po standartní mikrobiologické kultivaci následovala fenotypová identifikace VRE. Výběr a způsob uchování pro následné analýzy byl popsán v kapitole 3.1.1.1.

## **3.2 ANALÝZA VRE U ZVÍŘAT A V POTRAVINÁCH**

Jedním z dalších cílů disertační práce byla analýza výskytu a vlastností VRE u zvířat a u potravin živočišného původu v olomouckém regionu.

### **3.2.1 Sběr, izolace a identifikace**

V období od 1.9.2018 - 31.12.2020 byly na přítomnost VRE testovány různé potraviny živočišného původu. Jednalo se například o masné výrobky (např. uzeniny...) vč. rybích výrobků, mléčné výrobky (např. sýry, jogurty, mléko...), či vaječné výrobky. Dále byl testován klinický materiál zvířat. Jednalo se o stěry pokožky a sliznic (rektální výtěry, kloakální výtěry, výtěry z pochvy, výtěry z ucha, spojivky, nosu), trus, moč, mléko, či seškraby srsti. Získaný materiál byl cíleně kultivován aerobně na chromogenní půdě Brilliance VRE Agar (Oxoid, Brno, Česká republika) 24 hodin při teplotě 37 °C. V případě nárůstu suspektních kolonií následovala druhová identifikace enterokoků metodou MALDI – TOF MS, jejich výběr a způsob uchování pro následné analýzy byl popsán v kapitole 3.1.1.1.

### 3.3 ANALÝZA VRE V PROSTŘEDÍ POVRCHOVÝCH A ODPADNÍCH VOD

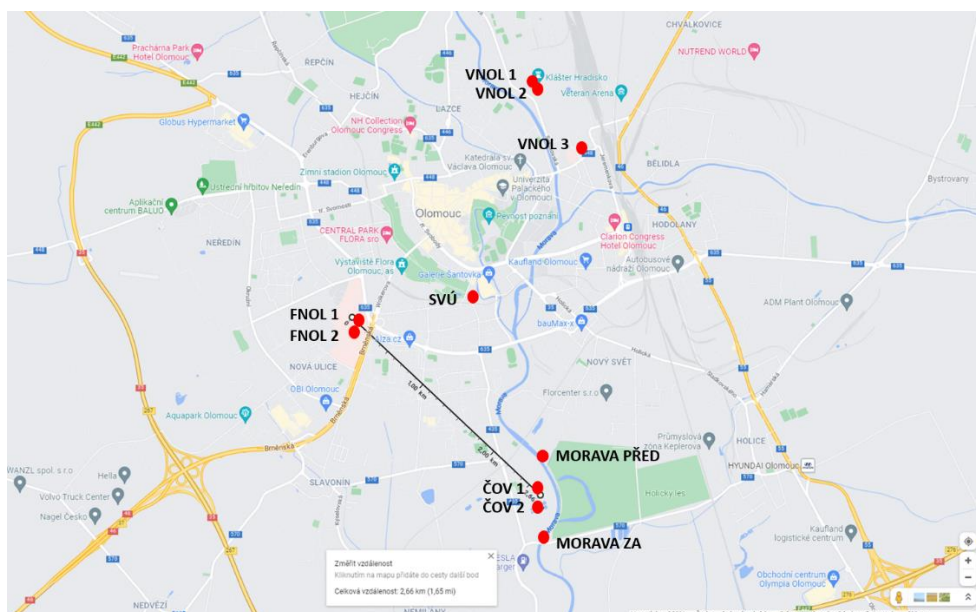
Dalším z cílů disertační práce byla analýza VRE izolovaných z prostředí povrchových a odpadních vod, a to jak z nemocničních, tak komunitních.

#### 3.3.1 Sběr, izolace a identifikace

Vzorky odpadních vod olomouckého regionu (cca 250tis. obyvatel) byly odebírány v časovém období od října 2018 do července 2020 na celkem 8 odběrových místech (obr. 4). Konkrétně se jednalo o 3 vypustné kanály Vojenské nemocnice v Olomouci (VNOL 1,2,3), čističku odpadních vod Fakultní nemocnice Olomouc (FNOL 1 - vstup a FNOL 2 - výstup), Městskou čističku odpadních vod v Olomouci (ČOV 1 - vstup a ČOV 2 - výstup) a o výstup čističky odpadních vod Státního veterinárního ústavu Olomouc (SVÚ). Dále byly odebírány vzorky povrchové vody z dvou míst z řeky Moravy protékající městem Olomouc. Konkrétně před výpustí městské ČOV do řeky Moravy (Morava před) a za výpustí městské ČOV do řeky Moravy (Morava za).

Analýza VRE izolovaných z prostředí povrchových a odpadních vod byla realizována za finanční podpory grantu AZV č. NV18-05-00340 „Epidemiologie vankomycin-rezistentních enterokoků v České republice: One Health concept“.

**Obrázek 4:** Mapa odběrových míst odpadních a povrchových vod v Olomouci



Pro mikrobiologickou analýzu – stanovení přítomnosti VRE, byly použity speciální odběrové tampony (délka 11 cm, šířka 5 cm) ponořené do povrchových a odpadních vod na dobu 24 hodin na všech odběrových místech dle postupu Moore *et al.*, 1952. Následně byly tyto odběrové tampony v laboratoři umístěny na 24 hodin do živného bujónu s 6,5 % NaCl. Druhý den byl bujón inokulován na chromogenní půdy Brilliance VRE agar a následovala kultivace 24 hodin při 37°C.

Druhá identifikace suspektních izolátů vykultivovaných na chromagarových plotnách byla potvrzena pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-TOF MS a citlivost k antibiotikům byla stanovena standardní diluční mikrometodou podle kritérií EUCAST. Takto získané izoláty VRE byly zamraženy do kryozkumavek a uchovávány při - 80 °C pro další analýzu.

### **3.3.2 Odběr vod a kalů pro stanovení reziduí antibiotik**

Ze stejných odběrových míst (odpadní vody, řeka Morava), kde probíhal odběr vzorků pro mikrobiologickou analýzu za účelem izolace VRE, byly odebírány také vzorky vod a kalů k analýze výskytu reziduí vybraných antibiotik (nitrofurantoin, chloramfenikol, teikoplanin, linezolid, ampicilin, klindamycin, tetracyklin, tigecyklin, vankomycin, erytromycin). Vzorky byly odebírány do chemicky čistých lahví, přefiltrovány přes membránový filtr a přepraveny do laboratoře k chemické analýze pomocí hmotnostní spektrometrie. Tyto analýzy byly dále prováděny na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého (PŘF UP) spoluřešiteli grantu AZV č. NV18-05-00340 „Epidemiologie vankomycin-rezistentních enterokoků v České republice: One Health concept“.

Problematika stanovení reziduí sledovaných vybraných antibiotik není primárním cílem předkládané disertační práce, proto je zmíněna a dále komentována v kapitole 4.3.1 jen pro úplnost obsáhlé tematiky VRE.

### 3.4 GENETICKÁ ANALÝZA VRE

Získané izoláty byly charakterizovány pomocí molekulárně biologických metod založených na PCR metodách. Genetické analýzy zahrnovaly detekce jednotlivých *van* genů (*vanA*, *vanB*, *vanC-1* či *vanC-2/3*) a vybraných faktorů virulence (*asa1*, *cyl*, *gelE*, *esp* a *hyl*). Dále pak genů kódujících rezistenci k tetracyklinům (*tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*) a makrolidům (*erm(A)*, *erm(B)*, *mef(A/E)*) a genů kódujících enzymy modifikující aminoglykosidy (*ant(4')-Ia*, *aac(6')-aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*).

DNA pro všechny genetické analýzy v následujících kapitolách 3.4.1–3.4.4 byla vyzolována pomocí izolačního kitu DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Německo). Pro izolaci byly použity kolonie enterokoků vykultivované na krevním agaru z jednodenní kultury (18-24 h, 37 °C).

V následujících podkapitolách je uveden konkrétní popis jednotlivých genetických analýz.

#### 3.4.1 Detekce genů kódujících rezistenci k vankomycinu

Pro detekci jednotlivých *van* genů (*vanA*, *vanB*, *vanC-1* či *vanC-2/3*) byly použity PCR reakce, které probíhaly v přístroji Rotor-Gene (Qiagen, Německo). Použité sady primerů, které vycházely ze studie Dutka-Malen *et al.*, 1995, jsou uvedeny v tabulce 1. PCR reakce probíhaly v objemu 25 $\mu$ l (24 $\mu$ l master mix + 1 $\mu$ l DNA). Složení a koncentrace daných reagentů použitého master mixu uvádí tabulka 2 a příslušné reakční podmínky jsou uvedeny v tabulce 3. Jako pozitivní kontroly byly použity kmeny *Enterococcus faecium* (*vanA*), *Enterococcus faecalis* (*vanB*) a *Enterococcus casseliflavus* (*vanC1*), pocházející ze sbírky Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Jako kontrola kvality byla použita negativní kontrola (tj. voda bez obsahu bakteriální DNA)

**Tabulka 1:** Sekvence oligonukleotidových primerů použitých pro identifikaci jednotlivých *van* genů (Dutka-Malen *et al.*, 1995)

| Cílový gen      | Nukleotidová sekvence (5'→3') | Velikost (bp) |
|-----------------|-------------------------------|---------------|
| <i>vanA</i>     | GGGAAAACGACAATTGC             | 732           |
|                 | GTACAATGCGGCCGTTA             |               |
| <i>vanB</i>     | ATGGGAAGCCGATAGTC             | 635           |
|                 | GATTCGTTCTCGACC               |               |
| <i>vanC-1</i>   | GGTATCAAGGAAACCTC             | 822           |
|                 | CTTCCGCCATCATAGCT             |               |
| <i>vanC2/C3</i> | CTCCTACGATTCTTTG              | 439           |
|                 | CGAGCAAGACCTTTAAG             |               |

**Tabulka 2:** Složení a koncentrace jednotlivých reagensů master mixu PCR pro identifikaci *van* genů

| PCR složky                                    | Množství komponent (μl) | Konečná koncentrace               |
|---|-------------------------|-----------------------------------|
| PCR voda<br>(Top-Bio, ČR)                     | 20,7                    |                                   |
| PCR pufr + MgCl <sub>2</sub><br>(Top-Bio, ČR) | 2,5                     | 1x + c(Mg <sup>2+</sup> ) = 1,5mM |
| dNTPs<br>(Promega, USA)                       | 0,2 (10 mM každý)       | 0,08 mM každý                     |
| Primer forward<br>(East Port, ČR)             | 0,2 (100 μM)            | 0,8 μM                            |
| Primer reverse<br>(East Port, ČR)             | 0,2 (100 μM)            | 0,8 μM                            |
| <i>Taq</i> polymeráza<br>(Top-Bio, ČR)        | 0,2                     | 1 U (0,04 U/ μl)                  |
| Templátová DNA                                | 1                       |                                   |

**Tabulka 3:** Reakční podmínky pro detekci *van* genů

| Kroky PCR reakce     | Počet cyklů | Teplota/čas  |
|----------------------|-------------|--------------|
| Počáteční denaturace | 1           | 95 °C/7 min  |
| Denaturace           | 35          | 95 °C/30 sek |
| Hybridizace primerů  |             | 62 °C/30 sek |
| Extenze              |             | 72 °C/1 min  |
| Konečná extenze      | 1           | 72 °C/7 min  |

Získané amplikony byly separovány v 1,5% (w/v) gelu, který byl připraven do elektroforetické vaničky o objemu 250 ml s vyjímatelným hřebínkem. Složení gelu bylo následující: 1,8 g agarózy (Serva, Německo) rozpuštěné za pomoci mikrovlnné trouby ve 108 ml destilované vody s 12 ml 10x zředěného TBE pufru (Bio-Rad, USA). Po mírném zchladnutí bylo před zatuhnutím gelu přidáno 5μl SybrSafe DNA gel stain (Life technologies, USA). Takto připravený gel umístěný do elektroforetické vany byl přelit TBE separačním pufrem. Získané PCR produkty byly nanášeny do jamek gelu, a to konkrétně po 10μl produktu promíchaného s 2 μl nanášecího pufru. Separace amplikonů probíhala 60 min při 110 V s následnou vizualizací v UV-transluminátoru. Velikost separovaných amplikonů byla posuzována podle DNA markeru s velikostí fragmentů v rozsahu 200-1500 bp (Top-Bio, Česká republika).

### 3.4.2 Detekce genů kódujících vybrané faktory virulence

Pro detekci vybraných faktorů virulence (*asa1*, *cyl*, *gelE*, *esp* a *hyl*) byly použity multiplex PCR reakce, vycházející ze studie Vankerckhoven *et al.*, 2004. Ty probíhaly v přístroji Rotor-Gene (Qiagen, Německo). Použité sady primerů jsou uvedeny v tabulce 4. Multiplex PCR reakce probíhaly v objemu 25  $\mu$ l (23  $\mu$ l mater mix + 2  $\mu$ l DNA). Složení a koncentrace daných reagensů použitého master mixu uvádí tabulka 5 a příslušné reakční podmínky jsou uvedeny v tabulce 6. Jako pozitivní kontroly byly použity kmeny *E. faecium* (*hyl*), *E. faecium* (*esp*, *hyl*), *E. faecium* (*esp*) a *E. faecalis* (*cyl*, *esp*, *asa1*, *gelE*), pocházející ze sbírky Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Jako negativní kontrola kvality byla použita voda bez obsahu bakteriální DNA.

**Tabulka 4:** Sekvence oligonukleotidových primerů použitých pro identifikaci vybraných faktorů virulence (Vankerckhoven *et al.*, 2004)

| Cílový faktor virulence | Nukleotidová sekvence (5'→3') | Velikost (bp) |
|-------------------------|-------------------------------|---------------|
| <i>asa1</i>             | GCACGCTATTACGAACTATGA         | 375           |
|                         | TAAGAAAGAACATCACCACGA         |               |
| <i>gelE</i>             | TATGACAATGCTTTTTGGGAT         | 213           |
|                         | AGATGCACCCGAAATAATATA         |               |
| <i>cylA</i>             | ACTCGGGGATTGATAGGC            | 688           |
|                         | GCTGCTAAAGCTGCGCTT            |               |
| <i>esp</i>              | AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG       | 510           |
|                         | AATTGATTCTTTAGCATCTGG         |               |
| <i>hyl</i>              | ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG         | 276           |
|                         | GACTGACGTCCAAGTTTCCAA         |               |

**Tabulka 5:** Složení a koncentrace jednotlivých reagensů master mixu multiplex PCR pro identifikaci vybraných faktorů virulence

| PCR složky                   | Množství komponent (μl)  | Konečné koncentrace  |
|------------------------------|--|--|
| PCR voda                     | 16   |  |
| PCR pufr + MgCl <sub>2</sub> | 2,5  | 1x + c(Mg <sup>2+</sup> ) = 1,5 mM   |
| dNTPs                        | 0,5 (10 mM každý)  | 0,2 mM každý   |
| Primer forward               | 0,25 ( <i>asa1</i> ) + 0,25 ( <i>gelE</i> ) +<br>0,25 ( <i>hyl</i> ) + 0,5 ( <i>cyIA</i> ) +<br>0,5 ( <i>esp</i> ) | 1 μM ( <i>asa1</i> , <i>gelE</i> , <i>hyl</i> )<br>2 μM ( <i>cyIA</i> , <i>esp</i> ) |
| Primer reverse               | 0,25 ( <i>asa1</i> ) + 0,25 ( <i>gelE</i> ) +<br>0,25 ( <i>hyl</i> ) + 0,5 ( <i>cyIA</i> ) +<br>0,5( <i>esp</i> )  | 1 μM ( <i>asa1</i> , <i>gelE</i> , <i>hyl</i> )<br>2 μM ( <i>cyIA</i> , <i>esp</i> ) |
| <i>Taq</i> polymeráza        | 0,5  | 2,5 U (0,1 U/μ)  |
| DNA                          | 2  |  |

**Tabulka 6:** Reakční podmínky pro detekci vybraných faktorů virulence

| Kroky PCR reakce    | Cykly – počet | Teplota/čas  |
|---------------------|---------------|--------------|
| Počátek denaturace  | 1             | 95 °C/15 min |
| Denaturace          | 30            | 95 °C/1 min  |
| Hybridizace primerů |               | 56 °C/1 min  |
| Extenze             |               | 72 °C/1 min  |
| Konečná extenze     | 1             | 72 °C/10 min |

Získané amplikony byly separovány v 1,5% (w/v) agarózovém gelu, jehož postup přípravy je uveden v kapitole 3.4.1.

### 3.4.3 Detekce genů kódujících rezistenci k tetracyklinu a makrolidům

Pro detekci jednotlivých genů kódujících rezistenci k tetracyklinům (*tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*) a makrolidům (*erm(A)*, *erm(B)*, *mef(A/E)*) byly použity multiplex PCR reakce, vycházející ze studie Malhotra-Kumar *et al.*, 2005. Použité sady primerů pro jejich detekci jsou uvedeny v tabulce 7. Multiplex PCR probíhaly v objemu 50 μl (45 μl master mix + 5 μl DNA). Složení a koncentrace daných reagensů použitého master mixu uvádí tabulka 8 a příslušné reakční podmínky jsou uvedeny v tabulce 9. Geny *tet(S)* a *tet(X)* byly zjišťovány za použití jednotlivých PCR reakcí, vycházejících ze studií Weigel *et al.*, 2007 a Ng *et al.*, 2001. Použité sady primerů pro jejich detekci jsou uvedeny

v tabulce 7. PCR reakce pro detekci genu *tet(S)* probíhaly v objemu 50 µl (45 µl master mix + 5 µl DNA) a pro detekci genu *tet(X)* v objemu 26 µl (24 µl master mix + 2 µl DNA). Složení a koncentrace daných reagentů použitých master mixů uvádí tabulky 10 (*tet(S)*) a 12 (*tet(X)*) a příslušné reakční podmínky jsou uvedeny v tabulce 11 (*tet(S)*) a 13 (*tet(X)*). Veškeré reakce pro detekci genů kódujících rezistenci k tetracyklinům a makrolidům probíhaly v přístroji Rotor-Gene (Qiagen, Německo). Jako pozitivní kontroly byly použity kmeny, pocházející ze sbírky Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Jako negativní kontrola kvality byla použita voda bez obsahu bakteriální DNA.

**Tabulka 7:** Sekvence oligonukleotidových primerů k detekci genů kódujících rezistenci k tetracyklinům a makrolidům (Malhotra-Kumar *et al.*, 2005; Weigel *et al.*, 2007; Ng *et al.*, 2001)

| Cílový gen      | Nukleotidová sekvence (5'→3') | Velikost (bp) | Publikace                           |
|-----------------|-------------------------------|---------------|-------------------------------------|
| <i>tet(K)</i>   | GATCAATTGTAGCTTTAGGTGAAGG     | 155           | Malhotra-Kumar <i>et al.</i> , 2005 |
|                 | TTTTGTTGATTTACCAGGTACCATT     |               |                                     |
| <i>tet(L)</i>   | TGGTGAATGATAGCCCATT           | 229           |                                     |
|                 | CAGGAATGACAGCACGCTAA          |               |                                     |
| <i>tet(M)</i>   | GTGGACAAAGGTACAACGAG          | 406           |                                     |
|                 | CGGTAAGTTCGTACACAC            |               |                                     |
| <i>tet(O)</i>   | AACTTAGGCATTCTGGCTCAC         | 515           |                                     |
|                 | TCCCACTGTTCCATATCGTCA         |               |                                     |
| <i>erm(A)</i>   | CCCGAAAAATACGCAAAATTTTCAT     | 590           |                                     |
|                 | CCCTGTTTACCATTATAAACG         |               |                                     |
| <i>erm(B)</i>   | TGGTATTCCAAATGCGTAATG         | 745           |                                     |
|                 | CTGTGGTATGGCGGGTAAGT          |               |                                     |
| <i>mef(A/E)</i> | CAATATGGGCAGGGCAAG            | 317           |                                     |
|                 | AAGCTGTTCCAATGCTACGG          |               |                                     |
| <i>tet(S)</i>   | GATGGTCAACGGCTTGTC            | 570           | Weigel <i>et al.</i> , 2007         |
|                 | TGCCACTACCCAAAGGAA            |               |                                     |
| <i>tet(X)</i>   | CAATAATTGGTGGTGGACCC          | 468           | Ng <i>et al.</i> , 2001             |
|                 | TTCTTACCTTGGACATCCCG          |               |                                     |



**Tabulka 8:** Složení a koncentrace jednotlivých reagensů master mixu multiplex PCR pro identifikaci genů kódujících rezistenci k tetracyklinům (*tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*) a makrolidům (*erm(A)*, *erm(B)*, *mef(A/E)*)

| PCR složky                   | Množství komponent (μl)   | Konečné koncentrace  |
|------------------------------|---|--|
| PCR voda                     | 29,4  |  |
| PCR pufr + MgCl <sub>2</sub> | 5 bez MgCl <sub>2</sub> + 7 (MgCl <sub>2</sub> 25 mM)   | 1x + c(Mg <sup>2+</sup> ) = 3,5 mM   |
| dNTPs                        | 0,6 (10 mM každý)   | 0,12 mM každý  |
| Primer forward               | 0,2 <i>tet(M)</i> + 0,25 <i>tet(O)</i> + 0,2 <i>tet(L)</i> + 0,05 <i>tet(K)</i> + 0,25 <i>erm(A)</i> + 0,25 <i>erm(B)</i> + 0,1 <i>mef(A/E)</i> | 0,4 μM <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i><br>0,5 μM <i>tet(O)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(B)</i><br>0,1 μM <i>tet(K)</i><br>0,2 μM <i>mef(A/E)</i> |
| Primer reverse               | 0,2 <i>tet(M)</i> + 0,25 <i>tet(O)</i> + 0,2 <i>tet(L)</i> + 0,05 <i>tet(K)</i> + 0,25 <i>erm(A)</i> + 0,25 <i>erm(B)</i> + 0,1 <i>mef(A/E)</i> | 0,4 μM <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i><br>0,5 μM <i>tet(O)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(B)</i><br>0,1 μM <i>tet(K)</i><br>0,2 μM <i>mef(A/E)</i> |
| <i>Taq</i> polymeráza        | 0,4   | 2 U (0,08 U/μ)   |
| DNA                          | 5   |  |

**Tabulka 9:** Reakční podmínky pro detekci genů kódujících rezistenci k tetracyklinům (*tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*) a makrolidům (*erm(A)*, *erm(B)*, *mef(A/E)*)

| Kroky PCR reakce    | Cykly – počet | Teplota/čas |
|---------------------|---------------|-------------|
| Počátek denaturace  | 1             | 93 °C/3 min |
| Denaturace          | 30            | 93 °C/1 min |
| Hybridizace primerů |               | 62 °C/1 min |
| Extenze             |               | 65 °C/4 min |
| Konečná extenze     | 1             | 65 °C/3 min |

**Tabulka 10:** Složení a koncentrace jednotlivých reagentů master mixu PCR pro identifikaci genu *tet(S)* kódujícího rezistenci k tetracyklinům

| PCR složky                   | Množství komponent (μl) | Konečná koncentrace               |
|------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| PCR voda                     | 39,2                    |                                   |
| PCR pufr + MgCl <sub>2</sub> | 5                       | 1x + c(Mg <sup>2+</sup> ) = 1,5mM |
| dNTPs                        | 0,2 (10 mM každý)       | 0,04 mM každý                     |
| Primer forward               | 0,2 (100 μM)            | 0,4 μM                            |
| Primer reverse               | 0,2 (100 μM)            | 0,4 μM                            |
| <i>Taq</i> polymeráza        | 0,2                     | 1 U (0,02 U/ μl)                  |
| DNA                          | 5                       |                                   |

**Tabulka 11:** Reakční podmínky pro detekci genu *tet(S)* kódujícího rezistenci k tetracyklinům

| Kroky PCR reakce    | Cykly – počet | Teplota/čas |
|---------------------|---------------|-------------|
| Počátek denaturace  | 1             | 95 °C/5 min |
| Denaturace          | 35            | 95 °C/30 s  |
| Hybridizace primerů |               | 50 °C/20 s  |
| Extenze             |               | 72 °C/30 s  |
| Konečná extenze     | 1             | 72 °C/7 min |

**Tabulka 12:** Složení a koncentrace jednotlivých reagentů master mixu PCR pro identifikaci genu *tet(X)* kódujícího rezistenci k tetracyklinům

| PCR složky                   | Množství komponent (μl)            | Konečná koncentrace              |
|------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| PCR voda                     | 16,7                               |                                  |
| PCR pufr + MgCl <sub>2</sub> | 2,5 + 4 (MgCl <sub>2</sub> -25 mM) | 1x + c(Mg <sup>2+</sup> ) = 4 mM |
| dNTPs                        | 0,1 (10 mM každý)                  | 0,04 mM každý                    |
| Primer forward               | 0,3 (100 μM)                       | 1,2 μM                           |
| Primer reverse               | 0,3 (100 μM)                       | 1,2 μM                           |
| <i>Taq</i> polymeráza        | 0,1                                | 0,5 U (0,02 U/ μl)               |
| DNA                          | 2                                  |                                  |

**Tabulka 13:** Reakční podmínky pro detekci genu *tet(X)* kódujícího rezistenci k tetracyklinům

| Kroky PCR reakce    | Cykly – počet | Teplota/čas   |
|---------------------|---------------|---------------|
| Počátek denaturace  | 1             | 94 °C/5 min   |
| Denaturace          | 35            | 94 °C/1 min   |
| Hybridizace primerů |               | 55 °C/1 min   |
| Extenze             |               | 72 °C/1,5 min |
| Konečná extenze     | 1             | 72 °C/10 min  |

Získané amplikony byly separovány v 1,5% (w/v) agarózovém gelu, jehož postup přípravy je uveden v kapitole 3.4.1.

#### 3.4.4 Detekce genů kódujících enzymy modifikující aminoglykosidy

Pro detekci genů kódujících enzymy modifikující aminoglykosidy (*ant(4')-Ia*, *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia*, *aph(3')-IIIa*) byly použity multiplex PCR reakce, vycházející ze studie (Vakulenko *et al.*, 2003). Tyto reakce probíhaly v přístroji Rotor-Gene (Qiagen, Německo). Použité sady primerů pro jejich detekci jsou uvedeny v tabulce 14. Složení a koncentrace daných reagentů použitého master mixu uvádí tabulka 15 a příslušné reakční podmínky jsou uvedeny v tabulce 16. Jako pozitivní kontroly byly použity kmeny, pocházející ze sbírky Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

**Tabulka 14:** Sekvence oligonukleotidových primerů použitých pro identifikaci genů kódujících enzymy modifikující aminoglykosidy (Vakulenko *et al.*, 2003)

| Cílový gen                   | Nukleotidová sekvence (5'→3') | Velikost (bp) |
|------------------------------|-------------------------------|---------------|
| <i>ant(4')-Ia</i>            | CAAACGCTAAATCGGTAGAAGCC       | 294           |
|                              | GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT    |               |
| <i>aac(6')-Ie-aph(2')-Ia</i> | CAGAGCCTTGGGAAGATGAAG         | 348           |
|                              | CCTCGTGTAATTCATGTTCTGGC       |               |
| <i>aph(3')-IIIa</i>          | GGCTAAAATGAGAATATCACCGG       | 523           |
|                              | CTTTAAAAATCATACAGCTCGCG       |               |

**Tabulka 15:** Složení a koncentrace jednotlivých reagensů master mixu PCR pro identifikaci genů kódujících enzymy modifikující aminoglykosidy

| PCR složky                   | Množství komponent (μl)   | Konečná koncentrace               |
|------------------------------|---|-----------------------------------|
| PCR voda                     | 36,2  |                                   |
| PCR pufr + MgCl <sub>2</sub> | 5   | 1x + c(Mg <sup>2+</sup> ) = 1,5mM |
| dNTPs                        | 0,5 (10 mM každý)   | 0,04 mM každý                     |
| Primer forward               | 1 ( <i>aac(6')-Ie-aph(2')-Ia</i> ) (100 μM)<br>+ 0,2 ( <i>aph(3')-IIIa</i> ) (100 μM)<br>+ 0,2 ( <i>ant(4')-Ia</i> ) (100 μM) | 2 μM + 0,4 μM + 0,4 μM            |
| Primer reverse               | 1 ( <i>aac(6')-Ie-aph(2')-Ia</i> ) (100 μM)<br>+ 0,2 ( <i>aph(3')-IIIa</i> ) (100 μM)<br>+ 0,2 ( <i>ant(4')-Ia</i> ) (100 μM) | 2 μM + 0,4 μM + 0,4 μM            |
| <i>Taq</i> polymeráza        | 0,5   | 2,5 U (0,05 U/μl)                 |
| DNA                          | 5 μl  |                                   |

**Tabulka 16:** Reakční podmínky pro detekci genů kódujících enzymy modifikující aminoglykosidy

| Kroky PCR reakce    | Cykly – počet | Teplota/čas |
|---------------------|---------------|-------------|
| Počátek denaturace  | 1             | 94 °C/5 min |
| Denaturace          | 35            | 94 °C/40 s  |
| Hybridizace primerů |               | 55 °C/40 s  |
| Extenze             |               | 72 °C/40 s  |
| Konečná extenze     | 1             | 72 °C/7 min |

Získané amplikony byly separovány v 1,5% (w/v) agarózovém gelu, jehož postup přípravy je uveden v kapitole 3.4.1.

Pro detekci genu *aac(6')-aph(2'')* bylo provedeno testování i pomocí druhé sady primerů (Vakulenko *et al.*, 2003), jejíž sekvence jsou uvedeny v tabulce 17. Složení a koncentrace daných reagensů použitého master mixu uvádí tabulka 18. Příslušné reakční podmínky byly stejné jako multiplex PCR pro detekci předchozích genů kódujících enzymy modifikující aminoglykosidy a jsou tedy uvedeny v tabulce 16.

**Tabulka 17:** Sekvence oligonukleotidových primerů použitých pro identifikaci genu *aac(6′)-Ie-aph(2′)-Ia* kódujícího enzym modifikující aminoglykosidy (Vakulenko *et al.*, 2003)

| Cílový gen                   | Nukleotidová sekvence (5'→3') | Velikost (bp) |
|------------------------------|-------------------------------|---------------|
| <i>aac(6′)-Ie-aph(2′)-Ia</i> | CAGGAATTTATCGAAAATGGTAGAAAAG  | 369           |
|                              | CACAATCGACTAAAGAGTACCAATC     |               |

**Tabulka 18:** Složení a koncentrace jednotlivých reagensů master mixu PCR pro identifikaci genu *aac(6′)-aph(2′)* kódujícího enzym modifikující aminoglykosidy

| PCR složky                   | Množství komponent (μl)                          | Konečná koncentrace               |
|------------------------------|--|-----------------------------------|
| PCR voda                     | 19,1   |                                   |
| PCR pufr + MgCl <sub>2</sub> | 2,5  | 1x + c(Mg <sup>2+</sup> ) = 1,5mM |
| dNTPs                        | 0,2 (10 mM každý)                                | 0,08 mM každý                     |
| Primer forward               | 0,5 ( <i>aac(6′)-Ie-aph(2′)-Ia</i> )<br>(100 μM) | 2 μM                              |
| Primer reverse               | 0,5 ( <i>aac(6′)-Ie-aph(2′)-Ia</i> )<br>(100 μM) | 2 μM                              |
| <i>Taq</i> polymeráza        | 0,2  | 1 U (0,04 U/μl)                   |
| DNA                          | 2 μl   |                                   |

Získané amplikony byly separovány v 1,5% (w/v) agarózovém gelu, jehož postup přípravy je uveden v kapitole 3.4.1.

### 3.5 EPIDEMIOLOGICKÁ ANALÝZA VRE

U vybraných skupin izolátů byla provedena typizace za pomoci pulsní gelové elektroforézy (PFGE), která umožnila detekovat genetickou příbuznost daných izolátů a tím i sledovat jejich epidemiologii.

#### 3.5.1 Izolace DNA pro restrikční analýzu

Do 20 ml Mueller-Hintonova tekutého bujónu bylo zaočkováno několik kolonií testovaného enterokoka a proběhla inkubace za mírného třepání při 37 °C do druhého dne. Bujón s pomnoženými bakteriemi byl zcentrifugován při 4000 otáčkách při 4 °C po dobu 10 min. Vzniklý pelet byl resuspendován 5 ml promývacího roztoku (10 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 M NaCl; pH 7,5). Promytí se opakovalo 3x. Následně byly bakterie stejným roztokem naředěny na optickou denzitu 0,5-0,6 (Densilameter II, Brno, ČR) na výsledný objem 10 ml. Po centrifugaci byly bakterie

resuspendovány ve 100  $\mu$ l promývacího roztoku, ke kterému bylo přidáno 7  $\mu$ l lyzostafinu (Sigma-Aldrich, Německo). Poté byly smíchány se 100  $\mu$ l 2% „low melting point agarosy“ (Bio-Rad, USA) vytemperované na 65 °C. Takto připravená suspenze byla přemístěna do tvořítka na bločky. Ty byly po ztuhnutí umístěny do lyzačního roztoku (6 mM Tris/HCl, 1 M NaCl, 100 mM EDTA 0,5 % BRIJ, 0,2 % Na-deoxycholát, 0,5 % laurylsarkosin; pH 7,6) s lysozymem (0,5 mg/ml) a inkubovány při 37 °C přes noc. Lyzační roztok byl poté vyměněn za deproteinizační roztok (25 mM EDTA, 20 mM EGTA, 1 % laurylsarkosin; pH 9,0) s 500  $\mu$ g proteinázy K a bločky byly inkubovány při 55 °C po dobu 6 hodin. Bločky byly poté uchovávány v TE pufru (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,8) při 4 °C.

### 3.5.2 Restrikce DNA

Z každého bločku, který obsahoval vyizolovanou celogenomovou DNA dle postupu v kapitole 3.5.1, byl uříznut pomocí skalpelu proužek o tloušťce cca 1-2 mm. Ten byl umístěn do restrikčního roztoku (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol, 50 mM NaCl, 0,01 % BSA) s 20 U restrikčního enzymy *Sma*I (Takara, Biotechnology, Japonsko) a byl inkubován při 37 °C přes noc.

### 3.5.3 Separace produktů pomocí PFGE

Po restrikci byly bločky přesunuty do jamek 1,2% agarózového gelu, který byl připraven z 1,2 g „Pulsed Field Certified“ agarózy (Bio-Rad, USA) rozpuštěné za tepla v 95 ml destilované vody s 5ml 10xTBE pufru (Bio-Rad, USA). Fragmenty DNA vzniklé restrikcí byly rozseparovány pulsní gelovou elektroforézou v přístroji CHEF-DRII Systém (Bio-Rad, USA). Analýza probíhala za následujících podmínek: teplota 14 °C, pulsní časy 6-35 sek, napětí 6 V/cm, celkový čas 24hod. Gel byl poté inkubován po dobu 90 min ve vodní lázni s ethidium bromidem (0,75  $\mu$ g/ml). Vizualizace proběhla v transluminátoru pod UV světlem (Transluminator Discovery<sup>TM</sup> (UltraLum, USA)).

### 3.5.4 Vyhodnocení genetické příbuznosti

Získané restrikční profily byly hodnoceny použitím počítačového softwaru GelCompare II, version 2.0. (Applied Maths, Kotrijk, Belgie). Koeficient podobnosti makrorestrikčních fragmentů byl stanovován použitím Diceho algoritmu (na základě Diceho koeficientu podobnosti makrorestrikčních profilů stanoveném na 1,5 %). Analýza jednotlivých klastrů byla vyhodnocena využitím UPGMA algoritmu (metoda nevážených skupin párů s aritmetickým průměrem). Konečné výsledky byly interpretovány podle kritérií popsaných v práci Tenover *et al.*, 1995.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÁ ANALÝZA VRE U HUMÁNNÍ POPULACE

#### 4.1.1 VRE u hospitalizovaných pacientů

Zachycené izoláty VRE z různých klinických materiálů od hospitalizovaných pacientů ve FNOL a VNOL z let 2018-2020 byly podrobeny genetickým analýzám, jejichž výsledky budou popsány v této kapitole. Výčet enterokoků a následné počty VRE uvádí tabulka č.19.

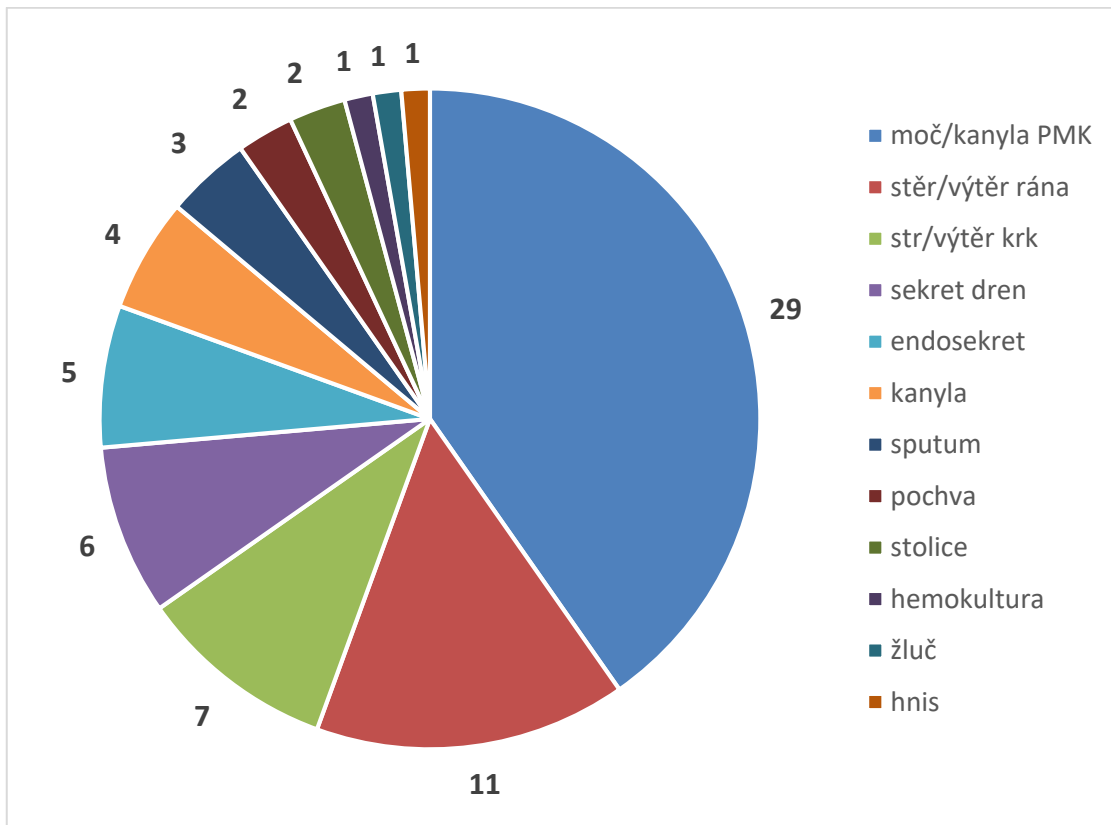
Výsledky této kapitoly jsou cíleně rozděleny na dvě části. První skupina výsledků ukazuje záchyt VRE z různých klinických materiálů od pacientů ze všech klinik a oddělení ve FNOL a VNOL, kromě perianálních stěrů pacientů na Hemato-onkologické klinice (HOK) ve FNOL. Ty tvoří druhou skupinu výsledků. Na HOK ve FNOL totiž dlouhodobě probíhá „screening“ u hospitalizovaných pacientů pro detekci VRE v jejich GIT v rámci zjištění jeho potenciálního nosičství.

**Tabulka 19:** Počty zachycených izolátů VRE ve FNOL a VNOL za období 2018-2020

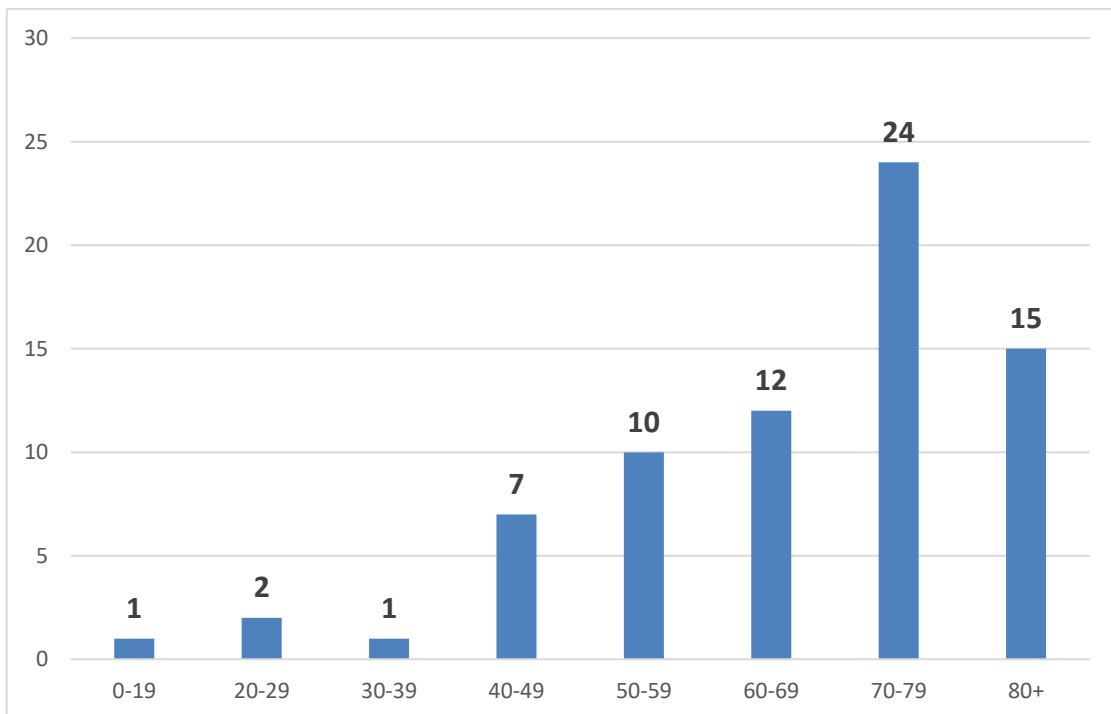
| Období              | Celkem zpracovaného klinického materiálu | Zachycených <i>Enterococcus sp.</i> | Z toho VRE | Z nichž zachyceno v rámci „screeningu“ na HOK |
|---------------------|--|-------------------------------------|------------|---|
| 1.1.2018-31.12.2018 | 70007                                    | 1811                                | 66         | 43  |
| 1.1.2019-31.12.2019 | 71834                                    | 1813                                | 44         | 23  |
| 1.1.2020-31.12.2020 | 65314                                    | 2159                                | 40         | 12  |
| Celkem:             |  |                                     | <b>150</b> | <b>78 (52 %)</b>                              |

Za tříleté období bylo získáno celkem 150 izolátů VRE. Ve všech případech se jednalo o druh *Enterococcus faecium*. Z tohoto souboru 72 (48 %) pocházelo z různých klinických materiálů od pacientů mimo „screening“ na HOK. Vzorky moče a stěry z ran představovaly nejčastější materiál, ve kterém byly tyto VRE zachyceny (Graf 3). Nejpočetnější věková skupina, z které izoláty VRE pocházely, byla 70-79 let (Graf 4), přičemž 39 izolátů pocházelo od mužů a 32 izolátů od žen. Nejčastěji pocházely tyto izoláty z Kliniky anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny (16) a interních oddělení (13) (Graf 5).

**Graf 3:** Záchyt izolátů VRE v klinickém materiálu za 2018-2020 (v počtech)

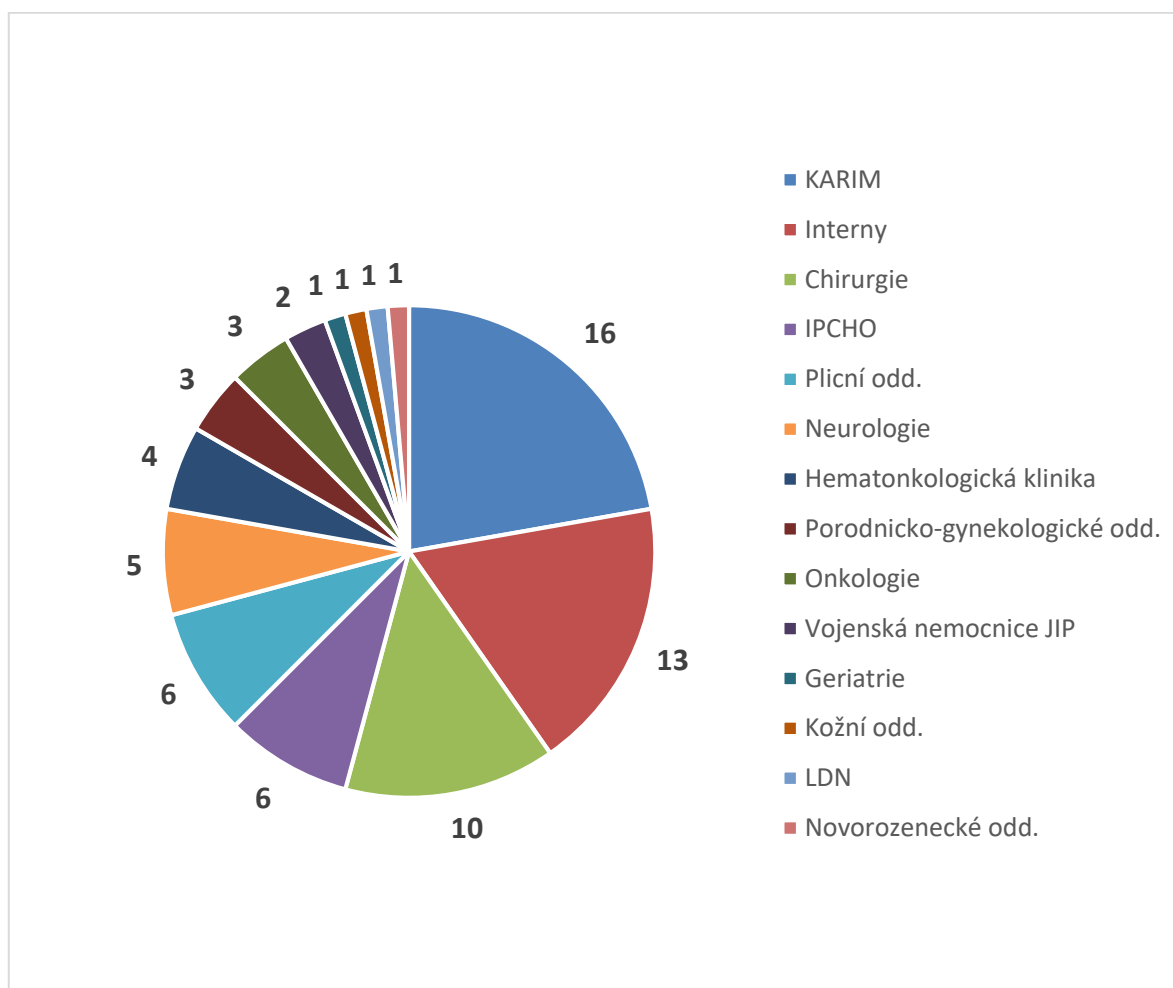


**Graf 4:** Záchyt izolátů VRE podle věkových kategorií za 2018-2020 (v počtech)





**Graf 5:** Záchyt izolátů VRE dle oddělení a klinik ve FNOL a VNOL za 2018-2020 (v počtech)



Vysvětlivky: KARIM – Klinika anesteziologie a resuscitace, IPCHO – Intenzivní péče chirurgických oborů, LDN – Léčebna dlouhodobě nemocných

Výsledky stanovení citlivosti získaných izolátů VRE k testovaným antibiotikům jsou uvedeny v tabulce 20. Byla stanovena 100 % rezistence k penicilinu, ampicilinu, erytromycinu i klindamycinu. Vysoká citlivost byla prokázána v případě tigecyclinu (96 %) a linezolidu (100 %).

**Tabulka 20:** Citlivost VRE k vybraným antibiotikům (v procentech) u klinických vzorků pacientů FNOL a VNOL

| Rok/ATB          | PNC      | AMP      | TIG       | CMP       | TET       | ERY      | CLI      | VAN      | TEI      | FUR       | LNZ        |
|------------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|-----------|------------|
| 2018             | 0        | 0        | 87        | 78        | 30        | 0        | 0        | 0        | 4        | 39        | 100        |
| 2019             | 0        | 0        | 100       | 100       | 33        | 0        | 0        | 0        | 5        | 76        | 100        |
| 2020             | 0        | 0        | 100       | 96        | 54        | 0        | 0        | 0        | 0        | 71        | 100        |
| <b>2018-2020</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>96</b> | <b>91</b> | <b>39</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>3</b> | <b>62</b> | <b>100</b> |

Legenda: PNC-penicilin, AMP-ampicilin, TIG-tigecyclin, CMP-chloramfenikol, TET-tetracyklin, ERY-erytromycin, CLI-klindamycin, VAN-vankomycin, TEI-teikoplanin, FUR-nitrofurantoin, LNZ-linezolid.

Z celkem 72 pacientů, u kterých byl VRE zachycen v různých biologických materiálech, byla nasazena léčba na infekcí jím způsobenou u 27 jedinců. Nejčastější byl uroinfekt, a to v 11 případech. Následován léčbou infekce způsobenou VRE v ráně (6), v sekretu-drenu (5), v endosekretu (3), v hemokultuře (1) a kanyle (1). Častěji byl lékem volby tigecyklin, a to ve 20 případech. U 7 infekcí pak byl zvolen k léčbě linezolid.

U všech 72 získaných izolátů VRE (*Enterococcus faecium*) byl identifikován gen *vanA*. Geny *vanB*, *vanC-1* či *vanC-2/3* detekovány nebyly. Ze sledovaných genů kódujících faktory virulence byly u těchto izolátů identifikovány dva z pěti genů, a to *esp* a *hyl*. Nejčastěji samotně gen *esp* (30 izolátů), ten v kombinaci s *hyl* (17 izolátů) a *hyl* samostatně pak v 7 případech. Zbylé tři testované faktory virulence, tedy agregační substance (*agg/asa1*), cytolysin (*cyl*) ani želatináza (*gelE*) nebyly detekovány u žádného izolátů. Bez identifikovaného faktoru virulence bylo 18 izolátů.

Při testování genů kódujících rezistenci k tetracyklinům byly zachyceny 3 ze 6 zjišťovaných genů, a to u 47 izolátů, konkrétně geny *tetM*, *tetL* a *tetS*. Gen *tetM* byl zachycen samostatně u 17 izolátů, gen *tetL* samostatně u 1 izolátu. Kombinace genů *tetM* a *tetL* u 17 izolátů a kombinace tří genů *tetM*, *tetL* a *tetS* u 12 izolátů. Bez jakéhokoliv identifikovaného genu rezistenci k tetracyklinům bylo 25 izolátů VRE. Zbylé 3 testované geny (*tetK*, *tetO* a *tetX*) nebyly nalezeny ani u jednoho z izolátů.

Ze 3 testovaných genů, kódujících rezistenci k makrolidům byl detekován jen gen *erm(B)*, a to u 67 izolátů. Geny *erm(A)* a *mef(A/E)* nebyly detekovány.

Geny kódující enzymy modifikující aminoglykosidy byly detekovány u 71 testovaných izolátů. Nejčastěji byla zachycena kombinace genů *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia* a *aph(3')-IIIa*, a to v 52 případech. Gen *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia* byl samostatně detekován u 9 izolátů a *gen aph(3')-IIIa* také u 9 izolátů. Jeden z testovaných izolátů nedisponoval žádných z genů kódujících enzymy modifikující aminoglykosidy. Gen *ant(4')-Ia* nebyl detekován ani u jednoho z izolátů.

Porovnání výskytu testovaných genů rezistence s MIC testovaných antibiotik (erytromycin (ERY), klindamycin (CLI), tetracyklin (TET), vankomycin (VAN)) je dispozici v tabulce 21.

**Tabulka 21:** Zastoupení genů rezistence mezi izoláty VRE od pacientů hospitalizovaných ve FNOL a VNOL a jejich porovnání s rozsahem MIC testovaných antibiotik

| Počet izolátů | Přítomnost genů |                |                |                |                |                |                |                |                |                  | MIC (µg/ml) |         |      |      |
|---------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|-------------|---------|------|------|
|               | <i>vanA</i>     | <i>tet (K)</i> | <i>tet (L)</i> | <i>tet (M)</i> | <i>tet (O)</i> | <i>tet (S)</i> | <i>tet (X)</i> | <i>erm (A)</i> | <i>erm (B)</i> | <i>mef (A/E)</i> | VAN         | TET     | ERY  | CLI  |
| 25            | +               | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | -                | 4-256       | 0,25-16 | 4-16 | 4-32 |
| 17            | +               | -              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | -                | 8-256       | 0,25-16 | 4-16 | 4-16 |
| 16            | +               | -              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | -                | 32-256      | 0,5-16  | 4-16 | 4-8  |
| 8             | +               | -              | +              | +              | -              | +              | -              | -              | +              | -                | 32-256      | 1-16    | 4-16 | 4-8  |
| 4             | +               | -              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | -                | 64-256      | 16-32   | 8-16 | 4-8  |
| 1             | +               | -              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -                | 32          | 4       | 16   | 4    |
| 1             | +               | -              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | -                | 256         | 1       | 8    | 4    |

Legenda:

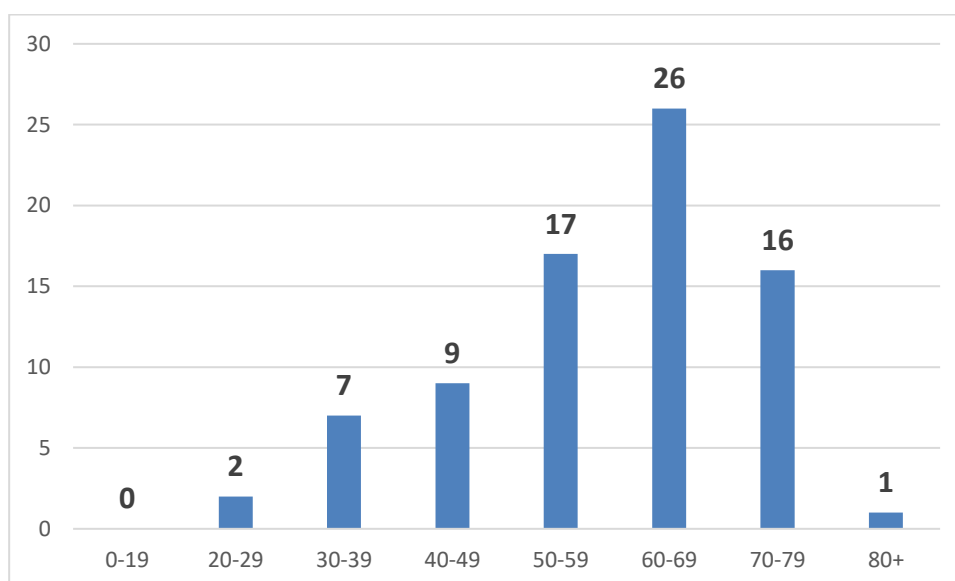
\*přítomnost genu + / nepřítomnost genu -

Breakpointy pro testovaná antibiotika: VAN: 4; TET: 2; ERY: 0,5; CLI: 0,5 (µg/ml)

Zbýlých 78 izolátů (52 %) z celkového počtu 150 zachycených VRE za tříleté období pocházelo od hospitalizovaných hematoonkologických pacientů podrobujících se pravidelným „screeningům“ pro zjištění VRE v GIT metodou pravidelných odběrů perianálních stěrů.

Nejčastěji pocházely tyto izoláty VRE od pacientů ve věkové skupině od 60-69 let (Graf 6), přičemž ve 43 případech se jednalo o muže a ve 35 případech o ženy.

**Graf 6:** Záchyt izolátů VRE ve věkových kategoriích u hematoonkologických pacientů podrobujících se „screeningu“ za 2018-2020



Výsledky stanovení citlivosti získaných izolátů VRE k testovaným antibiotikům jsou uvedeny v tabulce 22. Byla stanovena 100 % rezistence k penicilinu, ampicilinu, erytromycinu i klindamycinu. Vysoká citlivost byla prokázána v případě tigecyklinu (99 %) a linezolidu (100 %).

**Tabulka 22:** Citlivost VRE k vybraným antibiotikům (v procentech) u hematoonkologických pacientů podrobujících se „screeningu“

| Rok/ATB          | PNC      | AMP      | TIG       | CMP       | TET       | ERY      | CLI      | VAN      | TEI      | FUR       | LNZ        |
|------------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|-----------|------------|
| 2018             | 0        | 0        | 98        | 93        | 21        | 0        | 0        | 0        | 2        | 47        | 100        |
| 2019             | 0        | 0        | 100       | 91        | 39        | 0        | 0        | 0        | 9        | 70        | 100        |
| 2020             | 0        | 0        | 100       | 92        | 42        | 0        | 0        | 0        | 0        | 75        | 100        |
| <b>2018-2020</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>99</b> | <b>92</b> | <b>34</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>4</b> | <b>64</b> | <b>100</b> |

Legenda: PNC-penicilin, AMP-ampicilin, TIG-tigecyclin, CMP-chloramfenikol, TET-tetracyklin, ERY-erytromycin, CLI-klindamycin, VAN-vankomycin, TEI-teikoplanin, FUR-nitrofurantoin, LNZ-linezolid.

Záchyty VRE u hematoonkologických pacientů, u nichž se VRE objevilo minimálně jednou i v jiných biologických materiálech než v perianálních výtěrech, jsou k dispozici v rámci časových os z daných let v tabulce 23 (rok 2018), 24 (rok 2019) a 25 (rok 2020).

VRE bylo v perianálních stěrech zjišťováno po časová období od 2 až po 25 po sobě jdoucích týdnů. Po výtěru z rekta, byly izoláty VRE nejčastěji zjištěny ve výtěru z krku. U pacientů, u kterých bylo VRE v GIT zachycováno opakovaně (20), bylo u 11 zjištěno i v dalších materiálech. Nejčastěji v moči, a to u 9 pacientů. Dále poté také ve sputu, BALu či v dutině ústní. Uroinfekci způsobil VRE v 1 případě a lékem volby byl zvolen tigecyklin.





Tabulka 25: Záchyty VRE u hematoonkologických pacientů v roce 2020 / s přesahem záchytu do roku 2021

| Pacient                                     | VRE v / Týdny  | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|----------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|---|---|---|
| M.M. / 1945<br>(pokračování<br>z roku 2019) | HOK stolice    |    |    |    | •  | •  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |
|   | moč            |    |    |    |    | •  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |
|   | stěr/výtěr krk |    |    |    |    | •  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |
|   | sputum         |    |    |    |    | •  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |
| P.P. / 1968                                 | HOK stolice    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | •  |    |    |    |    | •  |    | •  | •  | •  | •  |    | •  | •  | •  | •  |    |    | •  | • | • | • | • |
|   | stěr/výtěr krk |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | •  | •  | •  | •  | •  | •  | •  |    |    | •  | •  |   |   | • |   |

Legenda k tabulkám 23, 24 a 25: Iniciála jména / rok narození. Pozitivní záchyt v daném týdnu je označen symbolem ●.

U všech 78 izolátů VRE byl detekován gen *vanA*. Z vybraných faktorů virulence byly u těchto izolátů identifikovány dva z pěti, a to enterokokový povrchový protein (*esp*) a hyaluronidáza (*hyl*). Nejčastěji byl nalezen samotně gen *esp* (35 izolátů), tento pak v kombinaci s *hyl* u 29 izolátů a gen *hyl* samostatně pak v 10 případech. Bez identifikovaného faktoru virulence pak byly 4 izoláty. Agregační substance (*agg/asa1*), cytolysin (*cyl*) ani želatináza (*gelE*) nebyly u žádného izolátu detekovány.

Při testování genů kódujících rezistenci k tetracyklinům byly zachyceny 3 ze 6 zjišťovaných genů, a to u 55 izolátů, konkrétně geny *tetM*, *tetL* a *tetS*. Gen *tetM* byl zachycen samostatně u 33 izolátů. Kombinace genů *tetM* a *tetL* u 16 izolátů a kombinace tří genů *tetM*, *tetL* a *tetS* u 6 izolátů. Bez jakéhokoliv identifikovaného genu rezistenci k tetracyklinům bylo 23 izolátů VRE. Zbýlé 3 zjišťované geny (*tetK*, *tetO* a *tetX*) nebyly nalezeny ani u jednoho z izolátů.

Ze 3 testovaných genů, kódujících rezistenci k makrolidům byl detekován jen gen *erm(B)*, a to u 72 izolátů. Přítomnost genů *erm(A)* a *mef(A/E)* nebyla u izolátů zjištěna.

Geny kódující enzymy modifikující aminoglykosidy byly detekovány u 77 testovaných izolátů. Nejčastěji byla zachycena kombinace genů *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia* a *aph(3')-IIIa*, a to v 64 případech. Gen *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia* byl samostatně detekován u 4 izolátů a *gen aph(3')-IIIa* u 9 izolátů. Jeden z testovaných izolátů nedisponoval žádných z genů kódujících enzymy modifikující aminoglykosidy. Gen *ant(4')-Ia* nebyl detekován ani u jednoho z izolátů.

Porovnání výskytu testovaných genů rezistence s MIC testovaných antibiotik (erytromycin (ERY), klindamycin (CLI), tetracyklin (TET), vankomycin (VAN)) je dispozici v tabulce 26.

**Tabulka 26:** Zastoupení genů rezistence mezi izoláty VRE od hematologických pacientů v rámci dlouhodobého „screeningu“ a jejich porovnání s rozsahem MIC testovaných antibiotik

| Počet izolátů | Přítomnost genů |                |                |                |                |                |                |                |                |                  | MIC (µg/ml) |          |      |      |
|---------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|-------------|----------|------|------|
|               | <i>van A</i>    | <i>tet (K)</i> | <i>tet (L)</i> | <i>tet (M)</i> | <i>tet (O)</i> | <i>tet (S)</i> | <i>tet (X)</i> | <i>erm (A)</i> | <i>erm (B)</i> | <i>mef (A/E)</i> | VAN         | TET      | ERY  | CLI  |
| 31            | +               | -              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | -                | 16-32       | 0,5-16   | 8    | 4-8  |
| 22            | +               | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | -                | 16-256      | 0,125-16 | 4-32 | 4-32 |
| 13            | +               | -              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | -                | 8-256       | 0,5-32   | 4-8  | 4-16 |
| 6             | +               | -              | +              | +              | -              | +              | -              | -              | +              | -                | 32-256      | 16       | 4-32 | 4-8  |
| 3             | +               | -              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -                | 256         | 16       | 4    | 4-8  |
| 2             | +               | -              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -                | 16-32       | 0,5-16   | 8    | 4-8  |
| 1             | +               | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -                | 256         | 2        | 4    | 8    |

Legenda:

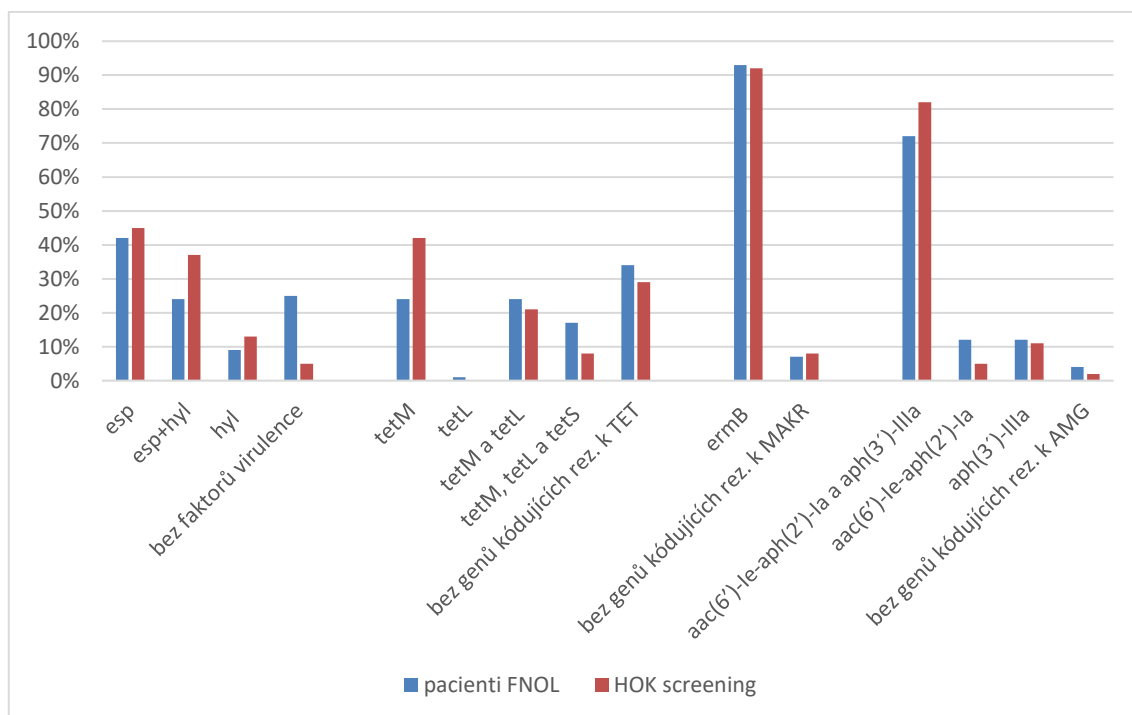
\*přítomnost genu + / nepřítomnost genu -

Breakpointy pro testovaná antibiotika: VAN: 4; TET: 2; ERY: 0,5; CLI: 0,5 (µg/ml)



Porovnání zjištěných faktorů virulence a genů rezistence vůči jednotlivým skupinám antibiotik u dvou rozdílných testovaných skupin nabízí graf 7.

**Graf 7:** Porovnání záchytu faktorů virulence a genů rezistence mezi izoláty od pacientů FNOL a VNOL a pacientů zařazených do „screeningu“ na HOK.



Dalším analýzám věnujícím se identifikaci VRE v GIT u hospitalizovaných hematoonkologických pacientů v rámci zjištění jeho potenciálního nosičství a možného klonálního šíření je věnována kapitola 4.1.2.

#### 4.1.2 VRE u hematoonkologických pacientů

V časovém období 1.1.2016 – 31.12.2018 bylo ze vzorků perianálních stěrů od 1405 pacientů hospitalizovaných na HOK ve FNOL v rámci zavedeného dlouhodobě probíhajícího „screeningu“ získáno 103 izolátů VRE. Ve všech případech se jednalo o druh *Enterococcus faecium*. Nosičství VRE v GIT u hematoonkologických pacientů bylo tedy stanoveno na 7,3 %.

U všech izolovaných VRE byla detekována přítomnost *vanA* genu. Enterokoky s fenotypy VanB, VanC-1, VanC2-C3 nebyly zachyceny. Analýza vybraných faktorů virulence nejčastěji prokázala přítomnost enterokokového povrchového proteinu (*esp*), a to u 84 % izolátů. Samostatně byl detekován u 53 % izolátů, v kombinaci s hyaluronidázou (*esp+hyl*) pak u 31 % izolátů. Hyaluronidáza (*hyl*) se celkově vyskytovala u 40 % izolátů, samostatně pak u 9 %. Agregační substance (*agg/asa1*), cytolysin (*cyl*) ani

želatináza (*gelE*) nebyly u žádného izolátu detekovány. Bez jakéhokoliv faktoru virulence bylo 7 % izolátů.

Výsledky stanovení MIC získaných izolátů VRE jsou uvedeny v tabulce 27. Byla stanovena 100% rezistence k penicilinu, ampicilinu, erytromycinu i klindamycinu. Vysoká citlivost byla prokázána v případě tigecyclinu (94 %) a linezolidu (100 %).

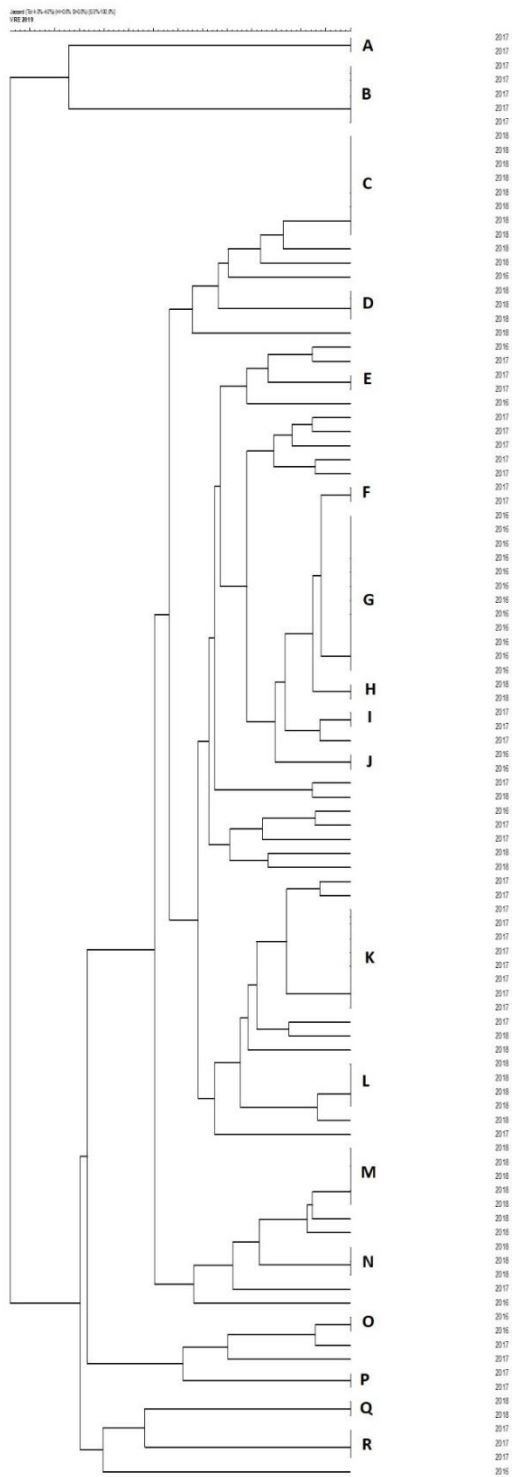
**Tabulka 27:** Citlivost VRE k vybraným antibiotikům (v procentech)

| Rok/ATB          | PNC      | AMP      | TIG       | CMP       | TET       | ERY      | CLI      | VAN      | TEI      | FUR       | LNZ        |
|------------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|-----------|------------|
| 2016             | 0        | 0        | 100       | 50        | 90        | 0        | 0        | 0        | 0        | 100       | 100        |
| 2017             | 0        | 0        | 84        | 59        | 38        | 0        | 0        | 0        | 0        | 81        | 100        |
| 2018             | 0        | 0        | 98        | 93        | 21        | 0        | 0        | 0        | 2        | 47        | 100        |
| <b>2016-2018</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>94</b> | <b>67</b> | <b>50</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>76</b> | <b>100</b> |

Legenda: PNC-penicilin, AMP-ampicilin, TIG-tigecyclin, CMP-chloramfenikol, TET-tetracyklin, ERY-erytromycin, CLI-klindamycin, VAN-vankomycin, TEI-teikoplanin, FUR-nitrofurantoin, LNZ-linezolid.

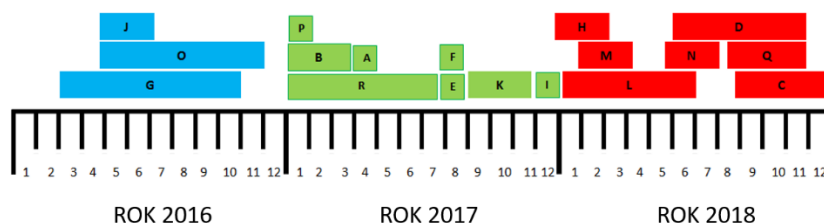
Výsledkem porovnání izolátů VRE od hematologických pacientů metodou PFGE je dendrogram na obrázku 5. U 103 VRE bylo identifikováno 69 klonů a tyto byly na základě míry podobnosti rozděleny do 18 skupin. Vzniklé skupiny byly označeny písmeny A-R a čítaly 2-12 izolátů, přičemž velmi často se jednalo o klony o 2-3 izolátech. Celková klonalita testovaných VRE tedy činila 67 %. Zbýlých 34 izolátů (33 %) vykazovalo jedinečný restriční profil. Izoláty v jednotlivých klonálních skupinách vykazovaly 98% míru podobnosti.

**Obrázek 5:** Dendrogram PFGE 103 izolátů vankomycin-rezistentních *E. faecium* za období studie 2016-2018.



Výskyt jednotlivých klonálních skupin VRE v průběhu sledovaného období dle časové osy znázorňuje obrázek 6.

**Obrázek 6:** Časová osa výskytu klonálních skupin VRE



#### 4.1.3 VRE v komunitě a u hospitalizovaných pacientů (prospektivní studie)

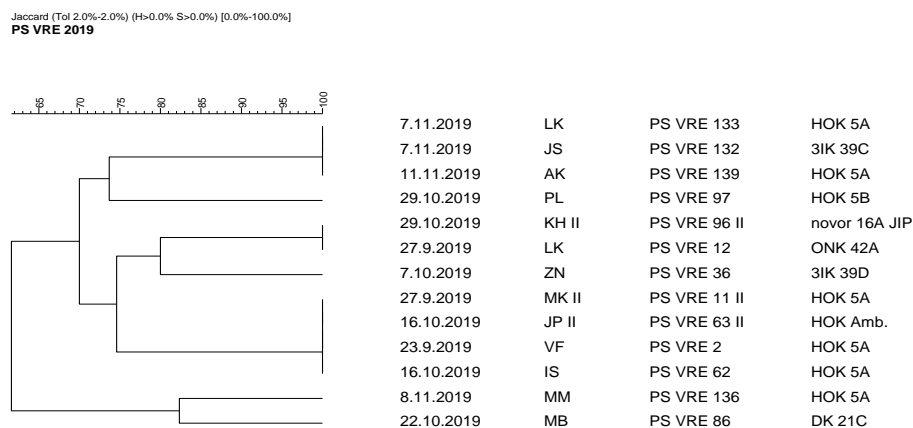
V průběhu 10 týdnů v období od září do listopadu 2019 byly cíleně zpracovávány vzorky stolic a perianálních stěrů od pacientů FNOL a VNOL a osob v komunitním prostředí. Izoláty z komunitního prostředí byly získány při spolupráci s mikrobiologickou laboratoří Mikrochem s.r.o., což je akreditovaná zdravotnická laboratoř specializující se na laboratorní diagnostiku v oblasti lékařské mikrobiologie. Pro záchyt VRE z GIT byly využity chromogenní vyhledávací půdy (viz metodika). Po otestování 1000 vzorků biologického materiálu (500 - FNOL / 500 - Mikrochem s.r.o.) z každého pracoviště bylo identifikováno celkem 13 izolátů VRE, přičemž zachyceny byly pouze u pacientů hospitalizovaných ve FNOL. Z komunity nebyl zachycen žádný izolát VRE. Ve všech případech se jednalo u *E. faecium*. Za dané časové období bylo zachyceno dle nemocničního systému 102 enterokoků, prevalence VRE tedy činila 13 %.

Větší část (8 izolátů) činily VRE pocházející od pacientů z HOK, zbylých 5 pocházelo od pacientů z různých oddělení (dětská klinika, novorozenecké oddělení, interní klinika či onkologie). Od mužů pocházelo 5 a od žen 8 izolátů VRE. Nejvíce byla zastoupena věková skupina v rozmezí 70-79 let, a to 7 izoláty VRE. Z výsledků stanovení MIC byla stanovena 100 % rezistence k penicilinu, ampicilinu, erytromycinu i klindamycinu a vysoká citlivost prokázána v případě tigecyklinu (100 %). Rozmezí zjištěných hodnot minimálních inhibičních koncentrací vankomycinu i teikoplaninu se pohybovalo v rozmezí 8-256 mg/ul.

Genetická analýza těchto izolátů VRE ukázala na přítomnost genu *vanA* u všech 13 izolátů. Z testovaných faktorů virulence byl nejčastěji zachycen gen kódující hyaluronidázu (*hyl*), a to u 6 izolátů, v kombinaci s enterokokovým povrchovým proteinem (*esp+hyl*) pak i jednoho izolátu. Gen *esp* samostatně pak u 4 izolátů. Bez identifikovaného faktoru virulence byly 2 izoláty VRE.

Epidemiologická analýza byla provedena pomocí PFGE a její výsledek v podobě dendrogramu je vidět na obr. 7. Výsledkem jsou 3 klonální skupiny o 2-4 izolátech a 3 izolátů s jedinečným restričním profilem.

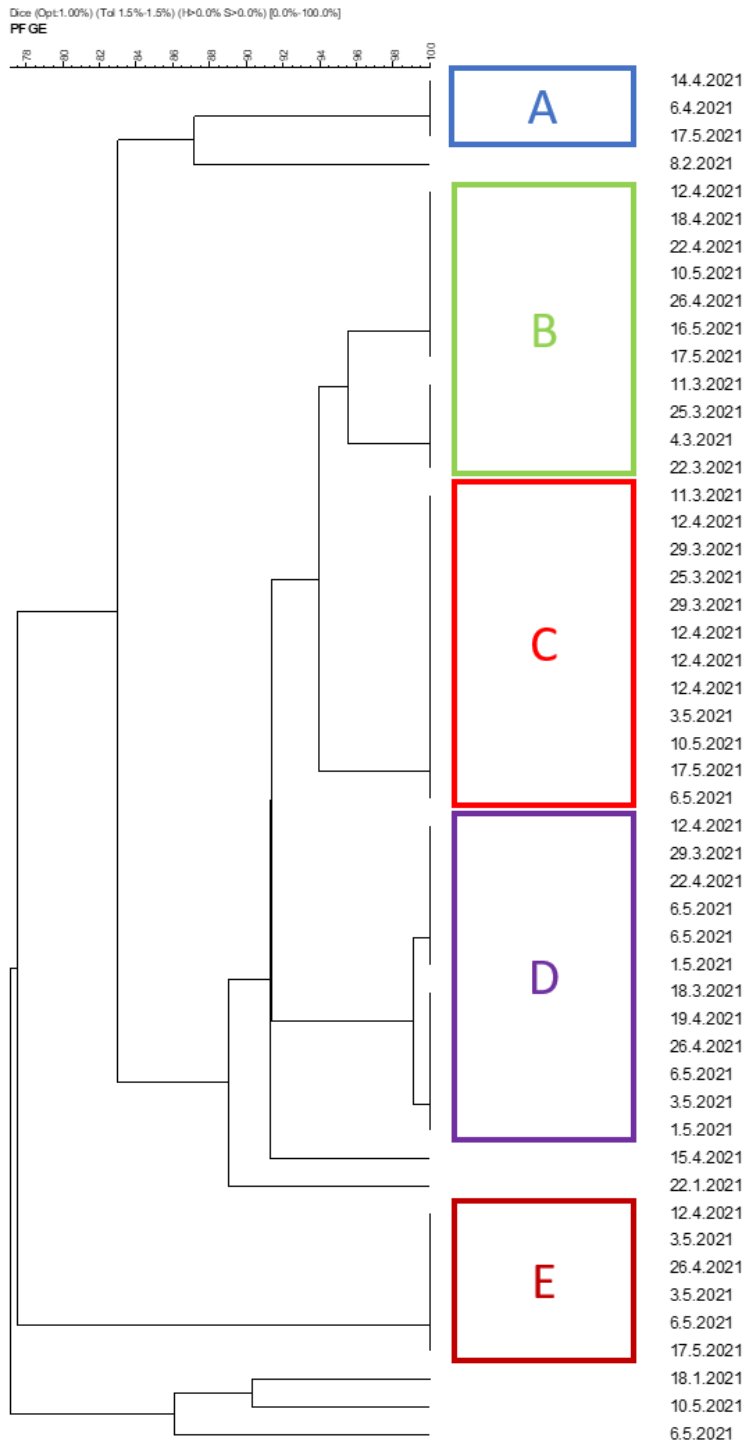
**Obrázek 7:** Dendrogram PFGE izolátů VRE z prospektivní studie



#### 4.1.4 VRE u pacientů hospitalizovaných s onemocněním COVID-19

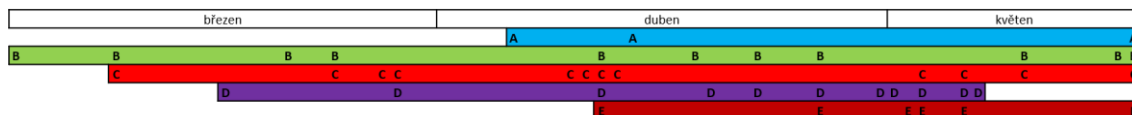
V časovém úseku od ledna do května roku 2021 bylo od pacientů s vážným průběhem COVID-19 hospitalizovaných na Klinice anesteziologie a resuscitace a intenzivní medicíny ve FNOL získáno celkem 50 izolátů VRE, a to z různých biologických materiálů (endosekrety – u 30 % izolátů, moč (26 %), výtěry z rektu (32 %) aj.), přičemž se ve všech případech jednalo o *Enterococcus faecium*. Izoláty byly podrobeny epidemiologické analýze pomocí PFGE. Výsledný dendrogram (obr. 8) rozdělil 44 ze získaných 50 izolátů do 5 klonálních skupin, čítajících 3-12 izolátů (A-E). Zbýlých 6 izolátů (12 %) vykazovalo jedinečný restriční profil. Všechny takto získané izoláty VRE byly v rámci této studie podrobeny další genetické analýze.

**Obrázek 8:** Dendrogram 50 izolátů vankomycin-rezistentních *E. faecium* u covidových pacientů 01-05/2021.



Časová osa (obr.9) poskytuje informace o době výskytu jednotlivých izolátů VRE. Záchyt daného izolátu v klonální skupině v časovém průběhu studie je označen písmenem dané klonální skupiny. Barevně vyznačeny jsou celé klonální skupiny. Nejdéle přetrvávala skupina, označená „B“, a to téměř 11 týdnů, s celkovým počtem 11 identifikovaných izolátů VRE.

**Obrázek 9:** Časová osa výskytu jednotlivých izolátů VRE u covidových pacientů



U všech izolátů VRE byl identifikován gen *vanA*. Enterokoky s fenotypy VanB, VanC-1, VanC2-C3 nebyly zachyceny. Z testovaných 5 faktorů virulence (agregační substance (*agg/asa1*), cytolysin (*cyl*), želatináza (*gelE*), enterokokový povrchový protein (*esp*) a hyaluronidáza (*hyl*)) byl zachycen pouze jeden, a to gen pro *esp*. Ten byl zjištěn u všech testovaných VRE.

Při identifikaci genů kódujících rezistenci k tetracyklinům byly zachyceny 3 ze 6 testovaných genů, a to u 14 izolátů. Gen *tetM* byl zachycen u 1 izolátu a kombinace genů *tetM* a *tetL* u 11 izolátů a kombinace genů *tetM* a *tetL* a *tetS* u 2 izolátů. Zbylé 3 testované geny (*tetK*, *tetO* a *tetX*) nebyly nalezeny ani u jednoho z izolátů.

Ze 3 testovaných genů, kódujících rezistenci k makrolidům byl detekován jen gen *erm(B)*, a to u 44 izolátů. Geny *erm(A)* a *mef(A/E)* nebyly detekovány.

Geny kódující enzymy modifikující aminoglykosidy byly detekovány u 49 testovaných izolátů. Nejčastěji byla zachycena kombinace genů *aac(6′)-Ie-aph(2′)-Ia* a *aph(3′)-IIIa*, a to v 42 případech. Gen *aac(6′)-Ie-aph(2′)-Ia* byl samostatně detekován u 6 izolátů a *gen aph(3′)-IIIa* jen u 1. Gen *ant(4′)-Ia* nebyl detekován ani u jednoho z 50 izolátů.

Byla stanovena 100% rezistence k penicilinu, ampicilinu, erytromycinu i klindamycinu. Vysoká citlivost byla prokázána v případě tigecyklinu (100 %) a linezolidu (100 %). Porovnání výskytu testovaných genů rezistence s MIC testovaných antibiotik (erytromycin (ERY), klindamycin (CLI), tetracyklin (TET), vankomycin (VAN)) je dispozici v tabulce 28.

**Tabulka 28:** Zastoupení genů rezistence mezi izolátů VRE od pacientů s těžkým průběhem COVID-19 a jejich porovnání s rozsahem MIC testovaných antibiotik

| Počet izolátů | Přítomnost genů |                |                |                |                |                |                |                |                |                  | MIC (µg/ml) |         |     |     |
|---------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|-------------|---------|-----|-----|
|               | <i>vanA</i>     | <i>tet (K)</i> | <i>tet (L)</i> | <i>tet (M)</i> | <i>tet (O)</i> | <i>tet (S)</i> | <i>tet (X)</i> | <i>erm (A)</i> | <i>erm (B)</i> | <i>mef (A/E)</i> | VAN         | TET     | ERY | CLI |
| 36            | +               | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | -                | 8-256       | 0,25-16 | 4-8 | 4-8 |
| 6             | +               | -              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | -                | 8-256       | 1-32    | 4-8 | 4-8 |
| 5             | +               | -              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -                | 64-256      | 16      | 4-8 | 4-8 |
| 1             | +               | -              | +              | +              | -              | +              | -              | -              | -              | -                | 64          | 16      | 8   | 8   |
| 1             | +               | -              | +              | +              | -              | +              | -              | -              | +              | -                | 256         | 16      | 8   | 8   |
| 1             | +               | -              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | -                | 64          | 16      | 8   | 8   |

Legenda:

\*přítomnost genu + / nepřítomnost genu -

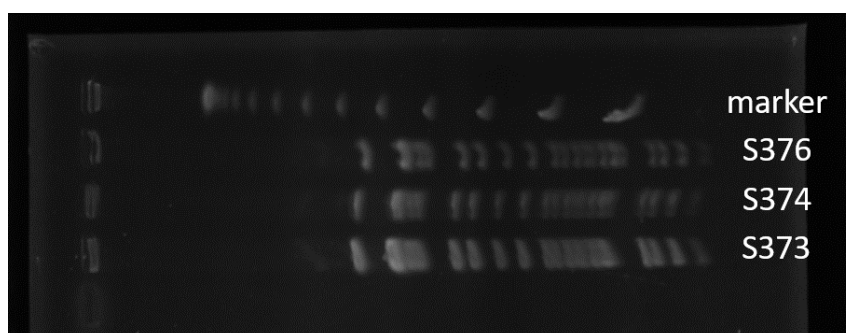
Breakpointy pro testovaná antibiotika: VAN: 4; TET: 2; ERY: 0,5; CLI: 0,5 (µg/ml)

## 4.2 MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÁ ANALÝZA VRE U ZVÍŘAT A V POTRAVINÁCH

V časovém období 1.9.2018 - 31.12.2020 bylo z potravin živočišného původu a klinického materiálu zvířat zpracováno celkem 3020 vzorků. Za celou dobu trvání studie byly potvrzeny pouze 3 izoláty VRE (označení izolátů S376, S374, S373), přičemž ve všech případech se jednalo o *Enterococcus faecium*. Tyto izoláty byly zachyceny z klinického materiálu zvířat. Konkrétně jednalo o kloakální výtěry brojlerů pocházejících z jedné farmy a zachyceny byly při jednom sběru v lednu roku 2019.

Následnou analýzou zachycených izolátů pomocí PFGE bylo zjištěno, že se jedná o tentýž kmen (Obr. 10). U tohoto kmene byl detekován *vanA* gen a nedisponoval žádným faktorem virulence. Dále u něj byla identifikována kombinace genů *tet(L)* a *tet(M)*, kódujících rezistenci k tetracyklinům a gen *erm(B)* jako jediný ze 3 testovaných genů, kódujících rezistenci k makrolidům. Aminoglykosidová rezistence byla detekována záchytem kombinací genů *aac(6')-aph(2'')* a *aph(3')-IIIa*.

**Obrázek 10:** Výsledek PFGE (foto gelu) u 3 animálních izolátů



Legenda:

\*DNA marker

\*izoláty animálního původu (S376, S374, S373)



Výsledky stanovení MIC získaných izolátů VRE stanovily 100% rezistenci k ampicilinu, penicilinu a erytromycinu. Vysoká citlivost byla zjištěna k tigecyklinu (90 %) a linezolidu (100 %). Porovnání výskytu testovaných genů rezistence s MIC testovaných antibiotik (erytromycin (ERY), klindamycin (CLI), tetracyklin (TET), vankomycin (VAN)) je dispozici v tabulce 29.

**Tabulka 29:** Zastoupení genů rezistence u zachyceného VRE kmene z animální oblasti a jeho porovnání s MIC testovaných antibiotik.

| Počet izolátů | Přítomnost genů |                |                |                |                |                |                |                |                |                  | MIC (μg/ml) |     |     |     |
|---------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|-------------|-----|-----|-----|
|               | <i>vanA</i>     | <i>tet (K)</i> | <i>tet (L)</i> | <i>tet (M)</i> | <i>tet (O)</i> | <i>tet (S)</i> | <i>tet (X)</i> | <i>erm (A)</i> | <i>erm (B)</i> | <i>mef (A/E)</i> | VAN         | TET | ERY | CLI |
| 3             | +               | -              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | -                | 32          | 16  | 4   | 4   |

Legenda:

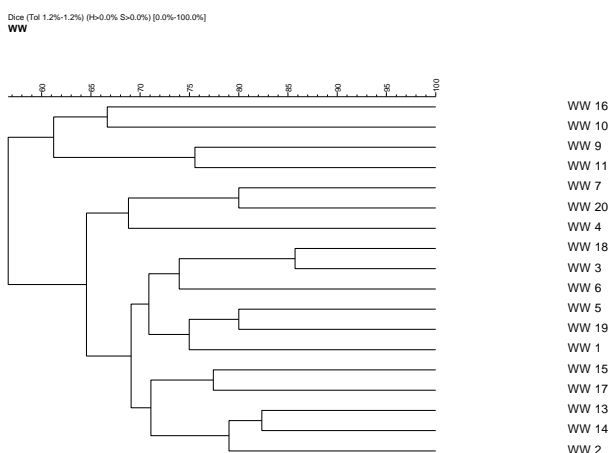
\*přítomnost genu + / nepřítomnost genu -

Breakpointy pro testovaná antibiotika: VAN: 4; TET: 2; ERY: 0,5; CLI: 0,5 (μg/ml)

### 4.3 MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÁ ANALÝZA VRE V PROSTŘEDÍ POVRCHOVÝCH A ODPADNÍCH VOD

Za časové období 1.1.2018 – 31.12.2020 bylo v terénu zajištěno 200 vzorků povrchových i odpadních vod a kalů. Ve 180 případech se jednalo o vzorky vody odpadní a povrchové a ve 20 případech o vzorky kalu z ČOV. Standardními mikrobiologickými metodami popsanými v kapitole 3.1.1.1 bylo získáno 21 izolátů VRE. Ve všech případech se jednalo o *Enterococcus faecium*. Pomocí molekulární typizace za použití PFGE bylo zjištěno 18 jedinečných kmenů, přičemž 16 pocházelo z odpadních vod a 2 z vod povrchových (Obr. 11). Ve vzorcích kalů nebyl VRE zachycen.

**Obrázek 11:** Dendrogram 18 jedinečných kmenů VRE z odpadních a povrchových vod



Legenda:

\*Horizontální osa – podobnost kmenů v procentech

\*Vertikální osa – označení izolát

Souhrn identifikovaných VRE a místa jejich záchytu uvádí tabulka 30. Záchyty byly pouze ve vzorcích z odpadních a povrchových vod, z kalu nebyl detekován žádný izolát VRE. Nejčastější záchyty po celou dobu studie byly na výstupu z městské čističky odpadních vod (ČOV 2).

**Tabulka 30:** Celkový počet izolátů VRE získaných z jednotlivých odběrových míst

| Laboratorní označení izolátu | Odběrové místo  | Typ vzorku              | Datum odběru |
|------------------------------|-----------------|-------------------------|--------------|
| WW1                          | FNOL 1          | odpadní voda            | 10/2018      |
| WW2                          | FNOL 1          | odpadní voda            | 11/2018      |
| WW3                          | Morava před ČOV | povrchová voda          | 06/2019      |
| WW4                          | ČOV 2           | přečištěná odpadní voda | 06/2019      |
| WW5                          | Morava před ČOV | povrchová voda          | 08/2019      |
| WW6                          | VNOL 3          | odpadní voda            | 08/2019      |
| WW7                          | ČOV 2           | přečištěná odpadní voda | 10/2019      |
| WW9                          | FNOL 1          | odpadní voda            | 11/2019      |
| WW10                         | FNOL 2          | přečištěná odpadní voda | 11/2019      |
| WW11                         | FNOL 2          | přečištěná odpadní voda | 11/2019      |
| WW13                         | ČOV 2           | přečištěná odpadní voda | 01/2020      |
| WW14                         | ČOV 2           | přečištěná odpadní voda | 02/2020      |
| WW15                         | ČOV 2           | přečištěná odpadní voda | 02/2020      |
| WW16                         | FNOL 2          | přečištěná odpadní voda | 06/2020      |
| WW17                         | ČOV 2           | přečištěná odpadní voda | 06/2020      |
| WW18                         | ČOV 2           | přečištěná odpadní voda | 06/2020      |
| WW19                         | ČOV 2           | přečištěná odpadní voda | 07/2020      |
| WW20                         | ČOV 2           | přečištěná odpadní voda | 07/2020      |

U všech identifikovaných VRE byla stanovena citlivost k antibiotikům, včetně hodnot minimálních inhibičních koncentrací. Byla stanovena 100% rezistence k ampicilinu, penicilinu a erytromycinu. S výjimkou jednoho izolátu (WW17) byly všechny VRE rezistentní ke klindamycinu a s výjimkou jednoho izolátu (WW11) rezistentní k teikoplaninu. Vysoká citlivost byla prokázána v případě tigecyklinu (90 %) a linezolidu (100 %).

Pomocí PCR a následné gelové elektroforézy byl u 17 izolátů VRE prokázán *vanA* gen a u 1 izolátu *vanB* gen (WW11 – jako jediný záchyt po celou dobu studie odpadních vod). Další genetické analýzy odhalily výskyt genů kódujících faktory virulence. Byly detekovány geny kódující produkci enterokokového povrchového proteinu

a hyaluronidázy. Konkrétně byly prokázány geny *esp* (n=4), *hyl* (n=6) a kombinace *esp+hyl* (n=3). U 5 izolátů VRE nebyl prokázán žádný faktor virulence.

Při testování genů kódujících rezistenci k tetracyklinům byly zachyceny 2 ze 6 testovaných genů, a to u 13 z 18 izolátů. Gen *tetM* byl zachycen u 6 izolátů a kombinace genů *tetM* a *tetL* u dalších 7 izolátů. Ze 3 testovaných genů, kódujících rezistenci k makrolidům byl detekován jen jediný, a to gen *erm(B)*, a to u 13 izolátů. Nejčastěji se u získaných rezistentních enterokoků z odpadních vod vyskytovala kombinace genů *tet(M)+erm(B)*, a to u 5 izolátů. Geny *tetK*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(X)*, *erm(A)* a *mef(A/E)* nebyly nalezeny.

Geny kódující rezistenci k aminoglykosidům byly detekovány u 16 z 18 testovaných izolátů. Nejčastěji byla zachycena kombinace genů *aac(6')-aph(2'')* a *aph(3')-IIIa*, a to v 11 případech. Gen *aac(6')-aph(2'')* byl samostatně detekován u 3 izolátů a gen *aph(3')-IIIa* u dalších 2.

Porovnání výskytu testovaných genů rezistence s MIC testovaných antibiotik: erytromycin (ERY), klindamycin (CLI), tetracyklin (TET), vankomycin (VAN) je dispozici v tabulce 31.

**Tabulka 31:** Zastoupení genů rezistence mezi izoláty VRE z odpadních a povrchových vod a jejich porovnání s MIC testovaných antibiotik

| Počet izolátů | Přítomnost genů |              |                |                |                |                |                |                |                |                |                  | MIC (µg/ml) |         |      |        |
|---------------|-----------------|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|-------------|---------|------|--------|
|               | <i>van A</i>    | <i>van B</i> | <i>tet (K)</i> | <i>tet (L)</i> | <i>tet (M)</i> | <i>tet (O)</i> | <i>tet (S)</i> | <i>tet (X)</i> | <i>erm (A)</i> | <i>erm (B)</i> | <i>mef (A/E)</i> | VAN         | TET     | ERY  | CLI    |
| 3             | +               | -            | -              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | -                | 8-32        | 16      | 4-8  | 4-16   |
| 4             | +               | -            | -              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -                | 8-32        | 0,25-16 | 4-16 | 0,06-8 |
| 5             | +               | -            | -              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | -                | 16-64       | 0,25-16 | 4-16 | 4-16   |
| 1             | +               | -            | -              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -                | 64          | 16      | 8    | 4      |
| 4             | +               | -            | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | -                | 8-32        | 16      | 4-8  | 4-16   |
| 1             | -               | +            | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | -                | 8           | 0,5     | 4    | 4      |

Legenda:

\*přítomnost genu + / přítomnost genu -

Breakpointy pro testovaná antibiotika: VAN: 4; TET: 2; ERY: 0,5; CLI: 0,5 (µg/ml)

#### 4.3.1 Korelace záchytu VRE s nálezy reziduí antibiotik v odpadních a povrchových vodách

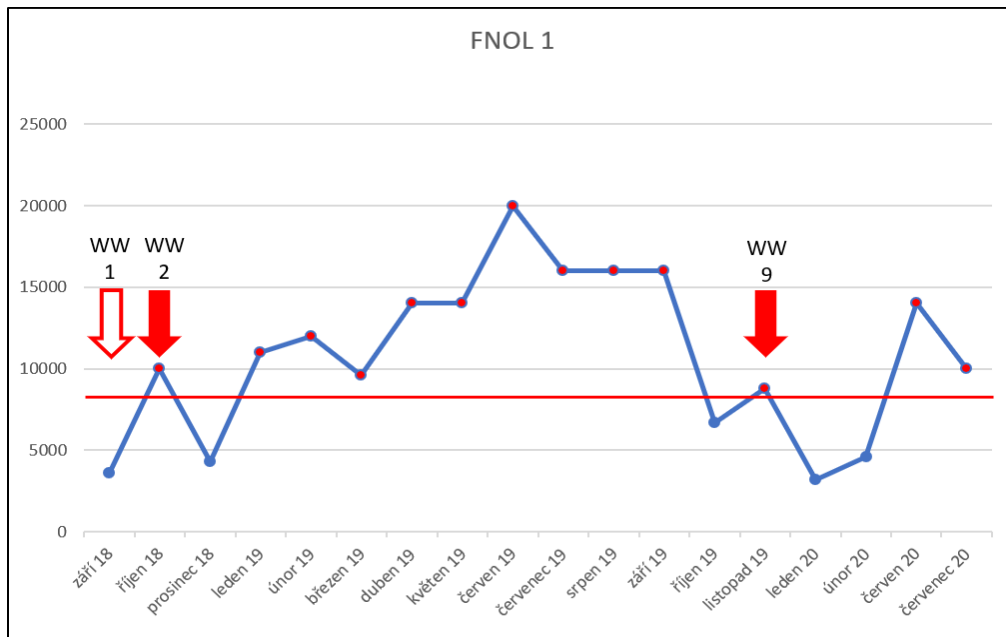
Hodnoty reziduí antibiotik v odpadních a povrchových vodách byly stanovovány na Katedře analytické chemie PŘF UP spoluřešiteli grantu AZV č. NV18-05-00340 „Epidemiologie vankomycin-rezistentních enterokoků v České republice: One Health concept“ pomocí hmotnostní spektrometrie. S jejich laskavým dovolením uvádím v následující části výsledky korelace.

Zjištěné hodnoty reziduí antibiotik z odběrových míst byly porovnávány s hodnotami PNEC (z angl. predicted no effect concentration) (Bengtsson-Palme &

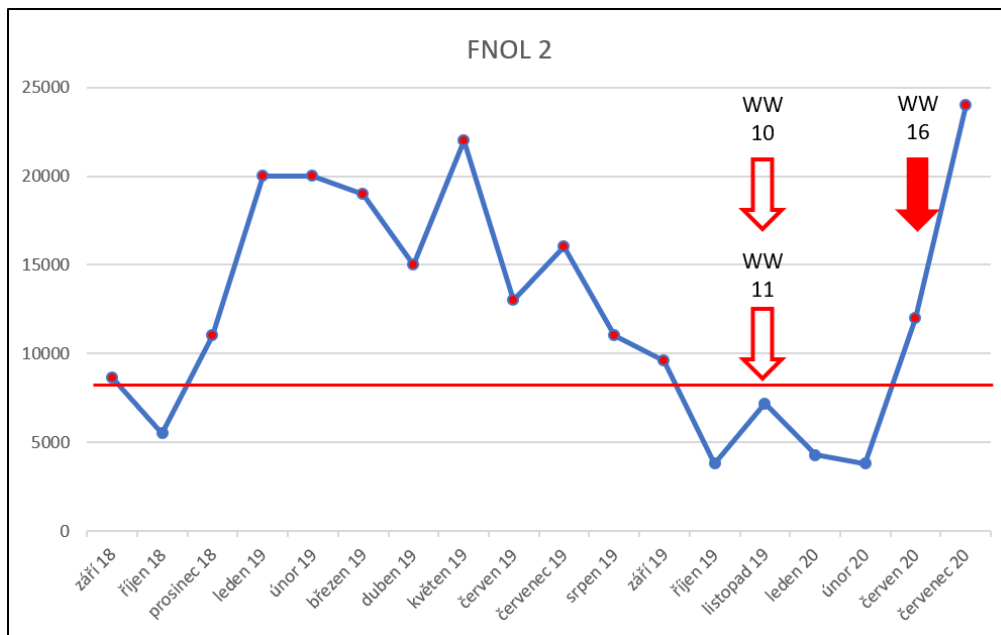
Larsson, 2016), což je hodnota, pod níž by se uvedený nepříznivý účinek antimikrobiálních látek při expozici ve vodním prostředí s největší pravděpodobností neměl projevit. Tyto hodnoty PNEC byly v průběhu studie u testovaných antibiotik překročeny u 32 % vzorků, a to u 5 (ampicilin, klindamycin, tetracyklin, tigecyklin a vankomycin) z 10 testovaných antibiotik. Z toho nejčastěji u vankomycinu, a to 29krát, tzn. u 16 % testovaných vzorků. Vždy se jednalo o vzorky z nemocničních odpadních vod (FNOL 1 nebo FNOL 2). Nadlimitní hodnoty PNEC pro vankomycin u dalších vzorků vod nebyly prokázány.

Vybrané korelace záchytu identifikovaných izolátů VRE se zjištěnou hodnotou rezidua vankomycinu ve vodě jsou k dispozici na obrázcích 12, 13 a 14. Červená čára na těchto obrázcích zobrazuje hodnotu PNEC pro vankomycin, což je 8000 ng/l. Plné červené šipky zobrazují záchyt VRE v kombinaci s nadprahovou hodnotou PNEC pro vankomycin. Prázdné červené šipky zobrazují záchyt VRE při současně naměřené hodnotě vankomycinu pod hodnotou PNEC, tedy pod 8000 ng/l. Z významných záchytů jsou zobrazeny 3 izoláty VRE na vstupu do nemocniční ČOV (FNOL 1, Obr. 12), 3 izoláty VRE na výstupu z nemocniční ČOV (FNOL 2, Obr. 13) a 9 izolátů VRE na výstupu z městské čistírny odpadních vod (ČOV 2, Obr. 14).

**Obrázek 12:** Záchyt VRE v odpadních vodách na vstupu do nemocniční ČOV (FNOL 1)



**Obrázek 13:** Záchyt VRE v odpadních vodách na výstupu z nemocniční ČOV (FNOL 2)



Legenda k obrázkům 12 a 13:

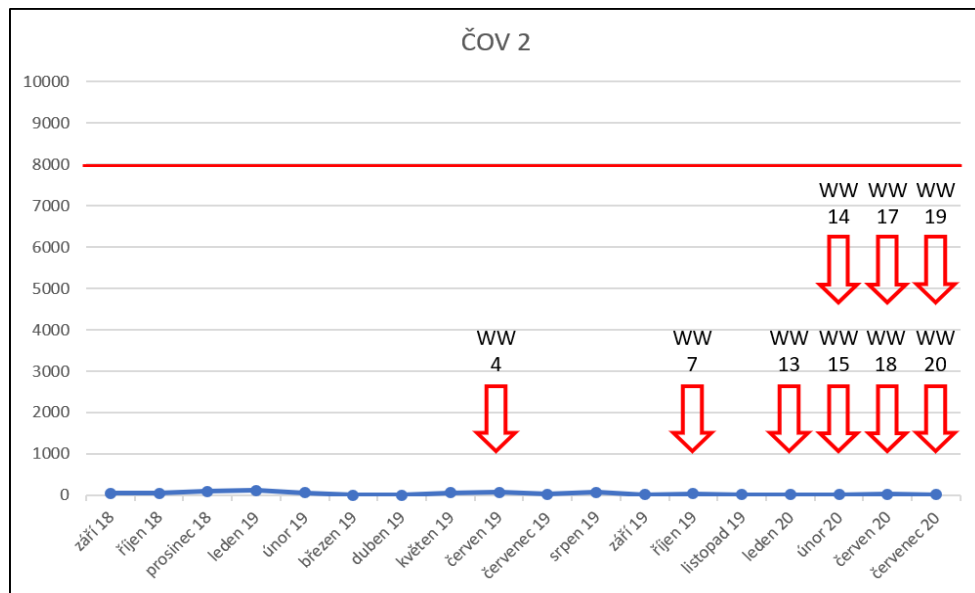
\*osa x ... koncentrace vankomycinu v ng/l / osa y... data odběrů

\*prázdná šipka – záchyt VRE s označením daného vzorku

\*plná červená šipka – záchyt VRE + nadprahová hodnota pro vankomycin s označením daného vzorku

\*červená vodorovná čára udává prahovou hodnotu PNEC pro vankomycin (8000 ng/L)

**Obrázek 14:** Záchyt VRE v odpadních vodách na výstupu z městské čističky odpadních (ČOV 2)



Legenda k obrázku 14:

\*osa x ... koncentrace vankomycinu v ng/l / osa y... data odběrů

\*prázdná šipka – záchyt VRE s označením daného vzorku

\*červená vodorovná čára udává prahovou hodnotu PNEC pro vankomycin (8000 ng/L)

## DISKUZE

Enterokokům, původně gastrointestinálním komenzálům, umožňuje jejich odolnost kolonizovat velmi různorodá prostředí, jako jsou půda, voda, potraviny či krmiva. Tato schopnost překonat nepříznivé vnější podmínky činí enterokoky problematickými také v případě možné kolonizace nemocničních prostor. Společně v kombinaci poddajností jejich genomů, možností disponovat různými faktory virulence a schopností získávat a šířit determinanty antibiotické rezistence přispívají k přeměně toho, co kdysi bývalo jen dalším oportunním patogenem na závažný klinický problém (Ramos *et al.*, 2020).

Enterokoky, kromě toho, že jsou přirozeně rezistentní k řadě antibiotik, jsou mimořádně úspěšné v rychlém získávání rezistence prakticky na všechny antimikrobiální látky zavedené do klinického použití. Potvrzením této teze je skutečnost, že po zavedení chloramfenikolu, erytromycinu a tetracyklinů následoval vznik rezistence, která v některých případech dosáhla takové prevalence, že znemožnila jejich empirické použití (Kristich *et al.*, 2014). Erytromycin a tetracyklin byly, a ve světě ještě jsou, terapeutické látky používané k léčbě enterokokových infekcí. Výskyt rezistentních kmenů k těmto antimikrobiálním látkám, je nepochybně výsledkem rozsáhlého používání těchto antibiotik (Ahmadpoor *et al.*, 2021).

### 4.4 ANALÝZA VRE U HUMÁNNÍ POPULACE

Enterokoky, představující u lidí přirozenou mikrobiotu GIT a jsou u zdravých jedinců obvykle neškodní. Problematickými se mohou stát, je-li narušen komenzální vztah s hostitelem, poté se enterokoky, respektive VRE, mohou stát původci invazivních infekcí (Ramos *et al.*, 2020).

#### 4.4.1 VRE u hospitalizovaných pacientů

Enterokoky jsou oportunními patogeny zejména u pacientů, kteří jsou na jednotkách intenzivní péče, trpí závažným základním onemocněním nebo mají oslabenou imunitu. Závažnost onemocnění a suprese imunity mohou přímo souviset s dlouhodobým pobytem v nemocnici a/nebo nevhodným užíváním antibiotik, což jsou hlavní rizikové faktory pro vznik nozokomiálních infekcí rezistentními enterokoky (El-Kersh *et al.*, 2016). Primárním zdrojem VRE v nemocničním prostředí mohou být zejména pacienti s kolonizací VRE v jejich GIT. Tyto VRE poté mohou způsobovat jak endogenní, tak exogenní infekce (Kolář, 2018). Mezi rizikové faktory, které poté mohou potenciálně zapříčinit, že VRE z GIT způsobí endogenní infekci, můžeme řadit komorbidity, gastrointestinální chirurgii či umístění invazivních zařízení typu centrálních venózních katetrů (Gedik *et al.*, 2014).

Nejčastěji je z humánního klinického materiálu izolován *E. faecalis* (Moghimbeigi *et al.*, 2018). Tento druh je sice patogennější, ale zachycené druhy *E. faecium* mají stále

větší význam, protože jsou odolnější vůči antimikrobiálním látkám, včetně vankomycinu (Ramos *et al.*, 2020). *E. faecium* rezistentní k vankomycinu (VREF) je spojován s nemocničními infekcemi, jako jsou infekce močových cest, rány, bakteriémie, endokarditida a meningitida (Arias a Murray, 2012; Moemen *et al.*, 2015). Několik studií prokázalo, že pacienti s bakteriemií způsobenou VRE mají vyšší úmrtnost než pacienti infikovaní enterokoky citlivými na vankomycin (Moemen *et al.*, 2015).

První část diskuze v této kapitole se věnuje izolátům VRE zachycených z různých klinických materiálů od pacientů ze všech klinik a oddělení ve FNOL a VNOL (mimo hematoonkologické pacienty, kterým je věnovaná druhá část kapitoly 5.1.1).

V souladu s jinými studiemi bylo zjištěno, že jedním z důležitých zdrojů infekcí VRE mohou být močové cesty (Song *et al.*, 2009; Arshadi *et al.*, 2017). Studie Sun *et al.* z roku 2019 uvádí shodný procentuální záchyt izolátů VRE v moči, jako předložená disertační práce. V obou případech byly izoláty VRE v moči zachyceny ve 40 % případů. Sun *et al.* udává 35 záchytů VRE v moči z celkem 87 klinických vzorků, v disertační práci byly VRE zachyceny ve 29 vzorcích moči z celkového počtu klinického materiálu 72 vzorků (Sun *et al.*, 2019).

Věk pacientů je všeobecně důležitým faktorem, který může přispět k rezistenci na antibiotika (Moghimbeigi *et al.*, 2018). V rámci disertační práce byly VRE zachyceny spíše u starších pacientů. Pouhých 15 % záchytů VRE bylo u osob pod 50 let. Zachycené VRE od pacientů ve FNOL a VNOL ve věku 60-79 let činily 50 % z celkového záchytu. To odpovídá studii Asgin & Otlů z roku 2020, kde pacienti s VRE ve stejné věkové kategorii tvořily 55,3 %. Studie Kučové a kolektivu, zabývající se výskytem enterokokových infekcí taktéž ve FNOL a VNOL, uvádí distribuci VRE u osob ve věkové kategorii 51-60 let v 29 %, u osob 61-70 let v 26 % a starších 70 let v 19 % izolovaných VRE (Kučová *et al.*, 2021).

Prevalence VRE je ovlivněna také typem oddělení či kliniky nemocničního zařízení odkud zachycené VRE pochází. Je třeba brát v úvahu, že pacienti, u kterých se často má infekce VRE větší šanci rozvinout, jsou většinou dlouhodobě hospitalizováni či jsou umístěni na jednotkách intenzivní péče. Mezi rizikové pacienty tedy lze řadit pacienty intenzivně léčené antibiotiky, pacienty s mnohočetnými komorbiditami, dále pacienty např. po transplantaci orgánů, po selhání ledvin, vyžadující dialýzu, hematologické a onkologické nemocné (Vehreschild *et al.*, 2019). Tuto skutečnost potvrzuje studie Asgin & Otlů, která zachycuje VRE u 81 % na jednotkách intenzivní péči a zbylých 19 % případů odpovídalo standartním oddělením turecké nemocnice v níž tato studie probíhala (Asgin & Otlů, 2020). Výsledky disertační práce ukazují na záchyt na jednotkách intenzivní péče (KARIM ve FNOL a JIP ve VNOL) ve 25 % případů zachycených VRE a v 18 % případů na interních odděleních. Tyto výsledky přibližně odpovídají iránské studii Zalipour *et al.*, která identifikovala VRE u 32 % případů na JIP a 26 % na interních odděleních (Zalipour *et al.*, 2019).



Výsledky stanovení citlivosti získaných izolátů VRE od hospitalizovaných pacientů ukazovaly na 100% rezistenci k penicilinu, ampicilinu, erytromycinu i klindamycinu. Vysoká citlivost byla prokázána v případě tigecyklinu (96 %) a linezolidu (100 %). Zjištěná citlivost k linezolidu v rámci disertační práce odpovídá i hodnotám z evropských i mimoevropských států, Irán (99,3 %), Turecko (99 %), Austrálie (98,7 %), Čína (100 %). Nižší hodnoty citlivosti VRE kmenů k linezolidu vykazuje Kanada, a to 86,3 % (Sun *et al.*, 2019; Asgin & Otlu, 2020). Vzhledem k tomu, že linezolid, společně s tigecyklinem zůstávají lékem volby při infekcích VRE kmeny, je třeba tyto hodnoty nadále sledovat.

Jak již bylo zmíněno výše, velmi často způsobují VRE infekci močových cest (Song *et al.*, 2009; Arshadi *et al.*, 2017). Tuto skutečnost potvrzují i výsledky předložené disertační práce. Ze 72 zachycených izolátů VRE od pacientů FNOL a VNOL, jich 29 bylo zachyceno v moči, přičemž v 11 případech (38 %) způsobily infekci močových cest vyžadující léčbu. Lékem volby byl u 6 pacientů zvolen linezolid a u 5 pacientů tigecyklin. V 5 případech pak tito pacienti pocházeli z JIP. VRE byly poté také často identifikovány jako původci infekcí vyžadující léčbu rezervními antibiotiky, ve stěrech a výtěrech ran, velmi často z břicha, či v sekretech-drénech. To odpovídá možné kolonizaci enterokokem z GIT daného místa například po invazivních operačních výkonech.

Nejčastěji se vyskytujícím fenotypem VRE v Evropě, i v ČR je VanA (Talaga *et al.*, 2018; Kučová *et al.*, 2021). Tomu odpovídají i výsledky našich studií. Při identifikaci VRE u hospitalizovaných pacientů ve FNOL a VNOL v rámci předkládané disertační práce, byly zachyceny pouze druhy *E. faecium* rezistentní k vankomycinu (VREF), přičemž výsledky genetických analýz ukázaly, že ve všech případech byla rezistence k vankomycinu podmíněna přítomností *vanA* genu.

Faktory virulence mohou u enterokoků zvyšovat schopnost adherence k hostitelské tkáni a podporovat tak kolonizaci. Mezi běžné a velmi dobře popsané faktory virulence můžeme řadit agregační substanci (*agg*, *asa1*), cytolysin (*cyl*), želatinázu (*gelE*), enterokokový povrchový protein (*esp*) a hyaluronidáza (*hyl*) (Coskun, 2019; Fisher & Phillips, 2009; Braïek, 2019). Je vhodné zmínit, že enterokoky mohou předávat faktory virulence, či geny rezistence dalším kmenům enterokoků a dalším bakteriím, např. stafylokokům, vč. MRSA (Arshadi *et al.*, 2017). Ze sledovaných genů kódujících faktory virulence v rámci této disertační práce byly u 72 izolátů VRE od hospitalizovaných pacientů identifikovány pouze dva z pěti genů. Konkrétně šlo o geny *esp* a *hyl*, přičemž byly zjištěny u celkem 75 % testovaných izolátů. Gen *esp* byl zjištěn u 47 % izolátů a gen *hyl* u 30 % izolátů VRE. Bez jakéhokoliv faktoru virulence bylo 25 % VRE. Záchyt genu *esp* v naší práci je nižší nežli např. v iránské studii Haghi *et al.*, kteří identifikovali tento gen u 67 % izolátů VRE. Naproti tomu gen *hyl* zachycují pouze u 4 % VRE (Haghi *et al.*, 2019). Ještě vyšší záchyt genu *esp* uvádí studie Gozalan *et al.* z roku 2015, a to 75 % VRE (Gozalan *et al.*, 2015).

Jak již bylo zmíněno v úvodu diskuze, dokážou enterokoky být velmi úspěšní v rychlém získávání rezistence na antimikrobiální látky zavedené do klinického použití, např. k chloramfenikolu, erytromycinu či tetracyklinům (Kristich *et al.*, 2014). Výskyt kmenů VRE s identifikovanými geny podmiňujícími rezistenci k tetracyklinům či makrolidům potvrzují také výsledky předložené disertační práce. Geny kódující rezistenci k tetracyklinům byly zachyceny u 65 % (47/72) izolátů VRE. Geny kódující rezistenci k makrolidům byly detekovány u 93 % izolátů VRE (67/72). Byla tedy potvrzena přirozená rezistence enterokoků k makrolidům, přítomností genu *ermB* u většiny izolátů. Tyto výsledky odpovídají studii Ahmadpoor *et al.*, z roku 2021, která stanovila že většina jimi studovaných izolátů VRE (73 %) byla rezistentní jak k erytromycinu, tak i k tetracyklinu. Enterokoky jsou přirozeně rezistentní k nízkým hladinám aminoglykosidů. Tomu odpovídá také náš záchyt genů kódující enzymy modifikující aminoglykosidy. Byly zachyceny u 99 % izolátů (71/72).

S výsledky identifikovaných genů kódující rezistenci korelují i zjištěné hodnoty MIC jednotlivých antibiotik. U tetracyklinu bylo v naší práci 61 % kmenů určeno jako rezistentních k tomuto antibiotiku. K erytromycinu, jako zástupci makrolidů, byly rezistentní všechny testované kmeny VRE. Posouzení hodnot MIC aminoglykosidů nebylo možné, jelikož nejsou naší antibiotickou laboratoří testovány.

Následující část diskuze disertační práce se věnuje izolátům VRE zachycených u hospitalizovaných pacientů z Hemato-onkologické kliniky, podrobujících se pravidelným „screeningům“ pro detekci VRE v jejich GIT, v rámci detekce potenciálního nosičství.

Enterokoky, včetně VRE, jsou označovány za bakteriální patogeny zodpovědné za infekce spojené se zdravotní péčí, a to zejména u pacientů s prodlouženou hospitalizací, závažným základním onemocněním nebo předchozí širokospektrou antibiotickou léčbou. Mezi ně lze řadit právě hematoonkologické pacienty (Hricová *et al.*, 2020). Cytostatika používaná při jejich léčbě vedou k výraznému snížení obranyschopnosti těchto pacientů proti infekcím, takže bakteriální infekce mají významný vliv na prognózu pacienta (Kolář *et al.*, 2006 B). Mechanismem získání VRE, u těchto imonokompromovaných pacientů mohou být kontaminované povrchy pokojů a přenos od jiných pacientů, pravděpodobně prostřednictvím prostředníka-kontaminované osoby nebo sdíleného vybavení. Studie např. uvádějí, že kontaminace prostředí, kde přetrvávala VRE pozitivní osoba na pokoji nebo byla potvrzena pozitivní kultivace VRE z povrchů na pokoji společně v kombinaci s vyšším procentem dalších pacientů s VRE kolonizací na oddělení, zvyšují riziko získání VRE (Ford *et al.*, 2016). Výsledky studie Forda a kol. také poukazují na to, že riziko nemocniční gastrointestinální kolonizace VRE bylo přímo úměrné délce hospitalizace. Studie Werber *et al.* dále např. uvádí, že pacienti s kolonizací VRE mají až 24x větší pravděpodobnost vzniku infekce krevního řečiště vyvolanou těmito kmeny (Weber *et al.*, 2019).

Stejně jako u předchozí studované skupiny pacientů z různých oddělení a klinik FNOL a VNOL, jsme i zde, v rámci předložené disertační práce, zjistili vyšší zachyt VRE zejména u starších pacientů. Nejčastěji byly VRE v GIT zachyceny ve věkové skupině 60-69 let (33 %), dále pak 50-59 let (22 %) a 70 let a výše (21 %). V porovnání s našimi výsledky, byl u pacientů s akutní leukemií či febrilní neutropenií ve studii Kirkizlar a kol. průměrný věk pacientů kolonizovaných VRE nižší, a to 47 let (Kirkizlar *et al.*, 2020). Mírně vyšší věkový průměr u hematoonkologických pacientů kolonizovaných VRE v jejich GIT zachycují Gedik a kol., a to 52 let (Gedik *et al.*, 2014).

U citlivosti na antibiotika, nebyl u VRE v GIT významný rozdíl mezi izoláty z předchozí studované skupiny pacientů (klinický materiál od pacientů ze všech klinik a oddělení ve FNOL a VNOL). I zde byla opět zjištěna vysoká citlivost v případě tigecyklinu (99 %) a linezolidu (100 %), nízká hodnota citlivosti u tetracyklinu (34 %) a nulová citlivost k testovaným makrolidům. Vysokou citlivost k linezolidu u testovaných izolátů VRE u hematoonkologických pacientů stanovila také studie Marchi *et al.*, a to 98,8 % (Marchi *et al.*, 2018).

U většiny námi sledovaných hematoonkologických pacientů podrobujících se „screeningu“, se VRE jako první objevil ve výtěru z rektu, což bylo zjištěno pravidelně se konajícími odběry. VRE v tomto klinickém materiálu přetrvával po rozdílná časová období, a to od 2 až po 25 po sobě jdoucích týdnů. U některých hematoonkologických pacientů byly VRE následně zjišťovány i v dalších klinických materiálech. Po výtěru z rektu, byly izoláty VRE v našem případě nejčastěji zjištěny ve výtěru z krku. Z celkem 20 pacientů, u kterých byl VRE v GIT zachycen opakovaně, byl VRE u 11 z nich zjištěn i v dalších materiálech. Nejčastěji v moči, a to u 9 pacientů. Dále poté také ve sputu, BALu či v dutině ústní. Uroinfekci způsobil VRE v 1 případě a lékem volby byl zvolen tigecyklin.

Jak je patrné z výsledků disertační práce je reálná skutečnost, že kolonizace GIT kmenem VRE může být primárním místem pro potenciální šíření do dalších lokalit organismu daného pacienta. Pacient s potvrzeným VRE v GIT se současně stává potenciálním zdrojem VRE pro nozokomiální šíření tohoto agens nemocničním prostředím. Tuto domněnku potvrzuje i studie Jovanović *et al.* tvrzením, že VRE jsou mikroorganismy, které se často vyskytují v nemocnicích a šíří se oro-fekální cestou a dalšími, relativně neprobádanými způsoby týkajícími se nemocničního prostředí (Jovanović *et al.*, 2018).

Genetickou analýzou izolátů VRE od pacientů z HOK podrobujících se „screeningu“ byl zjištěn pouze gen *vanA*, podmiňující rezistenci k vankomycinu. Protikladem jsou výsledky australské studie, kde zjišťují naopak pouze fenotyp VanB u onkologických a hematoonkologických pacientů (Xie *et al.*, 2020). V Austrálii je nicméně tento fenotyp dominantní (Zhou *et al.*, 2020). Faktory virulence byly u skupiny hematoonkologických pacientů, podrobujících se „screeningu“, zachyceny stejné jako

u pacientů nehematoonkologických. Opět byly identifikovány geny *esp* a *hyl*, nicméně zjištěny byly u ještě většího počtu izolátů, a to u 95 % izolátů VRE a častější byl také výskyt kombinace těchto genů. Konkrétně byl gen *esp* identifikován u 82 % izolátů a gen *hyl* u 13 % izolátů. Obdobné hodnoty stanovila v rámci „screeningu“ hematoonkologických pacientů také studie Worth *et al.*. Ti konkrétně zjišťují gen *esp* u 81,5 % izolátů VRE (Worth *et al.*, 2008).

Dalším cílem disertační práce bylo posoudit zjištěnou hodnotu MIC s identifikovanými geny rezistence k vybraným antimikrobiálním látkám. Geny kódující rezistenci k tetracyklinům byly zachyceny u 71 % (55/78) izolátů VRE a posouzením hodnot MIC tetracyklinu byla zjištěna rezistence u 66 % VRE. U erytromycinu, kde byly geny kódující rezistenci k makrolidům detekovány u 92 % izolátů VRE (72/78), odpovídají zjištěné vysoké hodnoty MIC vedoucí k 0% citlivosti k tomuto antibiotiku. Jak již bylo zmíněno, jsou enterokoky přirozeně rezistentní k nízkým hladinám aminoglykosidů. Tomu odpovídá nález VRE u hematoonkologických pacientů. Geny kódující enzymy modifikující aminoglykosidy byly opět zachyceny u 99 % izolátů (77/78). Posouzení hodnot MIC nebylo možné, jelikož aminoglykosidy nejsou naší antibiotickou laboratoří testovány.

Závěrečné posouzení fenotypových projevů a genetických analýz testovaných izolátů VRE hospitalizovaných pacientů s pacienty z HOK podrobujících se pravidelným „screeningům“ za dané časové období poskytlo následující data. Porovnáním výskytu faktorů virulence u těchto studovaných skupin pacientů lze konstatovat, že 25 % izolátů VRE pocházejících od hospitalizovaných pacientů nedisponovalo žádným z faktorů virulence. Také lze říct, že celkově i procentuální záchyt faktorů virulence byl nižší oproti pacientům ze „screeningové“ skupiny pacientů z HOK. Zachyceny u obou skupin byly celkově jen 2 ze 5 testovaných genů, a to *esp* a *hyl*, ať už samostatně či oba geny u jednoho izolátu dohromady. Co se týká genů rezistence k tetracyklinům, makrolidům či genů kódující enzymy modifikující aminoglykosidy nebyl mezi jednotlivými skupinami významný rozdíl.

Dopad infekcí způsobených VRE na úmrtnost zůstává dodnes nejasný. Invazivní infekce VRE se vyskytují především u hostitelů, kteří jsou vážně postiženi zhoršujícím se základním zdravotním stavem. Celkový výsledek zdravotního stavu pacienta je často určen samotným základním onemocněním a infekce VRE může být konečnou událostí u osob s velmi špatnou prognózou (Vehreschild *et al.*, 2019).

#### **4.4.2 VRE u hematoonkologických pacientů**

Problematika VRE u hematoonkologických pacientů byla již částečně popsána v předchozí kapitole diskuze. Je známo, že VRE jsou významnými oportunními patogeny a infekcím způsobenými těmito kmeny často může předcházet gastrointestinální kolonizace. Nejen její problematice u hematoonkologických pacientů je věnována následující část diskuze.

Pacienti (včetně hematoonkologických) jsou považováni za hlavní rezervoár a nosiče kmenů VRE, pocházejících z jejich GIT. V nemocničním prostředí poté může docházet k šíření a přenosu VRE přímým kontaktem s kolonizovanými nebo infikovanými pacienty nebo nepřímým kontaktem prostřednictvím rukou zdravotnických pracovníků nebo kontaminovaného vybavení, jako jsou teploměry, zábradlí, rukavice a povrchy v prostředí (Orsi & Ciorba, 2013). Nemocniční prostředí hraje klíčovou roli při nozokomiálním šíření VRE. Uchycení VRE na naživém povrchu a jejich dlouhodobá perzistence na něm, stejně jako jejich rezistence vůči standardním čisticím postupům, mohou vytvářet rezervoár, ze kterého se mohou tyto patogeny šířit složitými cestami nozokomiální diseminace (Suleyman *et al.*, 2018).

S nozokomiálními infekcemi po celém světě je častěji spojován druh *E. faecium* rezistentní k vankomycinu (VREF) (Arias a Murray, 2012). Studie Moemen *et al.* uvádí, že míra kolonizací a infekcí vyvolaných VREF se v posledních letech neustále zvyšuje, přičemž většina případů je způsobena enterokoky disponujícími *VanA* a *VanB* genotypy, což jsou nejčastěji se vyskytující formy rezistence vůči glykopeptidům (Moemen *et al.*, 2015). Výsledky disertační práce ukazují na přítomnost pouze genu *vanA*, a to u všech testovaných izolátů VRE z GIT hematoonkologických pacientů, přičemž se vždy jednalo o druh *E. faecium*.

Na HOK ve FNOL dlouhodobě probíhá „screening“ u hospitalizovaných pacientů pro detekci VRE v jejich GIT v rámci zjištění jeho potenciálního nosičství. Výsledky disertační práce stanovily za tříleté období studie prevalenci VRE v GIT u hematoonkologických pacientů na 7,3 %. Tato hodnota je nižší, než uvádí např. souhrnná studie, posuzující přes 8000 pacientů s malignitou, která stanovuje kolonizace VRE v GIT na 20 % (Alevizakos *et al.*, 2016). Vyšší hodnotu kolonizace VRE v GIT u hematoonkologických pacientů, a to konkrétně 68 %, uvádí také australská studie (Xie *et al.*, 2020).

Epidemiologická analýza získaných izolátů VRE, od hematoonkologických pacientů z FNOL, během sledovaných tří let, provedená pomocí metody PFGE, rozdělila 69 (67 %) ze 103 izolátů na základě míry podobnosti do 18 skupin. Tyto čítaly 2-12 izolátů, přičemž velmi často se jednalo o klonální skupiny o 2-3 izolátech. Lze tedy říci, že nedošlo k žádnému výraznému propuknutí klonálního šíření VRE, ale byla pozorována opakovaná vzplanutí menšího charakteru. Nicméně zjištění shodných VRE u dvou, popř. tří pacientů, naznačuje jejich šíření mezi pacienty, kteří byli hospitalizováni v témže časovém období. Z výsledků lze tedy určit, že nebyl prokázán jeden nemocniční kmen, který by se v nepozměněném genetickém profilu v objevoval opakovaně během analyzovaných tří let. Zbýlých 34 izolátů VRE (33 %) vykazovalo jedinečný restriční profil.

U identifikovaných VRE od HOK pacientů byly opět zjišťovány vybrané faktory virulence (viz kap 5.1.1), jejichž produkce může napomáhat vzniku infekcí. Výsledky

disertační práce ukazují na přítomnost stejných faktorů virulence jako u nehematoonkologických pacientů. Gen kódující enterokokový povrchový protein (*esp*) byl zjištěn u 84 % izolátů a gen kódující hyaluronidázu (*hyl*) u 40 % izolátů VRE. Zjištěný výskyt genu kódující hyaluronidázu je srovnatelný se studií Jovanović *et al.*, 2018, zabývající se mikrobiotou u hematoonkologických pacientů. Ta uvádí záchyt genu *hyl* u 38 % izolátů VRE, nicméně gen *esp* zjišťuje jejich studie pouze u 30 % izolátů VRE (Jovanović *et al.*, 2018). Oproti tomu studie Marchi *et al.* zjistila 97% záchyt *esp* genu u VRE v případě hematoonkologických pacientů (Marchi *et al.*, 2018).

Výsledky stanovení MIC získaných izolátů VRE od HOK pacientů pro potřeby disertační práce ukazují na vysokou citlivost v případě tigecyklinu (94 %) a linezolidu (100 %) a pouze 1% citlivost k teikoplaninu. Tyto hodnoty jsou srovnatelné s výsledky studie Marchi *et al.*, která udává také 100% citlivost k linezolidu a 0% citlivost k teikoplaninu u testovaných izolátů VRE pocházejících od hematoonkologických pacientů (Marchi *et al.*, 2018).

U hematologických a onkologických pacientů se širokým spektrem onemocnění se míra infekcí způsobených VRE u kolonizovaných pacientů odhaduje na 1,5 %. Naproti tomu hematologičtí/onkologičtí pacienti ve vysoce rizikových situacích, jako je alogenní transplantace, vykazovali mnohem vyšší riziko s celkovou mírou 14 %. Všechny analýzy týkající se této vysoce rizikové populace však pocházejí ze severoamerických nemocnic, kde je míra výskytu VRE tradičně vysoká (Vehreschild *et al.*, 2019).

#### **4.4.3 VRE v komunitě a u hospitalizovaných pacientů (prospektivní studie)**

VRE se rozšířily nečekaně rychle a celosvětově jich neustále přibývá. Nicméně lze rozlišit teoretický původ a epidemiologii VRE v evropských zemích a ve Spojených státech (Ahmed & Baptiste, 2017). V USA, kde výskytu VRE předcházela výskyt *E. faecium* rezistentního k ampicilinu, se kolonizace hospitalizovaných pacientů VRE od prvního záchytu VRE rychle zvyšovala, a to až na současnou endemickou úroveň v mnoha nemocnicích (Rios *et al.*, 2020). V Evropě byly první klinické izoláty VRE zjištěny v roce 1986 a míra prevalence v nemocnicích zůstávala mnohem nižší. Začala se zvyšovat až od roku 2000 (Ahmed & Baptiste, 2017). Počáteční zprávy o VRE v Evropě se týkaly organismů, které byly často izolovány od zdravých lidí, hospodářských zvířat, domácích mazlíčků a potravinářských výrobků v maloobchodě, což naznačuje velký komunitní rezervoár, zatímco v USA takový komunitní rezervoár zřejmě chybí (Arias & Murray, 2012; Freitas *et al.*, 2011).

Tyto epidemiologické rozdíly mezi USA a Evropou pravděpodobně vyplývají z hojného užívání antibiotik v amerických nemocnicích, zejména vankomycinu a cefalosporinů, kde výskytu VRE předcházela výskyt enterokoků rezistentních vůči ampicilinu, což je činilo citlivějšími vůči selektivním účinkům antibiotik (Dubin *et al.*, 2016; Top *et al.*, 2008). V Evropě je původ VRE odlišný. Předpokládá se, že rozsáhlé a rozšířené používání avoparcinu (glykopeptidu podobného vankomycinu, který se v USA

nikdy nepoužíval) v chovech zvířat souviselo s vysokým počtem VRE ve zvířecích výkalech a vzorcích masa, které následně mohly prostřednictvím potravinového řetězce kolonizovat zdravé lidi. To by vysvětlovalo původní rezervoár v komunitě (Torres *et al.*, 2018). Zjištění VRE u hospitalizovaných osob, které předtím nebyly hospitalizovány ani neužívaly antibiotika, tedy naznačuje, že se VRE mohly nakazit prostřednictvím potravinového řetězce (Fisher & Phillips, 2009). Existuje i reálná další možnost přenosu VRE, a to přímým kontaktem s hospodářským zvířetem, které je infikováno nebo kolonizováno VRE. Tento způsob je nicméně vymezen pouze úzké skupině pracovníků v zemědělství a pracovníkům ve veterinární sféře (Kolář, 2018).

Odlišnost izolátů VRE z nemocničním prostředím od izolátů pocházejících z komunitního prostředí potvrzuje také studie Mutters *et al.* z roku 2013. Jako možnost rozlišení nemocničních od komenzálních kmenů uvádí molekulární typizaci kmenů metodami, jako je multilokusová sekvenční typizace (MLST) a multilokusová analýza tandemových repetitiv (MLVA) (Mutters *et al.*, 2013).

Dle studie Hannaoui *et al.* se hodnoty VRE v GIT v evropské komunitě pohybují v rozmezí 5 – 28 % (Hannaoui *et al.*, 2016). Výskyt VRE jako součástí mikrobioty GIT v komunitě ČR je poměrně nízký. Uvádí to data z českých studií z let 2004–2006, konkrétně jsou to hodnoty v rozmezí 0,4 % - 1,6 % (Kolář *et al.*, 2004; Kolář *et al.*, 2005; Kolář *et al.*, 2006 A). Tato data potvrzují i výsledky prospektivní studie pro disertační práci. U osob v komunitě nebyly za sledované období VRE prokázány. Jednalo se ovšem o krátké časové období studie.

V nemocničním prostředí u hospitalizovaných pacientů se prevalence VRE v GIT pohybuje okolo 14 % (Moghimbeigi *et al.*, 2018). Tato hodnota odpovídá i výsledkům předložené disertační práce. Za dané časové období prospektivní studie byla prevalence VRE v GIT stanovena na 13 %. Také studie Arshadi *et al.* stanovuje hodnotu prevalence testovaných VRE v GIT v podobných hodnotách, konkrétně na 15,5 % (Arshadi *et al.*, 2017). Studie Amberpet *et al.* z roku 2016 zjistila prevalenci VRE v GIT u pacientů přijímaných na jednotky intenzivní péče v hodnotě dokonce 27,4 %. V průběhu jejich studie se poté zjistila kolonizace VRE u dalších 5 pacientů a prevalence VRE se tím zvýšila na 29 %. Infekce, jejíž potvrzeným původcem byly VRE, proběhly na jednotce intenzivní péče za dané časové období studie u 5 pacientů. Z nich 4 byly již předtím kolonizovány VRE. Nejčastějšími infekcemi byly infekce močových cest, následované infekcemi v místě chirurgického výkonu (Amberpet *et al.*, 2016).

Studie Jernigan *et al.*, 2020 uvádí, že VRE, karbapenem rezistentní druhy acinetobakterů a MDR *P. aeruginosa* jsou identifikovány téměř výhradně u pacientů s významnou expozicí ve zdravotnictví a zdá se, že jsou zřídka získávány v komunitě. Informaci týkající se VRE v nemocničním prostředí potvrzují i výsledky prospektivní studie zařazené do této disertační práce. I když byla studie pouze desetitýdenní, zachyceny byly VRE pouze v nemocničním prostředí, nikoliv v komunitě. Studie Jernigan

*et al.*, 2020 dále zmiňuje zajímavou příznivou informací, že mezi lety 2012 a 2017 se u hospitalizovaných pacientů snížila incidence infekcí způsobených VRE (Jernigan *et al.*, 2020).

V rámci desetitýdenní prospektivní studie na podzim roku 2019 bylo jedním z cílů disertační práce zjistit prevalenci VRE v GIT v komunitě olomouckého regionu a u hospitalizovaných pacientů ve FNOL a VNOL.

Prospektivní studie pro disertační práci zachytila celkem 13 izolátů VRE. Osm pozitivních izolátů pocházelo z HOK ve FNOL, pět zbývajících z různých oddělení a klinik (dětská klinika, novorozenecké oddělení, interní klinika či onkologie). Zjištěné izoláty v osmi případech pocházeli od žen a v pěti případech od mužů. Věkově byla nejvíce obsažena věková skupina v rozmezí 70-80 let. Ve všech případech byly zachyceny opět druhy *E. faecium*, u kterých genetickými metodami byla potvrzena přítomnost *vanA* genu, kódující rezistenci k vankomycinu. Oproti tomu studie Kolář a kol. z roku 2006 ze stejného pracoviště dokumentuje 78 % zachycených VRE určených jako VanA pozitivní kmeny *E. faecium* a 10 % jako VanB pozitivní *E. faecalis* (Kolář *et al.*, 2006 B).

V patogenitě enterokoků mohou hrát významnou roli faktory virulence. Napomáhají jim v kolonizaci či adhezi a tím mohou navýšit jejich schopnosti ke vzniku infekce. Z testovaných faktorů virulence byly u testované skupiny pacientů v prospektivní studii zachyceny geny kódující hyaluronidázu (*hyl*) a gen pro enterokokový povrchový, buď samostatně či v kombinaci, a to u 11 izolátů VRE. Bez identifikovaného faktoru virulence byly 2 ze 13 izolátů VRE.

Větší část zachycených VRE nemocniční provenience v naší prospektivní studii pocházela z Hemato-onkologické kliniky. Pacienti hospitalizovaní z důvodu onkologického onemocnění, léčení chemoterapeutiky, často v kombinaci se širokospektrými antibiotiky, mají větší náchylnost k osídlení gastrointestinálním traktu VRE (Hricová *et al.*, 2020). Například studie Gedik *et al.* z roku 2014 uvádí kolonizaci VRE u 50 ze 126 (40 %) pacientů s hematologickými malignitami, přičemž u dvou z těchto pacientů se následně rozvinula bakteriémie (Gedik *et al.*, 2014).

Dendrogram, jako výsledek molekulární typizace našich izolátů ukázal, že 4 izoláty VRE, pocházejících od různých pacientů z Hemato-onkologické kliniky za období jednoho měsíce, vykazovaly naprosto stejný restriční profil. Další klonální skupinu tvořila dvojice jiných hematoonkologických pacientů společně s jedním pacientem z interní kliniky, přičemž vzorky byli získány v průběhu 4 dnů. Třetí a poslední klonální skupinu tvořily shodné izoláty VRE od novorozence a onkologického pacienta, získané v rozmezí 1 měsíce od sebe. Zbýlé 4 izoláty VRE pocházeli ze 4 různých oddělení či klinik a vykazovaly jedinečný restriční profil. Můžeme vyjádřit podezření na klonální šíření shodných VRE u 4 pacientů ze stejného oddělení, kteří byli hospitalizováni v témže časovém období. Šíření shodných izolátů mezi různými odděleními a klinikami



nemocnice je možné teoreticky přisoudit přesunům zdravotnického personálu a odolností enterokoků přežívat v nepříznivých podmínkách po delší časové období.

#### 4.4.4 VRE u pacientů hospitalizovaných s onemocněním COVID-19

Pandemie COVID-19 měla za následek příliv velkého počtu kriticky nemocných pacientů do zdravotnických zařízení a zvýšila tak nároky na udržení dlouhodobě zavedených opatření pro kontrolu infekcí, a to včetně prevence infekcí spojených se zdravotní péčí a možného nárůstu nozokomiálních nákaz. Jednou z bakterií, které mohou být hlavní příčinou život ohrožujících infekcí a šířit se zdravotnickými zařízeními mohou být i vankomycin rezistentní enterokoky (Kampmeier *et al.*, 2020).

V rámci předkládané disertační práce byl u hospitalizovaných pacientů s COVID-19 nejčastější záchyt VRE za dobu studie z výtěrů z rekta (32 %), z endosekretů (30 %) a z moče (26 %). Studie Arshadi *et al.* svými výsledky studie u pacientů na JIP shledává močový trakt jako nejdůležitějším zdrojem infekcí VRE. Tato studie udává, že přibližně 77 % VRE bylo izolováno ze vzorků moči pacientů (Arshadi *et al.*, 2017). Výsledky disertační práce udávají záchyt v moči u 26 % pacientů, nicméně, vezmeme-li v úvahu potenciální kontaminaci močového traktu VRE z GIT (30 %), dostáváme se obdobnou, ač stále nižší hodnotu, tedy na 56 %.

Všechny naše izoláty VRE disponovaly genem *vanA*, podmiňující rezistenci k vankomycinu. Z testovaných faktorů virulence byl zachycen pouze jeden, a to gen pro enterokokový povrchový protein – *esp*. Zjištěn byl u 100 % testovaných izolátů. Vysoké procento záchytu genu kódujícího enterokokový povrchový protein (*esp*) u pacientů na jednotkách intenzivní péče uvádí také studie Arshadi *et al.* z roku 2017, a to 90 % (Arshadi *et al.*, 2017). Zachycené geny rezistence a zastoupení zjištěných faktorů virulence odpovídaly výsledkům studií z nekovidových období. Nebyl zřetelný značný rozdíl.

Epidemiologická analýza, provedená pomocí metody PFGE, rozdělila 44 z 50 našich izolátů do 7 klonálních skupin, které čítaly od 3-12 izolátů. Tyto jednotlivé klonální skupiny se vyskytovaly v časových úsecích v řádu týdnů. Nejdéle přetrvávala skupina po dobu 11 týdnů, s celkovým počtem 11 identifikovaných izolátů VRE. PFGE tedy odhalila několik skupin izolátů s identickými profily nebo velmi vysokými koeficienty podobnosti (> 95 %), což naznačuje velmi pravděpodobné klonální šíření a přenos VRE mezi pacienty. Geneticky příbuzné izoláty VRE u pacientů s COVID-19 na jednotce intenzivní péče uvedli také Kampmeier *et al.*. Jejich studie popisuje genetickou příbuznost izolátů VRE zjištěných u pacientů a několika kmenů izolovaných z prostředí, přičemž zdůrazňují možnou povrchovou kontaminaci (Kampmeier *et al.*, 2020). Například výsledky typizace, provedené také pomocí metody PFGE iránské studie Arshadi *et al.* ukázaly na heterogenitu mezi VRE izolovaných z různých zdrojů (klinické vzorky, rektální výtěry, vzorky z prostředí, ošetřující personál) na JIP. Tato skutečnost naznačuje různorodost populací kmenů VRE (Arshadi *et al.*, 2017). Nicméně tato studie není z časového období

epidemie COVID-19 a byla tudíž větší šance dodržovat zavedená opatření pro kontrolu nozokomiálních infekcí. Čemuž výsledky poté odpovídají.

#### 4.5 ANALÝZA VRE U ZVÍŘAT A V POTRAVINÁCH

Jako rezervoár VRE mohou mít velký význam i zvířata, u nichž enterokoky tvoří přirozenou součást mikroflóry střevního traktu a je tedy nutné vzít v úvahu možnost jejich šíření z animální oblasti do lidské komunitní populace (Kolář, 2018). Některé varianty *vanA* genového klastru VRE nesené na transpozonu Tn1546, které kódují rezistenci k vankomycinu, jsou stejné u lidí i zvířat. To znamená, že zvířata, zejména hovězí dobytek, drůbež a prasata, by mohla představovat pro člověka důležitý rezervoár VRE (Ramos *et al.*, 2020), který ovlivňuje veterinární a humánní medicínu, a to buď horizontálním přenosem genů rezistence vůči vankomycinu mezi zvířecími a lidskými adaptovanými enterokoky, nebo klonálním šířením rezistentních kmenů (Wist *et al.*, 2020).

V 90. letech 20. století byl znatelný velký rezervoár VRE v komunitě, který měl značnou souvislost s chovem hospodářských zvířat, u nichž byl používán avoparcin (glykopeptidové ATB) jako růstový stimulant. I z důvodu potenciálního přenosu *van* genů z komunity do nemocničního prostředí, bylo používání tohoto antibiotika v roce 1997 v evropských zemích zakázáno. Výskyt VRE u hospodářských zvířat díky tomu kroku výrazně klesl, i když na některých farmách byla znatelná perzistence (Zhou *et al.*, 2020). Tuto skutečnost potvrzují i data portugalské studie, která zjišťuje, že VRE jsou stále široce rozšířené a jsou izolovány ze zdravých zvířat určených k produkci potravin. Udávají procentuální záchyt VRE u prasat (35,2 %), ovcí (5,4 %) či dobytka (3,4 %) (Ramos *et al.*, 2020). Nižší záchyty uvádějí Wist *et al.*. Ti dokazují VRE u 2 % vzorků skotu (všechny ze skotu patřícího do stejného stáda), u 3 % vzorků prasat a u 16 % vzorků drůbeže (Wist *et al.*, 2020).

První záchyt VRE u zvířat v České republice byl zdokumentován v roce 2000. VRE byly zachyceny u slepic a byly izolovány u 2,5 % vyšetřovaných vzorků. (Kolář *et al.*, 2000). V rozmezí let 2002-2004 bylo poté z farem v olomouckého regionu (ČR) zjištěno 11 VRE z 527 izolátů *Enterococcus sp.* z celkového počtu 1050 odebraných kloakálních výtěrů drůbeže. Prevalence tedy činila 2,1 %. Souběžně byly vyhledávány vzorky také v komunitě. Molekulární typizace nicméně neprokázala spojitost mezi animálními a humánními vzorky (Kolář *et al.*, 2005).

Problematiku potravin živočišného původu jako zdroje VRE, řeší např. práce Lawpidet *et al.*, která porovnávala 50 studií na toto téma. Prevalence VRE v této komoditě uvádí cca 12 % (Lawpidet *et al.*, 2021). Práce udává nejčastější záchyt VRE u potravin pocházejících z vodního prostředí (43,4 %), nicméně autoři sami upozorňují na to, že jejich odhad byl stanoven pouze ze tří zdrojů, což ukazuje na možnou nepřesnost. Hned další nejvyšší uváděná hodnota prevalence VRE je uváděna u drůbežního masa (20,8 %). Tato hodnota prevalence VRE odpovídá i dalším studiím.

Studie Robredo *et al.*, identifikovala VRE u 27,2 % kuřecího masa (Robredo *et al.*, 2000). Nižší záchyt VRE, a to jen u 6 % testovaných vzorků kuřecího masa udává např. rakouská studie (Zarfel *et al.*, 2014).

V České republice byla v roce 2007 provedena studie, jejímž cílem bylo stanovit antibiotickou rezistenci u bakterií izolovaných z potravin živočišného původu. Zjištěny v rámci studie kromě stafylokoků a escherichií byly také enterokoky. Ani jeden z nich ovšem nebyl identifikován jako VRE (Bardoň *et al.*, 2007).

Výsledky této disertační práce ukazují na velice nízký záchyt VRE u zvířat a v potravinách. Z celkového počtu 3020 vzorků (klinické vzorky hospodářských zvířat či různé potraviny živočišného původu), byly za celou dobu trvání naší studie potvrzeny pouze 3 izoláty VRE. Ty pocházely z klinických vzorků hospodářských zvířat, konkrétně se jednalo o kloakální výtěry brojlerů původem z jedné farmy a zachyceny byly při jednom odběru, a to v lednu roku 2019. Výsledky molekulární typizace, provedené pomocí metody PFGE, ukazují na zcela shodný restriční profil získaných izolátů VRE. Ze zjištěných dat lze tedy usuzovat na klonální šíření daného kmene mezi brojlery v rámci jedné farmy.

Většina průzkumů u zvířat určených k produkci potravin uvádí *E. faecium* jako hlavní druh rodu *Enterococcus* vykazující získanou rezistenci k vankomycinu, ve většině případů s genotypem *vanA* (Torres *et al.*, 2018). To potvrzuje i genetická analýza zachycených izolátů VRE v rámci disertační práce. Tyto disponovaly genem *vanA* a současně u nich nebyl prokázán žádný faktor virulence. Co se týká genů rezistence, byl zjištěn gen *ermB*, kódující přirozenou rezistenci k makrolidům, což koreluje i se stanovenou hodnotou MIC u erytromycinu, 4 µg/ml, spadající do rezistentních hodnot. Také zjištěná hodnota tetracyklinu, 16 µg/ml, spadá vysoko nad breakpoint a koreluje s nálezem genů *tetL* a *tetM* u těchto izolátů VRE z drůbeže.

Přetrvávání VRE u zvířat určených k produkci potravin i prostředí farem, a to i roky po vysazení avoparcinu, naznačuje, že koselekce s jinými antimikrobiálními látkami zvyšuje fitness kmenů a nelze vyloučit přítomnost specifických mobilních genetických prvků. Je známo, že např. gen *ermB*, kódující rezistenci k makrolidům, může být přenášen stejným konjugativním plazmidem nesoucí gen *vanA* (Aarestrup *et al.*, 2000 B). Tetracykliny a makrolidy jsou v chovech prasat široce předepisovány ke kontrole respiračních a střevních onemocnění a používání jedné z těchto antimikrobiálních látek může podporovat šíření rezistence vůči antimikrobiálním látkám z různých skupin (Ramos *et al.*, 2020; García-Solache & Rice, 2019). Tuto teorii podporuje také studie Wist *et al.* z roku 2020. Tato studie uvádí, že přetrvávání VRE bez zjevného selekčního tlaku bylo pozorováno již dříve a předpokládá se, že je důsledkem koselekce při terapeutickém používání jiných antimikrobiálních látek, jako jsou makrolidy nebo tetracyklin (Wist *et al.*, 2020).

#### 4.6 ANALÝZA VRE V PROSTŘEDÍ POVRCHOVÝCH A ODPADNÍCH VOD

Výskyt VRE v životním prostředí může souviset, mimo jiné, s přítomností reziduí antibiotik. Hlavním zdrojem znečištění životního prostředí (pitná voda, povrchové vody, podzemní vody, odpadní vody, kaly, půda atd.) antibiotiky je rozsáhlé používání těchto látek v humánní a veterinární medicíně či v akvakultuře nebo zemědělství za účelem prevence nebo léčby infekcí (Kümmerer, 2009). Antibiotika jsou u zvířat a lidí obvykle metabolizována pouze částečně a zbytek se dostává do životního prostředí buď jako celé sloučeniny, nebo jako metabolity ve formě splašků (Zheng *et al.*, 2022). Další možností, jak se antibiotika mohou dostat do životního prostředí, je také jejich nesprávná likvidace či ve formě odpadu z farmaceutického průmyslu (Polianciuc *et al.*, 2020).

Důležité je, že antibiotika v prostředí mohou vyvolat vznik a šíření bakterií rezistentních vůči antibiotikům (ARB) a genů rezistence vůči antibiotikům (ARG), které se mohou šířit na organismy a člověka horizontálním přenosem genů buď přímým kontaktem, nebo prostřednictvím potravního řetězce, což vede k rozsáhlé rezistenci napříč ekosystémy (Zheng *et al.*, 2022).

Místem kde se vytváří vhodné prostředí pro vznik a šíření ARB a ARG mohou být čistírny odpadních vod (ČOV). Na jednom místě se zde setkává velké množství různorodých bakteriálních populací s antibiotiky v metabolizované i nemetabolizované formě, a to vše, v pro ně vhodných růstových podmínkách (Nnadozie & Odume, 2019; Rizzo *et al.*, 2013; Kumar & Pal, 2018). Odpadní vody z čistíren odpadních vod byly uznány jako významné rezervoáry AMR v životním prostředí v důsledku selektivního tlaku vytvářeného antibiotiky, která se dostávají do vody (Kumar & Pal, 2018; Grehs *et al.*, 2021). Jednou z možností jak se poté ARB a ARG mohou šířit je opětovné využívání vyčištěné odpadní vody k zavlažování. Což je praktickým řešením, jak překonat nedostatek vody, ale s touto praxí je spojeno několik zdravotních a environmentálních rizik (Kumar & Pal, 2018).

Na odtoku a přítoku ČOV se jsou často detekovány zástupci antibiotik tříd makrolidů, sulfonamidů, trimetoprimu a chinolonů, následované skupinami tetracyklinových či  $\beta$ -laktamových antibiotik. Důvodem výskytu právě těchto antimikrobních látek je skutečnost, že jsou tato antibiotika nejčastěji předepisovaná a mají stabilní strukturu. V návaznosti na tyto informace studie Wang *et al.* uvádí, že mezi běžně detekované ARG v ČOV jsou řazeny geny podmiňující rezistenci k  $\beta$ -laktamům (*bla<sub>CTXM</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>OXA-A</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *mecA*), k chinolonům (*qnrS*, *qnrC*, *qnrD*), k sulfonamidům (*sul1*, *sul2*, *dhfr1*), k tetracyklinům (*tetA*, *tetB*, *tetE*, *tetG*, *tetH*, *tetS*, *tetT*, *tetX*) či k makrolidům (*ereA*, *ermB*, *ermC*, *erm43*) (Wang *et al.*, 2020). Mezi druhy, které bakterií nejběžněji zjišťovány v odpadních vodách, jsou řazeny fekální a koliformní bakterie, nejčastěji *Escherichia coli*. Nicméně, k těmto bakteriím je nutné přiřadit i výskyt klinicky významných rezistentních bakterií jako jsou např. MRSA, rezistentní

gramnegativní bakterie (zástupci r. *Acinetobacter*, enterobakterií či pseudomonád) nebo také zástupci rodu *Enterococcus* rezistentních na vankomycin (Karkman *et al.*, 2018).

ČOV jsou navrženy především k odstraňování organického znečištění s odstraněním. Výsledky Wang *et al.* ukázaly, že antibiotika nejsou z ČOV odstraňována dostatečně (53-78 %) (Wang *et al.*, 2020).

Enterokoky se všeobecně řadí k bakteriím s vysokou odolností ke vlivům vnějšího prostředí, což všeobecně umožňuje i jejich přežívání ve životním prostředí (Fisher & Phillips, 2009). VRE, které můžeme řadit mezi problematické bakterie, které mohou šířit zdravotnickými zařízeními a jsou hlavními původci nemocničních infekcí, se mohou vyskytovat v odpadních vodách (Rosenberg Goldstein *et al.*, 2014). Jejich přítomnost v odpadních vodách a následné vypouštění do vodních toků a či případné používání kalů v zemědělství může aktivně přispívat k šíření kmenů VRE, rezistentních bakterií a genů rezistence v životním prostředí (Ramos *et al.*, 2020).

Konkrétní výskyt VRE v odpadních vodách potvrzují různé studie. Jako první záchyt VRE v odpadních vodách je zmíněn ve studii Bates *et al.* ve Spojeném království roce 1993 (Bates *et al.*, 1993). Americká studie z roku 2014 detekovala VRE u 27 % (12/44) ze všech odebraných vzorků odpadních vod, přičemž VRE představovaly 3 % z celkového počtu enterokoků (Rosenberg Goldstein *et al.*, 2014). Švédská studie uvádí, že VRE izolovaly z 21 z 35 vzorků nečištěných odpadních vod (60 %) a z 6 z 32 vzorků vyčištěných odpadních vod (19 %), (Iversen *et al.*, 2002). Výsledky předložené disertační práce ukazují na záchyt VRE v odpadních vodách v olomouckém regionu v ČR u 11 % odebraných vzorků (16/144), přičemž se ve všech případech jednalo o *E. faecium*. Nadpoloviční většina identifikovaných izolátů VRE, konkrétně 9 z 16 (56 %) pocházela z přečištěné odpadní vody na výstupu z ČOV.

Poté co je odpadní voda přečištěna v ČOV, odchází do povrchových vod. I do nich se tedy mohou ARB, respektive ARG mohou dostat. Tuto skutečnost potvrzuje i studie Schwartz *et al.* z roku 2003, která zkoumala odpadní, povrchovou a pitnou vodu v rámci jednoho městského systému na přítomnost rezistentních bakterií a genů rezistence. Autoři zjistili gen rezistence *vanA* bez odpovídající detekce bakterií (enterokoků) v biofilmech odebraných z ČOV či z odpadních vod (Schwartz *et al.*, 2003). Záchyt již konkrétních enterokoků rezistentních na vankomycin uvádí studie Iversen *et al.*, která udává záchyt 1 VRE z celkem 37 vzorků povrchových vod (Iversen *et al.*, 2002). Výsledky disertační práce ukazují na záchyt VRE v povrchových vodách (konkrétně řeka Morava), a to ve 2 případech z 36 odebraných vzorků vody.

V rámci disertační práce byl prováděn také odběr odpadních vod přímo v nemocniční čističce odpadních vod FNOL a z vypustných kanálů VNOL. I zde byly izoláty VRE v rámci tříleté studie zachyceny. Záchyty ve FNOL činili 37,5 % z celkového počtu identifikovaných izolátů VRE z odpadních vod. Byly zjištěny celkem 3 izoláty VRE na

vstupu a 3 izoláty VRE na výstupu z nemocniční ČOV. Identifikován byl také jeden izolát VRE (6 %) z odpadních vod ve výpustném kanálu VNOL. Ačkoliv je vankomycin ATB striktně používané pouze v nemocničních provozech, a dá se tedy předpokládat přítomnost VRE právě v těchto odpadních vodách, byly záchyty izolátů VRE zjištěné za dobu studie, nižší nežli záchyty VRE na výstupu z městské ČOV.

Vankomycin rezistentní enterokoky z odpadních a povrchových vod zajištěné pro potřeby disertační práce byly charakterizovány pomocí antibiogramů a potvrzeny přítomností *van* genů. Gen rezistence *vanA* byl identifikován u 17 izolátů VRE (94 %) a u 1 izolátu (6 %) byla potvrzena přítomnost *vanB* genu. Izolát označený WW11, s potvrzeným genem *vanB*, byl jediným zachyceným enterokokem, nesoucí tento gen, a to po celou dobu disertační práce, napříč všemi typy otestovaných vzorků. Podobný poměr v záchytu těchto dvou genů udává i švédská studie Iversen *et al.* identifikovala gen *vanA* (86 %) gen *vanB* (14 %) u izolátů VRE, přičemž tyto pocházely ze tří různých čistíren odpadních vod a získány byly v průběhu 1 roku (Iversen *et al.*, 2002).

U všech identifikovaných VRE z odpadních a povrchových vod byla stanovena citlivost k antibiotikům. Veškeré izoláty VRE v rámci disertační práce vykazovaly 100% rezistenci k ampicilinu, penicilinu a erytromycinu. Izolát WW11 byl navíc citlivý k teikoplaninu, což odpovídá potvrzení přítomnosti genu *vanB*, u kterého je citlivost k teikoplaninu zachována. Odlišné zjištěné hodnoty rezistence ke stejným ATB udává Iversen *et al.*. Hodnotu rezistence k erytromycinu udává tato studie na 67 % a k ampicilinu dokonce jen 38 % (Iversen *et al.*, 2002).

Identifikované faktory virulence u izolátů VRE, v rámci studie pro disertační práci, z odpadních a povrchových vod odpovídaly svým zastoupením izolátům VRE od pacientů z nemocničního prostředí. Opět byly detekovány geny kódující produkci enterokokového povrchového proteinu a hyaluronidázy. Konkrétně byly prokázány geny *esp* (22 %), *hyl* (33 %) a kombinace *esp+hyl* (17 %). U 5 izolátů VRE (28 %) nebyl prokázán žádný faktor virulence. Stejně vybrané faktory virulence testovala i studie Matlou *et al.* z roku 2019. Jimi identifikované faktory virulence jsou v odlišných hodnotách, a to konkrétně *esp* (4,5 %) a *hyl* (6,8 %) (Matlou *et al.*, 2019). Navíc zachycují i geny pro želatinázu (36,4 %) a agregační substanci (27,3 %). V jejich studii byly nicméně zachyceny rezistentní druhy jak *E. faecium*, tak i *E. faecalis*, což by mohlo způsobovat odlišný záchyt faktorů virulence.

Studie Wang *et al.* udává, že velmi často se v odpadních vodách vyskytují geny rezistence k tetracyklinům či k makrolidům (Wang *et al.*, 2020). To potvrzují i výsledky předložené disertační práce. Nejčastěji se u získaných rezistentních enterokoků z odpadních vod a povrchových vod vyskytovala kombinace genů *tet(M)+ erm(B)*. Byla tedy potvrzena přirozená rezistence enterokoků k makrolidům, přítomností genu *ermB*.

V rámci studie pro disertační práci nebyly mezi jednotlivými odběrovými místy nalezeny kmeny se shodným restričním profilem. Pomocí molekulární typizace za použití PFGE bylo zjištěno 18 jedinečných kmenů (16 z odpadních vod a 2 z vod povrchových). Nebyla zjištěna ani podobnost/shodnost u kmenů na stejném odběrovém místě. Jiná česká studie naopak uvádí, že byla zjištěna opakovaně přítomnost shodných vankomycin-rezistentních *E. faecium* s genem *vanA* ve vyčištěné odpadní vodě z městské ČOV (Oravcová *et al.*, 2017). Opakovaná přítomnost shodných izolátů VRE byla pozorována také během čtyř měsíců ve švédských čistírenských kalech, ale ve většině těchto případů se jednalo o *E. faecium* s genem *vanB* (Sahlström *et al.*, 2009).

#### **4.6.1 Korelace záchytu VRE s nálezy reziduí antibiotik v odpadních a povrchových vodách**

Dalším cílem disertační práce bylo posoudit výskyt reziduí vybraných antibiotik v odpadních vodách, vzorcích povrchových vod a určení konkrétních antibiotik překračujících hodnoty PNEC (hodnota, pod níž se uvedený nepříznivý účinek antimikrobiálních látek při expozici s největší pravděpodobností neprojeví), které definovali ve své práci Bengtsson-Palme & Larsson, 2016. Pod touto hodnotou by se uvedený nepříznivý účinek antimikrobiálních látek při expozici ve vodním prostředí s největší pravděpodobností neměl projevit. Ze stejných odběrových míst, kde probíhal odběr vzorků pro mikrobiologickou analýzu za účelem izolace VRE, byly tedy odebrány také vzorky vod a kalů k analýze výskytu reziduí vybraných antibiotik (nitrofurantoin, chloramfenikol, teikoplanin, linezolid, ampicilin, klindamycin, tetracyklin, tigecyklin, vankomycin, erytromycin).

Celkově byly hodnoty PNEC v průběhu studie u všech testovaných antibiotik překročeny u 58 ze 180 vzorků odpadních vod, tj. u 32 % vzorků. Konkrétně u 5 z 10 testovaných antibiotik. Jmenovitě u ampicilinu, klindamycinu, tetracyklinu, tigecyklinu a vankomycinu. Nejčastěji byly hodnoty PNEC překročeny právě u vankomycinu, a to u 16 % testovaných vzorků. Ve všech případech se jednalo o vzorky z nemocničních odpadních vod. Důvodem těchto nadlimitních hodnot právě z těchto odběrových míst je skutečnost, že se vankomycin používá výhradně v nemocniční péči (Dinh *et al.*, 2017; Tran *et al.*, 2019), a proto se zřejmě vyskytl v nadlimitních hodnotách pouze na nemocničních odběrových místech. Konkrétně ve FNOL, je důvodem zjištění takto vysokých koncentrací vankomycinu zřejmě i skutečnost, že do nemocniční čističky odpadních vod přitéká odpadní voda z Hemato-onkologické kliniky FNOL, kde je vankomycin často aplikován u pacientů s infekcemi vyvolanými multirezistentními stafylokoky a kmeny *Enterococcus faecium*. Hodnoty nad limitem PNEC pro vankomycin na dalších odběrových místech odpadních nebo povrchových vod nebyly prokázány.

Výsledky je možné srovnat se studií Rodriguez-Mozaz *et al.*, která zjišťovala hodnotu PNEC u 13 evropských městských čističek vod. Naše studie zachytila rezidua ampicilinu a tetracyklinu, překračující jejich PNEC, pouze v jednotkách vzorků odpadních

a povrchových vod. Stejně tak studie Rodriguez-Mozaz *et al.* potvrzuje záchyt rezidua ampicilinu pouze v 1 z testovaných evropských ČOV a rezidua tetracyklinu u jimi posuzovaných čističek nepřekročili hodnotu PNEC ani v jednom případě. Zatímco rezidua klindamycinu, překračujících hodnotu jeho PNEC naše studie pro disertační práci potvrdila u 22 z 90 vzorků nemocničních odpadních vod, studie Rodriguez-Mozaz *et al.* jej nezachytila ani v jedné z testovaných evropských ČOV (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2020). Rezidua tigecyklinu, která byly zachycena naší studií v nadlimitních hodnotách u 8 ze 180 vzorků odpadních a povrchových vod, nelze srovnávat, jelikož literární údaje o výskytu tigecyklinu ve vodním prostředí nejsou k dispozici.

Studie Rodriguez-Mozaz *et al.* pozorovala evropskou geografickou gradaci záchytu antimikrobních látek ve směru sever-jih, pokud jde o celkové množství antibiotik uvolňovaných do životního prostředí. Mezi sloučeniny s nejvyšším zatížením ve všech zemích byly zařazeny makrolidy a fluorochinolony. Ačkoli se předpokládalo, že zjištěné množství antibiotik uvolněných do životního prostředí bude mít obecně mírný dopad na životní prostředí, antibiotika jako azithromycin a ciprofloxacin mohou do budoucna příležitostně představovat riziko pro životní prostředí a rozvoj rezistence vůči antibiotikům. Proto je nutné monitorování antibiotik v odpadních a povrchových vodách, na základě chemických analytických metod nebo biologických testů. A to zejména pro zlepšení přesnosti hodnocení možných rizik způsobených znečištěním vodních útvarů různými antimikrobními látkami (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2020).

Dalším konkrétním cílem, vzhledem k tématu disertační práce, bylo odhalit potenciální souvislost mezi prevalencí VRE a rezidui vankomycinu v povrchových a odpadních vodách, která by se mohla podílet na selekci VRE. Tomuto tématu je věnována následující část diskuze.

Z významných záchytů z izolátů VRE v odpadních vodách, jich 6 pocházelo ze vzorků z nemocničních odpadních vod (FNOL 1 a FNOL 2) a 9 izolátů VRE bylo identifikováno z odpadních vod na výstupu z městské čističky vod (ČOV 2). Výsledné koncentrace vankomycinu ve vzorcích odpadních vod a vod řeky Moravy, získaných na jednotlivých odběrových místech v průběhu testovaného období byly rozdílné.

Na vstupu do nemocniční ČOV (FNOL 1) byly zachyceny z celkem 18 odběrů odpadních vod pouze 3 izoláty VRE. A ačkoliv byla nadlimitní hodnota PNEC pro vankomycin zjištěna ve 13 odběrových měsících, pouze 2 izoláty VRE pocházeli z měsíců s touto nadlimitní hodnotou. Jeden izolát VRE pak z měsíce s podlimitní hodnotou PNEC.

Na výstupu z nemocniční ČOV (FNOL 2) byly zachyceny opět 3 izoláty VRE, nicméně pouze 1 z nich koreloval s nadlimitní hodnotou PNEC pro vankomycin vyšší než 8000 ng/l. Další dva odlišné izoláty VRE byly zachyceny v měsíci, kdy hodnota PNEC byla podlimitní. V dalších odběrových 12 měsících se zjištěnou hodnotou PNEC nad 8000 ng/l nebyl zachycen žádný izolát VRE.



Ačkoliv se zjištěné hodnoty PNEC pro vankomycin z nemocničních odpadních vod FNOL po celou dobu studie většinou pohybovaly v nadlimitních hodnotách (13x z 18ti odběrů), korelace se záchytem identifikovaných izolátů VRE se zjištěnou hodnotou rezidua vankomycinu v odpadních vodách se nepotvrdila.

Tuto teorii potvrzují i výsledky poskytují data pocházející z odpadních vod na výstupu z městské čističky vod (ČOV 2). Na tomto odběrovém místě naopak nebyla překročena hodnota PNEC pro vankomycin po celou dobu studie ani jednou. Nicméně zde byly nejčastější záchyty izolátů VRE. Z celkových 18 izolátů VRE za celou dobu studie odpadních i povrchových vod, jich zde bylo identifikováno celkem 9. Důvodem častého záchytu na tomto odběrovém místě může být skutečnost, že čističky odpadních vod poskytují vhodné růstové podmínky (teplota, pH, nutriční koncentrace) pro velké množství různorodých bakteriálních populací.

Posouzením uvedených dat lze souhrnně tedy říci, že získané výsledky naší práce neprokázaly přímý vztah mezi vyšší koncentrací vankomycinu v odpadních vodách a výraznější selekcí VRE. Souvislost mezi zvýšenou naměřenou koncentrací vankomycinu (nad hodnotou PNEC) a záchytu VRE tedy nebyla potvrzena. Nicméně je obtížné tento závěr zevšeobecnit, protože zejména soubory VRE izolované z odpadních vod, nejsou velké. Současně lze říci, že městské čističky odpadních vod, kde byly zjištěny podlimitní hodnoty PNEC pro všechna vybraná testovaná antibiotika se stávají ideálním místem k horizontálnímu přenosu genů rezistence a možné selekci bakterií rezistentních vůči antibiotikům.

## 5 ZÁVĚR

Na základě výsledků práce provedené v rámci postgraduálního studia lze stručně definovat následující závěry:

1. Veškeré VRE z humánního klinického materiálu byly vždy identifikovány jako druh *E. faecium*. Rezistence na vankomycin byla potvrzena přítomností genu *vanA*. Nejčastějšími faktory virulence byly u těchto izolátů VRE zjištěny enterokokový povrchový protein (*esp*) a hyaluronidáza (*hyl*).
2. Stanovení MIC získaných izolátů VRE zjistilo vysoké hodnoty rezistence k penicilinu, ampicilinu, erytromycinu i klindamycinu a vysokou citlivost v případě tigecyklinu a linezolidu. V případě testování genů rezistence k tetracyklinům se nejčastěji vyskytovaly geny *tet(M)* a *tet(L)*. Nejčastějšími zjištěnými geny kódujících enzymy modifikující aminoglykosidy byly určeny *aac(6′)-Ie-aph(2′)-Ia* a *aph(3′)-IIIa*. Nejčastěji identifikovaným genem rezistence, potvrzující přirozenou rezistenci enterokoků k makrolidům, byl *erm(B)*. Od hospitalizovaných pacientů ve FNOL a VNOL z let 2018-2020 bylo získáno 150 izolátů VRE. Z toho jich 72 pocházelo od pacientů mimo „screening“ na HOK. Nejčastěji byly VRE identifikovány v moči, u pacientů ve věkové skupině 70-79 let a z oddělení KARIM a interních oddělení. Infekci VRE způsobily u 27 ze 72 pacientů. Zbýlých 78 izolátů pocházelo od hospitalizovaných HOK pacientů podrobujících se pravidelným „screeningům“ pro zjištění VRE v GIT metodou pravidelných odběrů perianálních stěrů. Nejčastěji byly zjištěny ve věkové skupině od 60-69 let. Dalším klinickým materiálem, kde byly VRE často zachyceny byly stěr/výtěr z krku a moč. Infekci VRE způsobil v jednom případě.
3. Od 1405 pacientů HOK pacientů ve FNOL v rámci zavedeného dlouhodobě probíhajícího „screeningu“ bylo za roky 2016-2018 získáno 103 izolátů VRE. Nosičství VRE v GIT u HOK pacientů bylo stanoveno na 7,3 %. Epidemiologická analýza roztřídila tyto izoláty na základě míry podobnosti do 18 skupin, přičemž se velmi často se jednalo o klonální skupiny o 2-3 izolátech. Lze říci, že nedošlo k žádnému výraznému propuknutí klonálního šíření VRE, protože nebyl prokázán jeden nemocniční kmen, který by se v nepozměněném genetickém profilu v objevoval opakovaně během analyzovaných tří let.
4. Z komunity nebyl v průběhu prospektivní studie zjištěn žádný izolát VRE. Zjištěny byly jen u hospitalizovaných pacientů ve FNOL a prevalence VRE byla stanovena na 13 %.
5. Od pacientů s vážným průběhem COVID-19 hospitalizovaných na KARIM ve FNOL bylo na jaře 2021 získáno celkem 50 izolátů VRE, a to nejčastěji z rektu, z endosekretů a z moče. Epidemiologická analýza, rozdělila 44 ze získaných

50 izolátů do 7 klonálních skupin, které čítali od 3-12 izolátů. Jednotlivé klonální skupiny se vyskytovaly v řádu týdnů, což naznačuje velmi pravděpodobné klonální šíření a přenos VRE mezi pacienty.

6. Z celkem 3020 vzorků z potravin živočišného původu a klinického materiálu zvířat zpracovaných za období 3 let byly identifikovány pouze 3 izoláty VRE. Jednalo se o kloakální výtěry brojlerů pocházejících z téže farmy a zachyceny byly při jednom sběru v lednu roku 2019. Pomocí PFGE bylo zjištěno, že se jedná o tentýž kmen. Tento izolát *E. faecium*, disponoval *vanA* genem, neměl žádný faktor virulence a byly u něj identifikovány geny rezistence *tet(L)*, *tet(M)*, *erm(B)*, *aac(6')-aph(2'')* a *aph(3')-IIIa*. Z MIC tohoto izolátu VRE lze stanovit rezistenci k ampicilinu, penicilinu a erytromycinu a vysoká citlivost k tigecyklinu a linezolidu.
7. V období 2018–2020 bylo v terénu zajištěno 180 vzorků odpadních a povrchových vod (z celkem 8 odběrových míst) a 20 vzorků kalu z ČOV. Z nich bylo získáno 21 izolátů VRE (*E. faecium*) a za použití PFGE zjištěno 18 jedinečných kmenů, přičemž 16 pocházelo z odpadních vod a 2 z vod povrchových. Nejčastější záchyty po celou dobu studie byly na výstupu z městské čističky odpadních vod (9), následováno záchytem ze vzorků z nemocničních odpadních vod (6). Nebyly nalezeny kmeny, které by si restriktivním profilem odpovídaly mezi jednotlivými odběrovými místy. Ve vzorcích kalů nebyl VRE zachycen. U 17 izolátů byl detekován gen *vanA* a u jednoho VRE (jako jediného z celé předložené disertační práce) byl identifikován gen *vanB*. Stanovena byla u těchto izolátů rezistence k ampicilinu, penicilinu a erytromycinu a vysoká citlivost v případě tigecyklinu a linezolidu. Nejčastěji se u získaných rezistentních enterokoků z odpadních vod vyskytovala kombinace genů rezistence *tet(M)* + *erm(B)* a kombinace genů *aac(6')-aph(2'')* a *aph(3')-IIIa*.
8. V zajištěných vzorcích odpadních a povrchových vod byly zjišťovány hodnoty PNEC (hodnoty, pod níž se uvedený nepříznivý účinek antimikrobiálních látek při expozici s největší pravděpodobností neprojeví). Hodnoty PNEC byly v průběhu studie u testovaných antibiotik překročeny u 58 ze 180 vzorků odpadních a povrchových vod, tj. u 32 % vzorků, a to konkrétně u ampicilinu, klindamycinu, tetracyklinu, tigecyklinu a vankomycinu. Nejčastěji byly hodnoty PNEC překročeny právě u vankomycinu, a to u 16 % testovaných vzorků, přičemž se vždy jednalo o vzorky z nemocničních odpadních vod.
9. Potenciální souvislost mezi prevalencí VRE a rezidui vankomycinu v povrchových a odpadních vodách, která by se mohla podílet na selekci VRE, nebyla potvrzena.

## 6 SOUHRN

Stoupající rezistence bakterií k antimikrobním přípravkům je celosvětovým problémem. Riziko souvisí se zejména se získanou rezistencí, které představuje vyšší pravděpodobnost selhání antibiotické léčby. Klinickým dopadem poté může být vyšší morbidita a mortalita pacientů, spojená i s vyššími ekonomickými náklady na jejich léčbu. V roce 2001 byl problém bakteriální rezistence dokonce označen Světovou zdravotnickou organizací (WHO) jedním ze tří nebezpečí ohrožujících zdravotnictví 21. století.

Pro vznik rezistentních bakteriálních kmenů je důležitý neustálý selekční tlak používaných antibiotik. Velmi často rezistentní bakterie přetrvávají v prostředí, kde je soustavně používáno více druhů antimikrobních přípravků. Těmi mohou být nemocniční zařízení, ve kterých se pak tyto bakterie mohou stát nozokomiálními patogeny. Mezi hlavní problematické bakterie, které mohou být příčinou život ohrožujících infekcí a šířit se zdravotnickými zařízeními jsou řazeny MRSA, multirezistentní gramnegativní bakterie, *Clostridioides difficile* či VRE. Rezistentní bakterie, včetně VRE, se mohou vyskytovat také jako součástí přirozené flory člověka. Jejich potenciální nebezpečí spočívá v tom, že mohou být zdrojem genů pro další bakterie. Dále mohou být původci endogenních infekcí u oslabených jedinců, či původci exogenních infekcí pro ostatní pacienty.

Možným místem pro vznik rezistentních bakterií jsou také čističky odpadních vod. Výskyt antibiotik v přítomnosti velkého množství různorodých bakteriálních populací a vhodných růstových podmínek (teplota, pH, vysoká nutriční koncentrace atd.), vedou k tomu, že jsou ČOV ideálním místem ke vzniku bakterií rezistentních vůči antibiotikům. Odtud se poté rezistentní bakterie mohou šířit dál do vodního prostředí.

Jedním z cílů předložené disertační práce bylo posouzení výskytu a charakteristika VRE v humánní populaci. Předkládaná disertační práce sledovala výskyt VRE v různých kohortách. Ve všech identifikovaných případech VRE se jednalo o druh *Enterococcus faecium*.

První sledovanou skupinou u humánní populace byly izoláty VRE získávány od pacientů z FNOL a VNOL po dobu 3 let (2018-2020). Bylo identifikováno celkem 150 izolátů VRE. Z různých klinických materiálů od hospitalizovaných pacientů z různých klinik a oddělení ve FNOL a VNOL pocházelo 72 ze 150 izolátů VRE (48 %). Nejčastěji byly identifikovány v moči. Nejpočetnější věková skupina, z které tyto izoláty pocházely, byla 70-79 let. Nejčastěji tyto izoláty pocházely z KARIM a interních oddělení. U 27 z těchto 72 pacientů způsobilo VRE infekci, která byla léčena rezervními antibiotiky (tigecyklin, linezolid). Nejčastěji se jednalo o uroinfekt, a to v 11 případech. Dále pak byly léčeny infekce způsobené VRE v ráně (6 pacientů), v sekretu-drenu (5), v endosekretu (3), v hemokultuře (1) a kanyle (1). Zbýlých 78 izolátů (52 %) byly zachyceno u hematologických pacientů hospitalizovaných na HOK ve FNOL, na níž dlouhodobě

probíhá „screening“ pro detekci VRE v jejich GIT. A to formou odběru perianálního stěru v rámci zjištění potenciálního nosičství VRE. U těchto pacientů byly VRE nejčastěji zachyceny ve věkové skupině od 60-69 let. VRE v těchto pacientů v jejich GIT přetrvávalo po rozdílná časová období, a to od 2 až po 25 po sobě jdoucích týdnů. V jednom případě byl VRE identifikován jako původce uroinfekce, která byla léčena byla tigecyklinem. Genetická analýza 150 izolátů VRE potvrdila přítomnost genu *vanA* u všech izolátů VRE. Faktory virulence byly detekovány pouze 2 z 5, a to geny *esp* a *hyl*. U 25 % izolátů VRE pocházejících od hospitalizovaných pacientů nebyl identifikován žádný z faktorů virulence. Mezi výskytem genů kódujících rezistenci k tetracyklinům, makrolidům a genů kódujících enzymy modifikující aminoglykosidy nebyl významný rozdíl. U obou skupin pacientů byla stanovena vysoká rezistence k penicilinu, ampicilinu, erytromycinu i klindamycinu. Vysoká citlivost byla prokázána v případě tigecyklinu a linezolidu.

Další studovanou skupinou humánní populace byly opět hematologičtí pacienti podléhající „screeningu“ pro detekci nosičství VRE, s přihlédnutím k epidemiologickému pohledu na výskyt VRE. V časovém období 3 let (2016-2018) bylo ze vzorků perianálních stěrů od 1405 pacientů hospitalizovaných na HOK ve FNOL získáno 103 izolátů VRE. Nosičství VRE v GIT u hematologických pacientů bylo tedy stanoveno na 7,3 %. U všech izolovaných VRE byla detekována přítomnost *vanA* genu. Z faktorů virulence byly zjištěny *esp* nebo *hyl*, a to u 93 % izolátů. Opět byl potvrzen výskyt genů kódujících rezistenci k tetracyklinům, makrolidům a genů kódujících enzymy modifikující aminoglykosidy. Hodnoty MIC ukazovaly na 100% rezistenci k penicilinu, ampicilinu, erytromycinu i klindamycinu. Vysoká citlivost byla prokázána v případě tigecyklinu (94 %) a linezolidu (100 %). Epidemiologická analýza získaných izolátů VRE od HOK pacientů z FNOL provedená pomocí metody PFGE, rozdělila 69 ze 103 izolátů na základě míry podobnosti do 18 skupin. Ty čítaly 2-12 izolátů, přičemž často se jednalo o klonální skupiny o 2-3 izolátech. Lze tedy konstatovat, že nedošlo k výraznému propuknutí klonálního šíření VRE, ale byla pozorována opakovaná vzplanutí menšího charakteru. Zjištění shodných VRE u dvou, popř. tří pacientů, naznačuje jejich šíření mezi pacienty, kteří byli hospitalizováni v témže časovém období. Nebyl prokázán jeden nemocniční kmen, který by se v nepozměněném genetickém profilu v objevoval opakovaně během analyzovaných tří let.

Třetí studovanou kohortou pro identifikaci VRE pocházející z humánní populace byly pacienti z komunity v porovnání s hospitalizovanými pacienty ve FNOL. Prospektivní studie z podzimu 2019 pro detekci VRE v GIT u pacientů z komunity a z nemocničního prostředí přinesla potvrzení o výskytu VRE pouze v nemocničním prostředí. Po otestování 500 vzorků perianálních stěrů z komunity a 500 vzorků od pacientů z FNOL, bylo identifikováno celkem 13 izolátů VRE, přičemž všechny pocházely od hospitalizovaných pacientů. V komunitě nebyl zjištěn žádný záchyt VRE. Genetická analýza izolátů VRE přinesla obdobné výsledky jako u předchozích studiích u hospitalizovaných pacientů.

Poslední studovanou skupinou z humánní populace byly pacienti s vážným průběhem COVID-19 hospitalizovaných na KARIM ve FNOL na jaře roku 2021. Od nich bylo získáno celkem 50 izolátů VRE. U všech byl potvrzen *vanA* gen a *esp* gen. Genetická analýza genů rezistence izolátů VRE vykazovala obdobné výsledky jako u předchozích studiích u hospitalizovaných pacientů. Výsledkem epidemiologické analýzy bylo rozdělení 44 ze získaných 50 izolátů do 5 klonálních skupin, čítajících 3-12 izolátů. Nejdéle přetrvávala (téměř 11 týdnů) skupina s celkovým počtem 11 identifikovaných izolátů VRE. Tyto výsledky poukázaly na velmi pravděpodobné klonální šíření a přenos VRE mezi pacienty, způsobené nárůstem počtu kriticky nemocných pacientů v kovidovém období.

Součástí disertační práce bylo posouzení výskytu a charakteristika VRE také v animální populaci. V časovém období 2018–2020 bylo z potravin živočišného původu a klinického materiálu zvířat zpracováno celkem 3020 vzorků. Za celou dobu trvání studie byly potvrzeny pouze 3 izoláty VRE. Tyto byly zachyceny z kloakálních výtěrů brojlerů pocházejících z jedné farmy a zachyceny byly při jediném sběru v lednu 2019. Analýzou zachycených izolátů pomocí PFGE bylo zjištěno, že se jedná o tentýž kmen, který se šířil daným prostředím farmy. Byl u něj detekován *vanA* gen a nedisponoval žádným faktorem virulence.

Poslední částí disertační práce bylo posouzení výskytu a charakteristika VRE v prostředí povrchových a odpadních vod. Za časové období let 2018–2020 bylo v terénu zajištěno 200 vzorků povrchových i odpadních vod a kalů, z kterých byly identifikováno 21 izolátů VRE. Pomocí molekulární typizace za použití PFGE bylo zjištěno 18 jedinečných kmenů, přičemž 16 pocházelo z odpadních vod a 2 z vod povrchových. Nejčastější záchyty byly na výstupu z městské čističky odpadních vod. U 17 izolátů VRE prokázán *vanA* gen a u 1 izolátu *vanB* gen (jako jediný záchyt po celou dobu studií na disertační práci). Z faktorů virulence byly detekovány geny *esp* a *hyl*. V rámci disertační práce nebyly nalezeny kmeny, které by si restriktivním profilem odpovídaly mezi jednotlivými odběrovými místy. Nebyla zjištěna ani podobnost/shodnost v kmenech na stejném odběrovém místě.

Mezi dalšími cíli disertační práce bylo posouzení výskytu reziduí vybraných antibiotik v odpadních vodách, vzorcích povrchových vod a určení konkrétních antibiotik překračujících hodnoty PNEC stanovené autory Bengtsson-Palme & Larsson, 2016. Pod touto hodnotou by se uvedený nepříznivý účinek antimikrobiálních látek při expozici ve vodním prostředí s největší pravděpodobností neměl projevit. Celkově byly hodnoty PNEC v průběhu studie u všech testovaných antibiotik překročeny u 58 ze 180 vzorků odpadních vod, tj. u 32 % vzorků. Konkrétně u 5 z 10 testovaných antibiotik (ampicilin, klindamycin, tetracyklin, tigecyklin a vankomycin). Nejčastěji byly hodnoty PNEC překročeny právě u vankomycinu, a to u 16 % testovaných vzorků.

Závěrečným cílem předložené disertační práce bylo i odhalit potenciální souvislost mezi prevalencí VRE a rezidui vankomycinu v povrchových a odpadních vodách, která by se mohla podílet na selekci VRE. Z celkem 18 záchytů izolátů VRE v odpadních vodách, jich 6 pocházelo ze vzorků z nemocničních odpadních vod (FNOL 1 a FNOL 2) a 9 VRE bylo identifikováno z odpadních vod na výstupu z městské čističky vod (ČOV 2). Koncentrace vankomycinu ve vzorcích odpadních vod, získaných na jednotlivých odběrových místech v průběhu testovaného období byly značně rozdílné. Korelace mezi zjištěnou koncentrací vankomycinu (nad hodnotou PNEC) a záchytem konkrétního izolátu nebyla v této práci potvrzena.

## 7 SUMMARY

The increasing resistance of bacteria to antimicrobial drugs is a global problem. The risk is mainly related to acquired resistance, representing a higher probability of antibiotic treatment failure. In addition, the clinical impact may be higher morbidity and mortality of patients, associated with higher economic costs of their treatment. In 2001, the problem of bacterial resistance was even identified by the World Health Organization as one of the three health threats of the 21st century.

The constant selection pressure of the antibiotics used is vital for the emergence of resistant bacterial strains. Very often, resistant bacteria persist in environments where multiple antimicrobial agents are used consistently. These can be hospital settings where these bacteria can then become nosocomial pathogens. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, multidrug-resistant Gram-negative bacteria, *Clostridioides difficile* and vancomycin-resistant enterococci (VRE) are among the main problematic bacteria that can cause life-threatening infections and spread through healthcare facilities. Resistant bacteria, including VRE, can also occur as part of the natural flora of humans. Their potential danger is that they may be a source of genes for other bacteria. Furthermore, they can cause endogenous infections in weakened individuals or exogenous infections in other patients.

Wastewater treatment plants (WWTPs) are also potential sites for resistant bacteria. The presence of antibiotics in the presence of many diverse bacterial populations and suitable growth conditions (temperature, pH, high nutrient concentrations, etc.) make WWTPs ideal sites for the emergence of antibiotic-resistant bacteria. From there, resistant bacteria can spread further into the aquatic environment.

One of the aims of the present dissertation was to assess the prevalence and characteristics of VRE in the human population. Therefore, the prevalence of VRE was investigated in different cohorts. In all identified VRE cases, the species involved was *Enterococcus faecium*.

In the first study group in the human population, VRE isolates were obtained from University Hospital Olomouc (FNOL) and Military Hospital Olomouc (VNOL) patients over three years (2018-2020). A total of 150 VRE isolates were identified. Of those, 72 (48 %) were obtained from different clinical materials collected from patients staying in various FNOL and VNOL departments. They were predominantly identified in urine. The largest age group from which these isolates came was 70-79 years. Most often, these isolates came from anaesthesiology and intensive medicine and internal medicine departments. In 27 of these 72 patients, VRE caused infections that were treated with reserve antibiotics (tigecycline, linezolid). Urinary tract infection was the most common cause, responsible for 11 cases. Further, infections caused by VRE in the wound (six patients), secretion or drain (five), endotracheal aspirate (three), blood



culture and cannula (one each) were treated. The remaining 78 isolates (52 %) were recovered from haemato-oncology patients admitted to the Department of Haemato-oncology (HOK), which has a long-term screening programme for VRE in the gastrointestinal tract (GIT). To detect potential VRE carriage, perianal swabs are used. In these patients, VRE were most commonly detected in the age group of 60-69 years.

VRE persisted in the GIT of these patients for varying periods, ranging from two to 25 consecutive weeks. In one case, VRE was identified as the causative agent of the urinary tract infection, which was treated with tigecycline. Genetic analysis of 150 VRE isolates confirmed the presence of the *vanA* gene in all VRE isolates. Only two of the five virulence factors were detected, namely the *esp* and *hyl* genes. None of the virulence factors was identified in 25 % of the VRE isolates from hospitalised patients. There was no significant difference between the occurrence of genes encoding resistance to tetracyclines and macrolides and genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes. Both groups of patients showed high resistance to penicillin, ampicillin, erythromycin and clindamycin. High susceptibility was demonstrated for tigecycline and linezolid.

Another human population studied was, once again, haemato-oncology patients subjected to screening for VRE carriage, taking into account the epidemiological perspective of VRE incidence. Over a period of three years (2016-2018), 103 VRE isolates were obtained from perianal swab samples taken from 1405 patients admitted to the HOK. Thus, the carriage of VRE in the GIT of haemato-oncology patients was determined to be 7,3 %. The presence of the *vanA* gene was detected in all isolated VRE. As for virulence factors, *esp* or *hyl* were detected in 93 % of isolates. The presence of genes encoding resistance to tetracyclines and macrolides and genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes was confirmed again. Minimum inhibitory concentration values indicated 100 % resistance to penicillin, ampicillin, erythromycin and clindamycin. High susceptibility was demonstrated for tigecycline (94 %) and linezolid (100 %). Epidemiological analysis of VRE isolates obtained from HOK patients, performed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), classified 69 out of 103 isolates into 18 groups based on the degree of similarity. These consisted of two to 12 isolates, often clonal groups of two or three isolates. Thus, it can be concluded that there was no significant outbreak of clonal spread of VRE, but repeated minor outbreaks were observed. The finding of identical VRE in two or three patients suggests their spread among hospitalised patients during the same period. No hospital-acquired strain with an unchanged genetic profile was found to recur over the three years analysed.

The third study cohort for identification of VRE originating from the human population comprised patients from the community compared with FNOL inpatients. A prospective study in autumn 2019 to detect VRE in the GIT of community and hospital patients only confirmed VRE in the hospital setting. After testing 500 perianal swab samples from the community and another 500 from FNOL patients, 13 VRE isolates were

identified, all from hospitalised patients. There was no detection of VRE in the community. Genetic analysis of the VRE isolates yielded results similar to previous studies in hospitalised patients.

The last study group from the human population included patients with a severe course of COVID-19 staying at the FNOL Department of Anaesthesiology, Resuscitation and Intensive Medicine in spring 2021. A total of 50 VRE isolates were obtained from them. The *vanA* and *esp* genes were confirmed in all of them. Genetic analysis of the resistance genes of the VRE isolates showed results similar to previous studies in hospitalised patients. The epidemiological analysis classified 44 of the 50 isolates into five clonal groups of three to 12 isolates. A group with 11 identified VRE isolates persisted the longest (almost 11 weeks). These results indicated a likely clonal spread and transmission of VRE among patients caused by the increase in critically ill patients during the COVID-19 period.

One part of the dissertation was assessing the prevalence and characterisation of VRE also in the animal population. A total of 3020 samples from foods of animal origin and clinical material of animals were processed in 2018-2020. Over the entire period, only three VRE isolates were identified. These were obtained from cloacal swabs of broilers from a single farm during a single collection in January 2019. A PFGE analysis of the isolates revealed that they were the same strain spreading in the farm environment. The *vanA* gene was detected, but no virulence factor.

The last part of the dissertation was concerned with VRE in surface water and wastewater. Over a period of 2018-2020, 200 surface water, wastewater and sludge samples were collected, in which 21 VRE isolates were identified. Using PFGE molecular typing, 18 unique strains were identified, 16 from wastewater and two from surface water. Most frequently, the samples were from the outfall of a municipal WWTP. The *vanA* gene was found in 17 VRE isolates and the *vanB* gene in one isolate (the only case throughout the dissertation studies). As for virulence factors, the *esp* and *hyl* genes were detected. During the period, no strains from different sampling sites were found to have identical restriction profiles. Additionally, no strains from the same sampling site were identical or similar.

Other aims of the dissertation were to assess the occurrence of residues of selected antibiotics in wastewater and surface water samples and to identify specific antibiotics exceeding the predicted no-effect concentration (PNEC) values set by Bengtsson-Palme & Larsson in 2016. Below these values, the above-mentioned adverse effects of antimicrobials are unlikely to occur during exposure in the aquatic environment. Overall, the PNEC values for all antibiotics tested were exceeded in 58 out of 180 (32 %) wastewater samples during the study, specifically for 5 of the 10 antibiotics tested (ampicillin, clindamycin, tetracycline, tigecycline and vancomycin). Most frequently, the PNEC values were exceeded for vancomycin (16 %).

Finally, the dissertation aimed to reveal a potential association between the prevalence of VRE and vancomycin residues in surface water and wastewater, which could be involved in the selection of VRE. Of the 18 VRE isolates detected in wastewater, six were from hospital wastewater samples and nine were from wastewater at the outfall of a municipal WWTP. However, the concentrations of vancomycin in the wastewater samples obtained at different sampling sites during the study period varied considerably. Therefore, this study failed to confirm the correlation between measured vancomycin concentrations (above the PNEC) and identification of a particular isolate.

## 8 POUŽITÁ LITERATURA

1. Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000 A; 37(2), 127-137.
2. Aarestrup FM. Characterization of glycopeptide-resistant enterococcus faecium (GRE) from broilers and pigs in Denmark: genetic evidence that persistence of GRE in pig herds is associated with coselection by resistance to macrolides. *J Clin Microbiol*. 2000 B; 38(7), 2774-7.
3. Ahmadpoor N, Ahmadrajabi R, Esfahani S, Hojabri Z, Moshafi MH, Saffari F. High-Level Resistance to Erythromycin and Tetracycline and Dissemination of Resistance Determinants among Clinical Enterococci in Iran. *Med Princ Pract*. 2021; 30(3), 272-276.
4. Ahmed MO, Baptiste KE. Vancomycin-resistant enterococci: a review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health. *Microb Drug Resist*. 2017; 24 (5), 590-606.
5. Alevizakos M, Gaitanidis A, Nasioudis D, Tori K, Flokas ME, Mylonakis E. Colonization with vancomycin-resistant enterococci and risk for bloodstream infection among patients with malignancy: a systematic review and meta-analysis. *Open Forum Infect Dis*. 2016; 4 (1), 246.
6. Amberpet R, Sistla S, Parija SC, Thabah MM. Screening for intestinal colonization with vancomycin resistant enterococci and associated risk factors among patients admitted to an adult intensive care unit of a large teaching hospital. *J Clin Diagn Res*. 2016; 10 (9), DC06-DC09.
7. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980; 289 (1036), 321-331.
8. Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2012; 10 (4), 266-278.
9. Arshadi M, Douraghi M, Shokoohizadeh L, Moosavian SM, Pourmand MR. High prevalence of diverse vancomycin resistance *Enterococcus faecium* isolates in clinical and environmental sources in ICU wards in southwest of Iran. *Microb Pathog*. 2017; 111, 212-217.
10. Asgin N, Otlu B. Antibiotic resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary care hospital in Turkey. *Infect Drug Resist*. 2020; 13, 191-198.
11. Ballo O, Tarazzit I, Stratmann J, Reinheimer C, Hogardt M, Wichelhaus TA, Kempf V, Serve H, Finkelmeier F, Brandts C. Colonization with multidrug resistant organisms determines the clinical course of patients with acute myeloid leukemia undergoing intensive induction chemotherapy. *PLoS ONE*. 2019; 14 (1), e0210991.

12. Bardoň J, Kolář M, Schlegelová J, Vágnerová I, Koukalová D, Petrželová J. Rezistence vůči antimikrobiálním látkám u kmenů *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp. a *Enterococcus* spp. izolovaných z potravin živočišného původu. *Veterinářství*. 2007; 57, 260 - 263.
13. Bates J, Jordens Z, Selkon JB. Evidence for an animal origin of vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*. 1993; 342 (8869), 490-491.
14. Ben Braïek O, Smaoui S. Enterococci: Between emerging pathogens and potential probiotics. *Biomed Res Int*. 2019; 2019, 5938210.
15. Bengtsson-Palme J, Larsson DG. Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environ Int*. 2016; 86, 140-9.
16. Biswas PP, Dey S, Sen A, Adhikari L. Molecular characterization of virulence genes in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive enterococci. *J Glob Infect Dis*. 2016; 8 (1), 16-24.
17. Briales A, Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Díaz de Alba P, Domínguez-Herrera J, Pachón J, Pascual A. In vitro effect of qnrA1, qnrB1, and qnrS1 genes on fluoroquinolone activity against isogenic *Escherichia coli* isolates with mutations in *gyrA* and *parC*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55 (3), 1266-1269.
18. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39 (6), 1211-1233.
19. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54 (3), 969-976.
20. Bush K. Alarming  $\beta$ -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Curr Opin Microbiol*. 2010; 13 (5), 558-64.
21. Castanon JI. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult Sci*. 2007; 86 (11), 2466-2471.
22. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis*. 2006 1; 42 Suppl 1, 25-34.
23. Dinh Q, Moreau-Guigon E, Labadie P, Alliot F, Teil MJ, Blanchard M, Eurin J, Chevreuil M. Fate of antibiotics from hospital and domestic sources in a sewage network. *Sci Total Environ*. 2017; 575, 758-766.
24. Dongyou, L. Molecular detection of human bacterial pathogens. CRC Press, Boca Raton. 2011
25. Du D, Wang Z, James NR, James NR, Voss JE, Klimont E, Ohene-Agyei T, Venter H, Chiu W, Luisi BF. Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature*. 2014; 509 (7501), 512-515.
26. Dubin K, Pamer EG. Enterococci and Their Interactions with the Intestinal Microbiome. *Microbiol Spectr*. 2014; 5(6), 10.

27. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol*. 1995; 33 (1), 24-27. Erratum in: *J Clin Microbiol* 1995; 33 (5), 1434.
28. EARS-NET (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/ears-net>
29. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4> (2022 05 03)
30. ECDC 2 (European Centre for Disease Prevention and Control) European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2017. Available online: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/EARS-Net-report-2017-update-jan-2019.pdf> (2019 08 06)
31. El-Kersh TA, Marie MA, Al-Sheikh YA, Al-Agamy MH, Al Bloushy AA. Prevalence and risk factors of early fecal carriage of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus* spp. and their antimicrobial resistant patterns among healthy neonates born in a hospital setting in central Saudi Arabia. *Saudi Med. J.* 2016; 37, 280–287.
32. Elsner HA, Sobottka I, Mack D, Claussen M, Laufs R, Wirth R. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000; 19 (1), 39-42.
33. EUCAST The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. <http://www.eucast.org>
34. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology.* 2009; 155 (6), 1749-1757.
35. Ford CD, Lopansri BK, Gazdik MA, Webb B, Snow GL, Hoda D, Adams B. Petersen FB. Room contamination, patient colonization pressure, and the risk of vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization on a unit dedicated to the treatment of hematologic malignancies and hematopoietic stem cell transplantation. *Am. J. Infect. Control.* 2016; 44, 1110–1115.
36. Freitas AR, Coque TM, Novais C, Hammerum AM, Lester CH, Zervos MJ, Donabedian S, Jensen LB, Francia MV, Baquero F *et al.* Human and swine hosts share vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* CC17 and CC5 and *Enterococcus faecalis* CC2 clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49, 925–931.
37. Galloway-Peña JR, Nallapareddy SR, Arias CA, Eliopoulos GM, Murray BE. Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. *J Infect Dis.* 2009; 200 (10), 1566-1573.

38. García-Solache M, Rice LB. The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. *Clin Microbiol Rev.* 2019; 32 (2), e00058-18.
39. Gedik H, Yildirmak T, Simşek F, *et al.* Vancomycin-resistant enterococci colonization and bacteremia in patients with hematological malignancies. *J Infect Dev Ctries.* 2014; 8(9), 1113-1118.
40. Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilionis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas).* 2011; 47 (3), 137-146.
41. Gozalan A, Coskun-Ari FF, Ozdem B, Unaldi O, Celikbilek N, Kirca F, Aydogan S, Muderris T, Guven T, Acikgoz ZC, Durmaz R. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains isolated from carriage and clinical samples in a tertiary hospital, Turkey. *J Med Microbiol.* 2015; 64(7), 759-766.
42. Grehs BWN, Linton MAO, Clasen B, de Oliveira Silveira A, Carissimi E. Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: understanding the problem and future perspectives. *Arch Microbiol.* 2021; 203(3), 1009-1020.
43. Haghi F, Lohrasbi V, Zeighami H. High incidence of virulence determinants, aminoglycoside and vancomycin resistance in enterococci isolated from hospitalized patients in Northwest Iran. *BMC Infect Dis.* 2019; 19 (1), 744.
44. Hannaoui I, Barguigua A, Serray B, El Mdaghri N, Timinouni M, Ait Chaoui A, El Azhari M. Intestinal carriage of vancomycin-resistant enterococci in a community setting in Casablanca, Morocco. *J Glob Antimicrob Resist.* 2016; 6, 84-87.
45. Hassoun-Kheir N, Stabholz Y, Kreft JU, de la Cruz R, Romalde JL, Nesme J, Sørensen SJ, Smets BF, Graham D, Paul M. Comparison of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes abundance in hospital and community wastewater: A systematic review. *Sci Total Environ.* 2020; 743, 140804.
46. Hochvaldová L, Večeřová R, Kolář M, Pucek R, Kvítek L, Lapčík L, Panáček A. Antibacterial nanomaterials: Upcoming hope to overcome antibiotic resistance crisis. *Nanotechnology Reviews.* 2022; 11, 1115-1142.
47. Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence.* 2012; 3 (5), 421-433.
48. Horníková H. Epidemiologie bakteriální rezistence, příčiny a mechanismy vzniku, praktický dopad. *Farmakoterapie.* 2011; 7, 3-6.
49. Hrabák J, Walková R, Žemličková H, Bergerová T, Urbášková P. Detekce karbapenemáz u enterobakterií pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (MS), fenotypových inhibičních testů a molekulárně-mikrobiologickými technikami. *Zprávy EM (SZÚ, Praha).* 2012; 21 (4), 148–156.
50. Hricová K, Kolář M. Efluxní pumpy bakterií-role v rezistenci na antibiotika a jejich možné inhibitory. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2014; 20 (4), 116–120.

51. Hricová K, Röderová M, Fryčák P, Pauk V, Kurka O, Mezerová K, Štosová T, Bardoň J, Milde D, Kučová P, Kolář M. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci and antimicrobial residues in wastewater and surface water. *Life (Basel)*. 2021; 11 (12), 1403.
52. Hricová K, Röderová M, Pudová V, Hanulík V, Halová D, Julínková P, Dolejská M, Papoušek I, Bardoň J. Quinolone-resistant *Escherichia coli* in poultry farming. *Cent Eur J Public Health*. 2017; 25 (2), 163-167.
53. Hricová K, Štosová T, Kučová P, Fišerová K, Bardoň J, Kolář M. Analysis of vancomycin-resistant enterococci in hemato-oncological patients. *Antibiotics (Basel)*. 2020; 9 (11), 785.
54. Htoutou-Sedláková M, Hanulík V, Chromá M, Hricová K, Šenkyříková M, Kolář M. Resistance enterobakterií ke karbapenemům. *Klin Mikrobiol Infekc Lek*. 2011; 17 (1), 12-18.
55. Iversen A, Kühn I, Franklin A, Möllby R. High prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Swedish sewage. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68 (6), 2838-2842.
56. Jana S, Deb JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006; 70 (2), 140-150.
57. Jernigan JA, Hatfield KM, Wolford H, Nelson RE, Olubajo B, Reddy SC, McCarthy N, Paul P, McDonald LC, Kallen A, Fiore A, Craig M, Baggs J. Multidrug-Resistant Bacterial Infections in U.S. Hospitalized Patients, 2012-2017. *N Engl J Med*. 2020; 382(14), 1309-1319.
58. Jovanović M, Tošić T, Jovanović S, Stošović R, Stevanović G, Velebit B, Zervos MJ. Presence of the *esp* gene in *Enterococcus faecium* derived from oropharyngeal microbiota of haematology patients. *Arch Oral Biol*. 2018; 88, 54-59.
59. Kampmeier S, Tönnies H, Correa-Martinez CL, Mellmann A, Schwierzeck V. A nosocomial cluster of vancomycin resistant enterococci among COVID-19 patients in an intensive care unit. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2020; 9(1), 154.
60. Karkman A, Do TT, Walsh F, Virta MPJ. Antibiotic-resistance genes in waste water. *Trends Microbiol*. 2018; 26 (3), 220-228.
61. Kirkizlar TA, Akalin H, Kirkizlar O, Ozkalemkas F, Ozkocaman V, Kazak E, Ozakin C, Bulbul EN, Ozboz ES, Ali R. Vancomycin-resistant enterococci infection and predisposing factors for infection and mortality in patients with acute leukaemia and febrile neutropenia. *Leuk Res*. 2020; 99, 106463.
62. Kolář M, Bardoň J, Vágnerová I, Hájek V, Bzdil J, Kohnová I, Typovská H. Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in hens in the central region of Moravia. *Vet Med*. 2000; 45, 93-97.
63. Kolář M, Urbánek K, Látal T. Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2001; 17 (5), 357-63.



64. Kolář M, Látal T, Čermák P. Klinicko-mikrobiologické podklady racionální antibiotické léčby. Trios, Praha. 2002.
65. Kolář M, Čekanová L, Vágnerová I, Kesselová M, Sauer P, Koukalová D, Hejnar P. Molecular-biological analysis of vancomycin-resistant enterococci isolated from a community in the Czech Republic. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2004; 148 (2), 167-169.
66. Kolář M, Pantůček R, Bardoň J, Čekanová L, Kesselová M, Sauer P, Vágnerová I, Koukalová D. Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in humans and animals in the Czech Republic between 2002 and 2004. *J Med Microbiol.* 2005; 54 (10), 965-967.
67. Kolář M, Pantůček R, Vágnerová I, Sauer P, Kesselová M, Čekanová L, Koukalová D, Doškař J, Růžičková V. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the community in the Czech Republic. *New Microbiol.* 2006 A; 29 (2), 121-125.
68. Kolář M, Pantůček R, Vágnerová I, Kesselová M, Sauer P, Matoušková I, Doškař J, Koukalová D, Hejnar P. Genotypic characterisation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from haemato-oncological patients at Olomouc University Hospital, Czech Republic. *Clin Microbiol Infect.* 2006 B; 12(4), 353-60.
69. Kolář M. Možnosti řešení problému rezistence bakterií k antibiotikům. *Farmakoterapie.* 2011; 7, 20-32.
70. Kolář M. Problematika vankomycin-rezistentních enterokoků. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2018; 24 (2), 50-56.
71. Kolář M. Zásady antibiotické léčby. *Rozhl Chir.* 2019; 98, 137-144.
72. Kolář M, Rejman D, Bardoň J. Zásady antibiotické léčby. Univerzita Palackého v Olomouci. 2020.
73. Koluman A, Akan L, Cakiroglu F. Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail food. *Food Control.* 2009; 20, 281-283.
74. Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal Infection-Treatment and Antibiotic Resistance. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar, N. *et al.* Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection. Massachusetts Eye and Ear Infirmary. 2014.
75. Kučová P, Sedláková Htoutou M, Fišerová K, Hricová K, Kolář M. Enterokokové infekce a možnosti jejich léčby. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2021; 27 (1), 4-12.
76. Kumar A & Pal D. Antibiotic resistance and wastewater: Correlation, impact and critical human health challenges. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2018; 6, 52-58.
77. Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. *Chemosphere* 2009; 75 (4), 417-434.

78. Landers TF, Cohen B, Wittum TE, Larson EL. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Rep.* 2012; 127 (1), 4-22.
79. Lawpidet P, Tengjaroenkul B, Saksangawong C, Sukon P. Global prevalence of vancomycin-resistant enterococci in food of animal origin: a meta-analysis. *Foodborne Pathog Dis.* 2021; 18 (6), 405-412.
80. Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28 (2), 337-418.
81. Lochmannová J, Kolář M, Urbánek K, Koukalová D. Antibiotická léčba bakteriálních infekcí z pohledu klinika, mikrobiologa a farmakologa. *Med Pro Praxi* 2004; 1, 15-18.
82. Majiduddin FK, Materon IC, Palzkill TG. Molecular analysis of  $\beta$ -lactamase structure and function. *International Journal of Medical Microbiology.* 2002; 292 (2), 127–137.
83. Malhotra-Kumar S, Lammens C, Piessens J, Goossens H. Multiplex PCR for simultaneous detection of macrolide and tetracycline resistance determinants in streptococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49 (11), 4798-4800.
84. Mallon DJ, Corkill JE, Hazel SM, Wilson JS, French NP, Bennett M, Hart CA. Excretion of vancomycin-resistant enterococci by wild mammals. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8 (6), 636-638.
85. Marchi AP, Perdigão Neto LV, Martins RCR, *et al.* Vancomycin-resistant enterococci isolates colonizing and infecting haematology patients: clonality, and virulence and resistance profile. *J Hosp Infect.* 2018; 99(3), 346-355.
86. Matlou DP, Bissong MEA, Tchatchouang CK, Adem MR, Foka FET, Kumar A, Ateba CN. Virulence profiles of vancomycin-resistant enterococci isolated from surface and ground water utilized by humans in the North West Province, South Africa: a public health perspective. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019; 26(15), 15105-15114.
87. Moemen D, Tawfeek D, Badawy W. Healthcare-associated vancomycin resistant *Enterococcus faecium* infections in the Mansoura University Hospitals intensive care units, Egypt. *Braz J Microbiol.* 2015; 46 (3), 777-783.
88. Moghimbeigi A, Moghimbeygi M, Dousti M, Kiani F, Sayehmiri F, Sadeghifard N, Nazari, A. Prevalence of vancomycin resistance among isolates of enterococci in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Adolesc Health Med Ther.* 2018; 9, 177-188.
89. Moore B, Perry C, Chard S. A Survey by the sewage swab method of latent enteric infection in an urban area. *Journal of Hygiene.* 1952; 50 (2), 137-156.
90. Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13 (4), 513-522.

91. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr.* 2016; 4 (2), 10.1128
92. Mutters NT, Mersch-Sundermann V, Mutters R, Brandt C, Schneider-Brachert W, Frank U. Control of the spread of vancomycin-resistant enterococci in hospitals: epidemiology and clinical relevance. *Dtsch Arztebl Int.* 2013; 110(43), 725-31.
93. Ng LK, Martin I, Alfa M, Mulvey M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol Cell Probes.* 2001; 15 (4), 209-215.
94. Nnadozie CF, Odume ON. Freshwater environments as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and their role in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Environ Pollut* 2019; 254, 113067.
95. Oancea C, Klare I, Witte W, Werner G. Conjugative transfer of the virulence gene, *esp*, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54 (1), 232-235.
96. One Health Initiative. Available online: <http://www.onehealthinitiative.com> (2022 03 24)
97. Oravcová V, Ghosh A, Žůrek L, Bardoň J, Guenther S, Čížek A, Literák I. Vancomycin-resistant enterococci in rooks (*Corvus frugilegus*) wintering throughout Europe. *Environ Microbiol.* 2013; 15 (2), 548-556.
98. Oravcová V, Mihalcin M, Zakova J, Pospisilova L, Masarikova M, Literak I. Vancomycin-resistant enterococci with *vanA* gene in treated municipal wastewater and their association with human hospital strains. *Sci Total Environ.* 2017; 609:633-643.
99. Orsi GB, Ciorba V. Vancomycin resistant enterococci healthcare associated infections. *Ann Ig.* 2013; 25 (6), 485-92.
100. Patel R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51 Suppl 3, iii13-21.
101. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18 (4), 657-86.
102. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. *Am J Med.* 2006; 119 (6 Suppl 1), S20-S70.
103. Piddock LJV. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19, 382–402.
104. Pokludová L, Koutecká L, Dorn D, Wojtylová J, Hera A, Bureš J. Spotřeba antimikrobik ve veterinární medicíně v ČR: detailní srovnání spotřeby antimikrobik 2010 - 2015. Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv Brno. 2018.
105. Polianciuc SI, Gurzău AE, Kiss B, Ștefan MG, Loghin F. Antibiotics in the environment: causes and consequences. *Med Pharm Rep.* 2020; 93 (3), 231-240.

106. Prematunge C, MacDougall C, Johnstone J, Adomako K, Lam F, Robertson J, Garber G. VRE and VSE Bacteremia Outcomes in the Era of Effective VRE Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2016; 37(1), 26-35.
107. Ramos S, Silva V, Dapkevicius MLE, Igrejas G, Poeta P. Enterococci, from Harmless Bacteria to a Pathogen. *Microorganisms.* 2020; 8 (8), 1118.
108. Raza T, Ullah SR, Mehmood K, Andleeb S. Vancomycin resistant Enterococci: A brief review. *J Pak Med Assoc.* 2018; 68 (5), 768-772.
109. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* 2018; 4 (3), 482-501.
110. Rios R, Reyes J, Carvajal LP, Rincon S, Panesso D, Echeverri AM, Dihn A, Kolokotronis SO, Narechania P, Tran TT *et al.* Genomic epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE<sub>fm</sub>) in Latin America: Revisiting the global VRE population structure. *Sci. Rep.* 2020; 10, 5636.
111. Rizzo L, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Ploy MC, Michael I, Fatta-Kassinou D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci Total Environ* 2013; 447, 345-60.
112. Robredo B, Singh KV, Baquero F, Murray BE, Torres C. Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. *Int J Food Microbiol.* 2000; 54 (3), 197-204.
113. Rodriguez-Mozaz S, Vaz-Moreira I, Varela Della Giustina S, Llorca M, Barceló D, Schubert S, Berendonk TU, Michael-Kordatou I, Fatta-Kassinou D, Martinez JL, Elpers C, Henriques I, Jaeger T, Schwartz T, Paulshus E, O'Sullivan K, Pärnänen KMM, Virta M, Do TT, Walsh F, Manaia CM. Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment. *Environ Int.* 2020; 140, 105733.
114. Rosenberg Goldstein RE, Micallef SA, Gibbs SG, George A, Claye E, Sapkota A, Joseph, SW, Sapkota AR. Detection of vancomycin-resistant enterococci (VRE) at four U.S. wastewater treatment plants that provide effluent for reuse. *Sci Total Environ* 2014; 466-467, 404-11.
115. Ryan L, O'Mahony E, Wrenn C, FitzGerald S, Fox U, Boyle B, Schaffer K, Werner G, Klare I. Epidemiology and molecular typing of VRE bloodstream isolates in an Irish tertiary care hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70 (10), 2718-24.
116. Sahlström L, Rehbinder V, Albiñ A, Aspan A, Bengtsson B. Vancomycin resistant enterococci (VRE) in Swedish sewage sludge. *Acta Vet Scand.* 2009; 51(1), 24.
117. Savin M, Bierbaum G, Hammerl JA, Heinemann C, Parcina M, Sib E, Voigt A, Kreyenschmidt J. Antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial residues in wastewater and process water from German pig slaughterhouses and their

- receiving municipal wastewater treatment plants. *Sci Total Environ.* 2020; 727, 138788.
118. Schlievert PM, Gahr PJ, Assimacopoulos AP, Dinges MM, Stoehr JA, Harmala JW, Hirt H, Dunny GM. Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. *Infect Immun.* 1998; 66(1), 218-223.
  119. Schwartz T, Kohnen W, Jansen B, Obst U. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol Ecol.* 2003; 43(3), 325-35.
  120. Song JY, Hwang IS, Eom JS, Cheong HJ, Bae WK, Park YH, Kim WJ. Prevalence and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci (VRE) strains isolated from animals and humans in Korea. *Korean J Intern Med.* 2005; 20 (1), 55-62.
  121. Song JY, Cheong HJ, Jo YM, Choi WS, Noh JY, Heo JY, Kim WJ. Vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization before admission to the intensive care unit: a clinico-epidemiologic analysis. *Am J Infect Control.* 2009; 37(9):734-40.
  122. Stavri M, Piddock LJ, Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59, 1247–1260.
  123. Suleyman, G.; Alangaden, G.; Bardossy, A.C. The role of environmental contamination in the transmission of nosocomial pathogens and healthcare-associated infections. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2018, 20, 12.
  124. Sun HL, Liu C, Zhang JJ, Zhou YM, Xu YC. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci isolated from a hospital in Beijing, China. *J Microbiol Immunol Infect.* 2019; 52(3), 433-442.
  125. Talaga K, Odrowąż-Konduracka D, Paradowska B, Jagiencarz-Starzec B, Wolak Z, Bulanda M, Szczypta A. Typing of *Enterococcus* spp. strains in 4 hospitals in the Małopolska region in Poland. *Adv Clin Exp Med.* 2018; 27 (1), 111-117.
  126. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33, 2233–2239.
  127. Top, J.; Willems, R.; Bonten, M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: From commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008; 52, 297–308.
  128. Torres C, Alonso CA, Ruiz-Ripa L, León-Sampedro R, Del Campo R, Coque TM. Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiol Spectr.* 2018; 6(4), ARBA 0032.
  129. Tran NH, Hoang L, Nghiem LD, Nguyen NMH, Ngo HH, Guo W, Trinh QT, Mai NH, Chen H, Nguyen DD, Ta TT, Gin KY. Occurrence and risk assessment of multiple classes of antibiotics in urban canals and lakes in Hanoi, Vietnam. *Sci Total Environ.* 2019; 692, 157-174.

130. Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, Siu LK. Klebsiella pneumoniae outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55 (4), 1485-1493.
131. Vágnerová I., Kolář M. Možnosti terapie infekcí způsobených vankomycin-rezistentními enterokoky. *Klin Farmakol Farm.* 2003; 17(3), 107-173.
132. Vakulenko SB, Donabedian SM, Voskresenskiy AM, Zervos MJ, Lerner SA, Chow JW. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47 (4), 1423-1426.
133. Van Tyne D, Martin MJ, Gilmore MS. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins (Basel).* 2013; 5 (5), 895-911.
134. Vankerckhoven V, Van Outgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Jabes D, Goossens H. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (10), 4473-4479.
135. Vehreschild MJGT, Haverkamp M, Biehl LM, Lemmen S, Fätkenheuer G. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): a reason to isolate? *Infection.* 2019; 47 (1), 7-11.
136. Vu J, Carvalho J. *Enterococcus*: review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. *Front. Biol.* 2001; 6 (5), 357-366.
137. Wada Y, Irekeola AA, E A R ENS, Yusof W, Lih Huey L, Ladan Muhammad S, Harun A, Yean CY, Zaidah AR. Prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) in companion animals: the first meta-analysis and systematic review. *Antibiotics (Basel).* 2021 31; 10 (2), 138.
138. Wang J, Chu L, Wojnárovits L, Takács E. Occurrence and fate of antibiotics, antibiotic resistant genes (ARGs) and antibiotic resistant bacteria (ARB) in municipal wastewater treatment plant: An overview. *Sci Total Environ.* 2020; 744:140997.
139. Webber MA, Piddock LJV. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51, 9–11.
140. Weber S, Hogardt M, Reinheimer C, Wichelhaus TA, Kempf VAJ, Kessel J, Wolf S, Serve H, Steffen B, Scheich S. Bloodstream infections with vancomycin-resistant enterococci are associated with a decreased survival in patients with hematological diseases. *Ann Hematol.* 2019; 98 (3), 763-773.
141. Weigel LM, Donlan RM, Shin DH, Jensen B, Clark NC, McDougal LK, Zhu W, Musser KA, Thompson J, Kohlerschmidt D, Dumas N, Limberger RJ, Patel JB. High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(1), 231-8.

142. Werner G, Coque TM, Hammerum AM, *et al.* Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill.* 2008; 13 (47), 19046.
143. Wist V, Morach M, Schneeberger M, Cernela N, Stevens MJA, Zurfluh K, Stephan R, Nüesch-Inderbinen M. Phenotypic and genotypic traits of vancomycin-resistant enterococci from healthy food-producing animals. *Microorganisms.* 2020; 8, 261.
144. Worth LJ, Slavin MA, Vankerckhoven V, Goossens H, Grabsch EA, Thursky KA. Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* vanB: clonal distribution, prevalence and significance of esp and hyl in Australian patients with haematological disorders. *J Hosp Infect.* 2008; 68(2):137-44.
145. Xie O, Slavin MA, Teh BW, Bajel A, Douglas AP, Worth LJ. Epidemiology, treatment and outcomes of bloodstream infection due to vancomycin-resistant enterococci in cancer patients in a vanB endemic setting. *BMC Infect Dis.* 2020; 20(1), 228.
146. Yadav G, Thakuria B, Madan M, Agwan V, Pandey A. Linezolid and vancomycin resistant enterococci: a therapeutic problem. *J Clin Diagn Res.* 2017; 11 (8), GC07-GC11.
147. Zalipour M, Esfahani BN, Halaji M, Azimian A, Havaei SA. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* among inpatients at Iranian University Hospitals: Clonal dissemination of ST6 and ST422. *Infect Drug Resist.* 2019; 12, 3039-3047.
148. Zarfel G, Galler H, Luxner J, Petternel C, Reinthaler FF, Haas D, Kittinger C, Grisold AJ, Pless P, Feierl G. Multiresistant bacteria isolated from chicken meat in Austria. *Int J Environ Res Public Health.* 2014; 11(12), 12582-93.
149. Zheng S, Wang Y, Chen C, Zhou X, Liu Y, Yang J, Geng Q, Chen G, Ding Y, Yang F. Current Progress in Natural Degradation and Enhanced Removal Techniques of Antibiotics in the Environment: A Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2022; 19(17), 10919.
150. Zhou X, Willems RJJ, Friedrich AW, Rossen JWA, Bathoorn E. *Enterococcus faecium*: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2020; 9 (1), 130.

## 9 PUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY

### 9.1 Publikace související s diserační prací

#### 9.1.1 Publikace v časopisech s impakt faktorech

**Hricová K**, Štosová T, Kučová P, Fišerová K, Bardoň J, Kolář M. Analysis of vancomycin-resistant enterococci in hemato-oncological patients. *Antibiotics (Basel)*. 2020; 9 (11), 785. (IF=5,222)

Bogdanová K, Doubravská L, Vágnerová I, **Hricová K**, Pudová V, Röderová M, Papajk J, Uvízl R, Langová K, Kolář M. *Clostridioides difficile* and vancomycin-resistant enterococci in COVID-19 patients with severe pneumonia. *Life (Basel)*. 2021; 11 (11), 1127. (IF=3,817)

Kolář M, Htoutou Sedláková M, Urbánek K, Mlynářčik P, Röderová M, **Hricová K**, Mezerová K, Kučová P, Zapletalová J, Fišerová K, Kurfürst P. Implementation of antibiotic stewardship in a University hospital setting. *Antibiotics (Basel)*. 2021; 10 (1), 93. (IF=5,222)

**Hricová K**, Röderová M, Fryčák P, Pauk V, Kurka O, Mezerová K, Štosová T, Bardoň J, Milde D, Kučová P, Kolář M. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci and antimicrobial residues in wastewater and surface water. *Life (Basel)*. 2021; 11 (12), 1403. (IF=3,817)

#### 9.1.2 Publikace v recenzovaných časopisech bez impakt faktoru

**Hricová K**, Kolář M. Efluxní pumpy bakterií - role v rezistenci na antibiotika a jejich možné inhibitory. *Klin Mikrobiol Infekc Lek*. 2014, 20 (4), 116-120.

Kučová P, Htoutou Sedláková M, Fišerová K, **Hricová K**, Kolář M. Enterokokové infekce a možnosti jejich léčby. *Klin Mikrobiol Infekc Lek*. 2021, 27 (1), 4-12.

#### 9.1.3 Seznam přednášek a posterů s abstraktem

**Hricová K**, Mezerová K, Röderová M, Kolář M. Výskyt vankomycin-rezistentních enterokoků na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice v Olomouci a jejich genetická analýza. *Kongres klinické mikrobiologie a infekčních nemocí*. Olomouc, 2019.

**Hricová K**, Štosová T. Výskyt faktorů virulence u vankomycin-rezistentních enterokoků izolovaných z gastrointestinálního traktu hemato-onkologických pacientů. *Konference RANK (Rutinní analýza nukleových kyselin molekulárně biologickými technikami)*. Pardubice, 2020.

**Hricová K**, Štosová T, Fišerová K, Bardoň J, Kolář M. Analýza vankomycin-rezistentních enterokoků u hematoonkologických pacientů. *Moravsko-slovenské mikrobiologické dny*. Luhačovice, 2021.



**Hricová K**, Röderová M, Bardoň J, Kolář M. VRE v mikrobiomu a životním prostředí. *Antibiotická politika*. Soláň, 2022.

**Hricová K**, Pudová V. Molekulárně-biologická analýza vankomycin rezistentních enterokoků v covidové době u pacientů s kritickou fází COVID-19. *Konference RANK (Rutinní analýza nukleových kyselin molekulárně biologickými technikami)*. Pardubice, 2023.

## 9.2 Ostatní publikace

### 9.2.1 Publikace v časopisech s impakt faktorech

Kolář M, Bardoň J, Chromá M, **Hricová K**, Štosová T, Sauer P, Koukalová D. ESBL and AmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in poultry in the Czech Republic. *Vet Med*. 2010; 55 (3), 119-124. (IF=0,746)

Htoutou Sedláková M, Hanulík V, Chromá M, **Hricová K**, Kolář M, Látal T, Schaumann R, Rodloff A. Phenotypic detection of broad-spectrum beta-lactamases in microbiological practice. *Med Sci Monit*. 2011; 17(5), 147-152. (IF=3,386)

Vojtová V, Kolář M, **Hricová K**, Uvízl R, Neiser J, Blahut L, Urbánek K. Antibiotic utilization and *Pseudomonas aeruginosa* resistance in intensive care units. *New Microbiol*. 2011; 34 (3), 291-298. (IF=1,265)

Husičková V, Chromá M, Kolář M, **Hricová K**, Štosová T, Kantor L, Dubrava L. Analysis of ESBL- and AmpC- positive enterobacteriaceae at the department of neonatology, University hospital Olomouc. *Curr Microbiol*. 2011; 62(6), 1664-1670. (IF=2,343)

Chromá M, **Hricová K**, Kolář M, Sauer P, Koukalová D. Using newly developed multiplex polymerase chain reaction and melting curve analysis for detection and discrimination of  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* isolates from intensive care patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 2011, 71 (3), 181-191. (IF=2,983)

Bardoň J, Kolář M, Karpíšková R, **Hricová K**. Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* spp. in broilers at retail in the Czech Republic and their antibiotic resistance. *Food Control*. 2011; 22(2), 328-332. (IF=6,652)

Bachleda P, Kalinová L, Utíkal P, Kolář M, **Hricová K**, Štosová T. Infected prosthetic dialysis arteriovenous grafts: a single dialysis center study. *Surg Infect*. 2012; 13 (6), 366-370. (IF=1,853)

Husičková V, Čekanová L, Chromá M, Htoutou Sedláková M, **Hricová K**, Kolář M. Carriage of ESBL- and AmpC-positive Enterobacteriaceae in the gastrointestinal tract of community subjects and hospitalized patients in the Czech Republic. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2012; 156 (4), 348-353. (IF=1,648)

Moráňová Z, Virtudazo E, **Hricová K**, Ohkusu M, Kawamoto S, Pudová V, Raclavský V. The CRZ1/SP1-like gene links survival under limited aeration, cell integrity and biofilm formation in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2014; 158 (2), 212-220. (IF=1,648)

Horáková M, Ľubušká L, Kolář M, **Hricová K**, Vrba R, Neoral Č, Zapletalová J. Individualized prophylaxis in patients with esophageal replacement because of cancer. *Surg Infect.* 2015; 16 (5), 1-5. (IF=1,853)

Sittová M, Röderová M, Dendis M, **Hricová K**, Pudová V, Horváth R, Ružička F, Dosoudilová Š, Kolář M. Application of molecular diagnostics in primary detection of ESBL directly from clinical specimens. *Microb Drug Resist.* 2015; 21 (3), 352-357. (IF=2,706)

Röderová M, Htoutou Sedláková M, Pudová V, **Hricová K**, Silová R, Imwensi P, Bardoň J, Kolář M. Occurrence of bacteria producing broad-spectrum beta-lactamases and qnr genes in hospital and urban wastewater samples. *New Microbiol.* 2016; 39 (2), 124-133. (IF=1,383)

**Hricová K**, Röderová M, Pudová V, Hanulík V, Halová D, Julínková P, Dolejská M, Papoušek I, Bardoň J. Quinolone-resistant *Escherichia coli* in poultry farming. *Cent Eur J Public Health.* 2017; 25(2), 163-167. (IF=1,154)

Chudáček J, Špička P, Kolar M, Stašek M, Kolcún Š, Klos D, **Hricová K**, Mlynarcik P, Pudová V, Klementová O, Horáček R. Analysis of Bacterial Pathogens Causing Complicating HAP in Patients with Secondary Peritonitis. *Antibiotics.* 2023; 12(3):527. (IF=5,222)

### 9.2.2 Publikace v recenzovaných časopisech bez impakt faktoru

Kolář M, Chromá M, **Hricová K**, Husičková V, Lovečková Y, Chmelařová E, Bartoníková N, Rybníkářová P. Prevalence ESBL-pozitivních enterobakterií ve velkých moravských městech. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2010; 16 (5), 152-157.

Htoutou Sedláková M, Hanulík V, Chromá M, **Hricová K**, Šenkyříková M, Kolář M. Rezistence enterobakterií ke karbapenemům. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2011; 17 (1), 12-18.

Sittová M, Dendis M, Dosoudilová Š, Horváth R, Röderová M, Husičková V, **Hricová K**, Kolář M. Rychlá identifikace ESBL-pozitivních klinických vzorků metodou real-time PCR. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2013; 19 (3), 80-84.

### 9.2.3 Seznam přednášek a posterů s abstraktem

Pospíšilová K (=Hricová K), Chromá M, Kolář M, Bardoň J, Štosová T, Sauer P. Výskyt enterobakterií produkujících širokospektré betalaktamázy u drůbeže v České republice. *Konference vědeckých prací studentů DSP*. Olomouc, 2009.

Dovalová M, Pospíšilová K (=Hricová K), Štosová T, Kolář M. Výskyt ESBL-pozitivních kmenů *Klebsiella pneumoniae* ve Slezské nemocnici v Opavě. *Antibiotická politika*. Soláň, 2009.

Janečková J, Janeček M, Chromá M, Pospíšilová K (=Hricová K), Štosová T, Kolář M. Charakteristika ESBL-a AMPC-pozitivních enterobakterií z pohledu fenotypu a genotypu. *Antibiotická politika*. Soláň, 2009.

Chromá M, Kolář M, Hricová K, Čekanová L, Sauer P, Koukalová D. Molekulárnobiologická charakterizácia ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli*. *Kongres klinické mikrobiologie a infekčních nemocí*. Olomouc, 2009.

Kolář M, Kantor L, Chromá M, Hricová K. Nozokomiální infekce z pohledu mikrobiologa a klinika. *Neonatologické dny*. Zlín, 2009.

Husičková V, Chromá M, Hricová K, Sauer P. Genetická detekce rezistence u bakteriálních původců sepsí. *Antibiotická politika*. Soláň, 2010.

Vojtová V, Hajdu D, Kolář M, Hricová K, Urbánek, K. Vývoj rezistence *Pseudomonas aeruginosa* ve vztahu ke spotřebě protipseudomonádových antibiotik na jednotkách intenzivní péče. *Česká konference klinické farmakologie, Česká konference DURG, Česká konference TDM*. České Budějovice, 2010.

Chromá M, Hricová K, Štosová T, Kolář M. Využitie genetických metód na charakterizáciu ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* od pacientov v intenzívnej starostlivosti z Fakultnej nemocnice Olomouc. *Kongres Československej spoločnosti mikrobiologickej*. Stará Lesná, Vysoké Tatry, 2010.

Hricová K, Chromá M, Kolář M, Bardoň J, Štosová T, Sauer P. Záchyt enterobakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz u drůbeže v České republice. *Kongres Československej spoločnosti mikrobiologickej*. Stará Lesná, Vysoké Tatry, 2010.

Husičková V, Chromá M, Hricová K, Štosová T, Kolář M, Kantor L. Genetická analýza ESBL-a AmpC-pozitivních enterobakterií na novorozeneckém oddělení Fakultní nemocnice Olomouc. *Moravsko-slovenské mikrobiologické dny*. Jihlava, 2010.

Htoutou Sedláková M, Hanulík V, Chromá M, Hricová K, Šenkyříková M, Kolář M. Prevalence karbapenem-rezistentních enterobakterií ve Fakultní nemocnici Olomouc a jejich analýza. *Konference vědeckých prací studentů DSP*. Olomouc, 2011.

Husičková V, Čekanová L, Chromá M, Htoutou Sedláková M, **Hricová K**, Kolář M. Nosičství ESBL- a AMPC-pozitivních enterobakterií v gastrointestinálním traktu osob v komunitě a hospitalizovaných pacientů. *Kongres klinické mikrobiologie a infekčních nemocí*. Plzeň, 2011.

Dendis M, Sittová M, Dosoudilová Š, Horváth R, Chromá M, Husičková V, **Hricová K**, Kolář M. Rychlá identifikace ESBL-pozitivních klinických vzorků metodou real-time PCR. *Antibiotická politika*. Soláň, 2013.

Sittová M, Dendis M, Dosoudilová Š, Horvath R, Röderová M, Husičková V, **Hricová K**, Kolář M. Rychlá identifikace ESBL-pozitivních klinických vzorků metodou real-time PCR. *Kongres Československé společnosti mikrobiologické s mezinárodní účastí*. Brno, 2013.

Sittová M, Röderová M, Dendis M, Dosoudilová Š, Husičková V, **Hricová K**, Kolář M. Real-time PCR rapid detection of SHV and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases directly from clinical material. *FEMS*. Lipsko, 2013.

Sittová M, Dendis M, Dosoudilová Š, Horváth R, Röderová M, Husičková V, **Hricová K**, Kolář M. Nová metoda detekce širokospektrých beta-laktamáz SHV a CTX-M typu přímo z klinického materiálu. *Kongres klinické mikrobiologie, infekčních nemocí a epidemiologie*. Olomouc, 2013.

**Hricová K**, Röderová M, Bardoň J. Problematika *Escherichia coli* s rezistencí k chinolonům v chovech drůbeže. *Lenfeldovy a Höklovy dny*. Brno, 2014.

**Hricová K**, Röderová M, Bardoň J, Julínková P, Dolejská M, Literák I, Čížek A, Papoušek I. Multirezistentní *Escherichia coli* u drůbeže. *Moravsko-slovenské mikrobiologické dny*. Luhačovice, 2014.

Kolář M, Röderová M, **Hricová K**, Bardoň J, Pudová V, Hanulík V. Problematika rezistence *Escherichia coli* k fluorochinolonům. *Antibiotická politika*, Soláň, 2015.

Mlynářčík P, Žďárská V, Chudobová H, Procházková P, **Hricová K**, Mezerová K, Bardoň, J, Dolejská M, Kutilová I, Kolář M. Detekcia  $\beta$ -laktamáz v baktériách živočíšneho pôvodu. *Moravsko-slovenské mikrobiologické dny*. Luhačovice, 2021.

## 10 SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ A GRAFŮ

### 10.1 Seznam tabulek

|   |    |
|---|----|
| Tabulka 1: Sekvence oligonukleotidových primerů použitých pro identifikaci jednotlivých <i>van</i> genů (Dutka-Malen <i>et al.</i> , 1995).....   | 36 |
| Tabulka 2: Složení a koncentrace jednotlivých reagensů master mixu PCR pro identifikaci <i>van</i> genů ..  | 37 |
| Tabulka 3: Reakční podmínky pro detekci <i>van</i> genů .....   | 37 |
| Tabulka 4: Sekvence oligonukleotidových primerů použitých pro identifikaci vybraných faktorů virulence (Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004) .....   | 38 |
| Tabulka 5: Složení a koncentrace jednotlivých reagensů master mixu multiplex PCR pro identifikaci vybraných faktorů virulence .....   | 39 |
| Tabulka 6: Reakční podmínky pro detekci vybraných faktorů virulence .....   | 39 |
| Tabulka 7: Sekvence oligonukleotidových primerů k detekci genů kódujících rezistenci k tetracyklinům a makrolidům (Malhotra-Kumar <i>et al.</i> , 2005; Weigel <i>et al.</i> , 2007; Ng <i>et al.</i> , 2001) .....   | 40 |
| Tabulka 8: Složení a koncentrace jednotlivých reagensů master mixu multiplex PCR pro identifikaci genů kódujících rezistenci k tetracyklinům ( <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> ) a makrolidům ( <i>erm(A)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>mef(A/E)</i> ) ..... | 41 |
| Tabulka 9: Reakční podmínky pro detekci genů kódujících rezistenci k tetracyklinům ( <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> ) a makrolidům ( <i>erm(A)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>mef(A/E)</i> ) .....   | 41 |
| Tabulka 10: Složení a koncentrace jednotlivých reagensů master mixu PCR pro identifikaci genu <i>tet(S)</i> kódujícího rezistenci k tetracyklinům .....   | 42 |
| Tabulka 11: Reakční podmínky pro detekci genu <i>tet(S)</i> kódujícího rezistenci k tetracyklinům .....   | 42 |
| Tabulka 12: Složení a koncentrace jednotlivých reagensů master mixu PCR pro identifikaci genu <i>tet(X)</i> kódujícího rezistenci k tetracyklinům .....   | 42 |
| Tabulka 13: Reakční podmínky pro detekci genu <i>tet(X)</i> kódujícího rezistenci k tetracyklinům .....   | 43 |
| Tabulka 14: Sekvence oligonukleotidových primerů použitých pro identifikaci genů kódujících enzymy modifikující aminoglykosidy (Vakulenko <i>et al.</i> , 2003) .....   | 43 |
| Tabulka 15: Složení a koncentrace jednotlivých reagensů master mixu PCR pro identifikaci genů kódujících enzymy modifikující aminoglykosidy .....   | 44 |
| Tabulka 16: Reakční podmínky pro detekci genů kódujících enzymy modifikující aminoglykosidy .....   | 44 |
| Tabulka 17: Sekvence oligonukleotidových primerů použitých pro identifikaci genu <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> kódujícího enzym modifikující aminoglykosidy (Vakulenko <i>et al.</i> , 2003) .....  | 45 |
| Tabulka 18: Složení a koncentrace jednotlivých reagensů master mixu PCR pro identifikaci genu <i>aac(6')-aph(2'')</i> kódujícího enzym modifikující aminoglykosidy .....  | 45 |
| Tabulka 19: Počty zachycených izolátů VRE ve FNOL a VNOL za období 2018-2020 .....  | 47 |
| Tabulka 20: Citlivost VRE k vybraným antibiotikům (v procentech) u klinických vzorků pacientů FNOL a VNOL .....   | 49 |
| Tabulka 21: Zastoupení genů rezistence mezi izoláty VRE od pacientů hospitalizovaných ve FNOL a VNOL a jejich porovnání s rozsahem MIC testovaných antibiotik .....   | 51 |
| Tabulka 22: Citlivost VRE k vybraným antibiotikům (v procentech) u hematologických pacientů podrobujících se „screeningu“ .....   | 52 |
| Tabulka 23: Záchyty VRE u hematologických pacientů v roce 2018 .....  | 53 |
| Tabulka 24: Záchyty VRE u hematologických pacientů v roce 2019 .....  | 54 |
| Tabulka 25: Záchyty VRE u hematologických pacientů v roce 2020 / s přesahem záchytu do roku 2021 .....  | 55 |
| Tabulka 26: Zastoupení genů rezistence mezi izoláty VRE od hematologických pacientů v rámci dlouhodobého „screeningu“ a jejich porovnání s rozsahem MIC testovaných antibiotik .....  | 56 |
| Tabulka 27: Citlivost VRE k vybraným antibiotikům (v procentech) .....  | 58 |
| Tabulka 28: Zastoupení genů rezistence mezi izoláty VRE od pacientů s těžkým průběhem COVID-19 a jejich porovnání s rozsahem MIC testovaných antibiotik .....   | 64 |

|   |    |
|---|----|
| Tabulka 29: Zastoupení genů rezistence u zachyceného VRE kmene z animální oblasti a jeho porovnání s MIC testovaných antibiotik. ....       | 65 |
| Tabulka 30: Celkový počet izolátů VRE získaných z jednotlivých odběrových míst.....   | 66 |
| Tabulka 31: Zastoupení genů rezistence mezi izoláty VRE z odpadních a povrchových vod a jejich porovnání s MIC testovaných antibiotik ..... | 67 |

## 10.2 Seznam obrázků

|  |    |
|--|----|
| Obrázek 1: Kultura vankomycin-rezistentního <i>E. faecium</i> na vyhledávací půdě Brilliance Oxoid (foto autor, 2020).....   | 21 |
| Obrázek 2: Prevalence VRE ( <i>E. faecium</i> ) u invazivních izolátů v evropských státech v roce 2021 - <a href="https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&amp;HealthTopic=4">https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&amp;HealthTopic=4</a> (2023 01 17)..... | 24 |
| Obrázek 3: Grafické znázornění "One Health Concept" (autor, 2022) .....  | 30 |
| Obrázek 4: Mapa odběrových míst odpadních a povrchových vod v Olomouci .....   | 34 |
| Obrázek 5: Dendrogram PFGE 103 izolátů vankomycin-rezistentních <i>E. faecium</i> za období studie 2016-2018. ....   | 59 |
| Obrázek 6: Časová osa výskytu klonálních skupin VRE.....   | 60 |
| Obrázek 7: Dendrogram PFGE izolátů VRE z prospektivní studie .....   | 61 |
| Obrázek 8: Dendrogram 50 izolátů vankomycin-rezistentních <i>E. faecium</i> u covidových pacientů 01-05/2021.....  | 62 |
| Obrázek 9: Časová osa výskytu jednotlivých izolátů VRE u covidových pacientů .....   | 63 |
| Obrázek 10: Výsledek PFGE (foto gelu) u 3 animálních izolátů.....  | 64 |
| Obrázek 11: Dendrogram 18 jedinečných kmenů VRE z odpadních a povrchových vod .....  | 65 |
| Obrázek 12: Záchyt VRE v odpadních vodách na vstupu do nemocniční ČOV (FNOL 1) .....   | 69 |
| Obrázek 13: Záchyt VRE v odpadních vodách na výstupu z nemocniční ČOV (FNOL 2) .....   | 69 |
| Obrázek 14: Záchyt VRE v odpadních vodách na výstupu z městské čističky odpadních (ČOV 2).....   | 70 |

## 10.3 Seznam grafů

|  |    |
|--|----|
| Graf 1: Prevalence VRE ( <i>E. faecium</i> ) u invazivních izolátů v ČR v časovém období 2001 – 2021; dle: <a href="https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&amp;HealthTopic=4">https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&amp;HealthTopic=4</a> (2023 01 17)..... | 24 |
| Graf 2: Prevalence VRE ( <i>E. faecium</i> ) u invazivních izolátů v evropských zemích (EU/EEA) a v České Republice dle databáze EARS-NET (v procentech) .....   | 25 |
| Graf 3: Záchyt izolátů VRE v klinickém materiálu za 2018-2020 (v počtech).....   | 48 |
| Graf 4: Záchyt izolátů VRE podle věkových kategorií za 2018-2020 (v počtech) .....   | 48 |
| Graf 5: Záchyt izolátů VRE dle oddělení a klinik ve FNOL a VNOL za 2018-2020 (v počtech).....  | 49 |
| Graf 6: Záchyt izolátů VRE ve věkových kategoriích u hematoonkologických pacientů podrobujících se „screeningu“ za 2018-2020 .....   | 51 |
| Graf 7: Porovnání záchytu faktorů virulence a genů rezistence mezi izoláty od pacientů FNOL a VNOL a pacientů zařazených do „screeningu“ na HOK. ....  | 57 |

## 11 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|                              |  |
|------------------------------|--|
| <i>aac(6′)-Ie-aph(2′)-Ia</i> | gen kódující enzymy modifikující aminoglykosidy  |
| ABC                          | typ efluxní pumpy  |
| AcrAB-TolC                   | typ efluxní pumpy  |
| <i>agg/asa1</i>              | gen kódující faktor virulence / agregační substance  |
| AMP                          | ampicilin  |
| <i>ampC</i>                  | gen kódující $\beta$ -laktamázu AmpC   |
| AmpC                         | skupina $\beta$ -laktamáz se širokým spektrem účinku   |
| AMR                          | antimikrobiální rezistence   |
| <i>ant(4′)-Ia</i>            | gen kódující enzymy modifikující aminoglykosidy  |
| <i>aph(3′)-IIIa</i>          | gen kódující enzymy modifikující aminoglykosidy  |
| ARB                          | bakterie rezistentních vůči antibiotikům ( <i>antibiotic-resistant bacteria</i> )  |
| ARG                          | geny rezistence vůči antibiotikům ( <i>antibiotic resistance genes</i> )   |
| ATB                          | antibiotikum   |
| ATP                          | adenosintrifosfát  |
| BAL                          | bronchoalveolární laváž  |
| bp                           | pár nukleotidových bazí  |
| BRIJ                         | polyethylenglykollaurylether / neiontový detergent   |
| BSA                          | hovězí sérový albumin ( <i>bovine serum albumin</i> )  |
| CLI                          | klindamycin  |
| CMP                          | chloramfenikol   |
| CTX-M                        | skupina $\beta$ -laktamáz se širokým spektrem účinku   |
| <i>cyl</i>                   | gen kódující faktor virulence / cytolysin  |
| ČOV                          | čistička odpadních vod   |
| DNA                          | deoxyribonukleová kyselina   |
| dNTPs                        | deoxyribonukleosidtrifosfáty   |
| EARS-NET                     | evropská síť pro sledování antimikrobiální rezistence ( <i>European Antimicrobial Resistance Surveillance Network</i> )  |
| ECDC                         | Evropské centrum pro prevenci a kontrolu nemocí ( <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> )  |
| EDTA                         | ethylendiamintetraoctová kyselina  |
| EGTA                         | kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová  |
| <i>erm(A), erm(B)</i>        | geny kódující rezistenci k makrolidům  |
| ERY                          | erytromycin  |
| ESBL                         | $\beta$ -laktamázy se širokým spektrem účinku ( <i>extended-spectrum-<math>\beta</math>-lactamases</i> )   |
| ESKAPE                       | souhrnný název pro skupinu bakterií ( <i>Enterococcus spp., Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp.</i> ) |
| <i>esp</i>                   | gen kódující faktor virulence / enterokokový povrchový protein   |
| EU/EEA                       | státy evropských zemí  |
| EUCAST                       | Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti ( <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> )  |
| FNOL                         | Fakultní nemocnice Olomouc   |
| FUR                          | nitrofurantoin   |
| <i>gelE</i>                  | gen kódující faktor virulence / želatináza   |

|                         |  |
|-------------------------|--|
| GES                     | typ karbapenemázy  |
| GIT                     | gastrointestinální trakt   |
| HCl                     | kyselina chlorovodíková  |
| HOK                     | Hemato-onkologická klinika   |
| <i>hyl</i>              | gen kódující faktor virulence / hyaluronidáza  |
| IMP                     | typ metalo- $\beta$ -laktamázy   |
| JIP                     | jednotka intenzivní péče   |
| KARIM                   | Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny  |
| KPC                     | typ karbapenemázy  |
| LNZ                     | linezolid  |
| MALDI-TOF MS            | matricí asistovaná laserová desorpce a ionizace v kombinaci s detektorem doby letu ( <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time – of – flight mass spectrometry</i> ) |
| MATE                    | typ efluxní pumpy ( <i>multidrug and toxic efflux</i> )  |
| MBL                     | metalo- $\beta$ -laktamáza   |
| MDR                     | víceléková rezistence ( <i>multiple drug resistance</i> )  |
| <i>mef(A/E)</i>         | gen kódující rezistenci k makrolidům   |
| MF                      | typ efluxní pumpy (major facilitator)  |
| <i>MgCl<sub>2</sub></i> | chlorid hořečnatý  |
| MIC                     | minimální inhibiční koncentrace ( <i>minimal inhibition concentration</i> )  |
| MLST                    | multilokusová sekvenční typizace ( <i>multilocus sequence typing</i> )   |
| MLVA                    | multilokusová analýza tandemových repetitiv ( <i>multiple locus variable number of tandem repeats analysis</i> )   |
| MRSA                    | metilicín-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>   |
| NDM                     | typ metalo- $\beta$ -laktamázy   |
| OmpK35                  | typ porinu pro průchod $\beta$ -laktamů  |
| OmpK36                  | typ porinu pro průchod $\beta$ -laktamů  |
| OSN                     | Organizace spojených národů  |
| OXA                     | skupina $\beta$ -laktamáz  |
| PBP                     | penicilin vázající protein ( <i>penicilin binding proteins</i> )   |
| PBP2a, PBP4, PBP5       | penicilin vázající proteiny / modifikovaný enzymy  |
| PCR                     | polymerázová řetězová reakce ( <i>polymerase chain reaction</i> )  |
| PFGE                    | pulsní gelová elektroforéza ( <i>pulse gel field electrophoresis</i> )   |
| PNC                     | penicilin  |
| PNEC                    | hodnota, pod níž se uvedený nepříznivý účinek antimikrobiálních látek při expozici s největší pravděpodobností neprojeví ( <i>predicted no effect concentration</i> )          |
| <i>qnr</i>              | gen kódující rezistenci k chinolonům   |
| QRDR                    | oblast DNA, kde probíhající mutace, vedoucí rezistenci k fluorochinolonům ( <i>quinolone resistance-determining region</i> )   |
| RND                     | typ efluxní pumpy ( <i>resistance-nodulation-division</i> )  |
| SCCmec                  | stafylokoková chromozomální kazeta   |
| SHV                     | skupina $\beta$ -laktamáz  |
| SME                     | typ karbapenemázy  |
| SMR                     | typ efluxní pumpy ( <i>small multi-drug resistance/staphyloccal multiresistance family</i> )   |



|            |  |
|------------|--|
| SVÚ        | Státní veterinární ústav   |
| TBE pufr   | pufr Tris-kyselina boritá-EDTA                                       |
| TEI        | teikoplanin  |
| TEM        | skupina $\beta$ -laktamáz  |
| <i>tet</i> | gen kódující rezistenci k tetracyklinu                               |
| TET        | tetracyklin  |
| TIG        | tigecyclin   |
| Tris       | tris(hydroxymethyl)aminomethan                                       |
| <i>van</i> | gen kódující rezistenci k vankomycinu                                |
| VAN        | vankomycin   |
| VIM        | typ metalo- $\beta$ -laktamázy                                       |
| VNOL       | Vojenská nemocnice Olomouc   |
| VRE        | vankomycin rezistentní enterokok                                     |
| VREF       | <i>E. faecium</i> rezistentní k vankomycinu                          |
| w/v        | hmotnostní zlomek ( <i>weight/volume</i> )                           |
| WHO        | světová zdravotnická organizace ( <i>World Health Organisation</i> ) |