

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2023

Kateřina Vancová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

DETAILNÍ ANALÝZA GENŮ REZISTENCE NA ANTIBIOTIKA A TĚŽKÉ KOVY A ZNAKŮ HORIZONTÁLNÍHO PŘESOSU GENŮ U ZÁSTUPCŮ ANAEROBNÍCH BAKTERIÍ

DETAIL ANALYSIS ON ANTIBIOTIC AND HEAVY-METAL RESISTANCE GENES AND HORIZONTAL GENE
TRANSFER TRAITS IN ANAEROBIC BACTERIA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kateřina Vancová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Bc. Darina Čejková, Ph.D.

BRNO 2023

Bakalářská práce

bakalářský studijní program **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Kateřina Vancová

ID: 231165

Ročník: 3

Akademický rok: 2022/23

NÁZEV TÉMATU:

Detailní analýza genů rezistence na antibiotika a těžké kovy a znaků horizontálního přesosu genů u zástupců anaerobních bakterií

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Vypracujte literární rešerši zabývající se detekcí genů rezistence (na antibiotika a těžké kovy) u bakterií. 2) Seznamte se s veřejnými databázemi pro detekci genů rezistence a horizontálního přenosu - např. MEGARes, ISEScan, ICEberg a INTEGRALL. 3) Detekujte hledané geny pomocí různých algoritmů a/nebo databází. Navrhněte metodu pro detekci a detailní charakterizaci těchto genů z genomických dat bakteriálních anaerobů. Dílčí části metod realizujte a otestujte. 4) Implementujte navrženou metodu ve zvoleném programovacím jazyce. 5) Algoritmus otestujte na souboru 300 genomů. 6) Výsledky vyhodnoťte a diskutujte.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] JURICOVA H., J. MATIASOVICOVA, T. KUBASOVA, et al. The distribution of antibiotic resistance genes in chicken gut microbiota commensals. Scientific Reports. 2021, 11(1):3290.

[2] DOSTER E., S. M. LAKIN, C. J. DEAN, et al. MEGARes 2.0: a database for classification of antimicrobial drug, biocide and metal resistance determinants in metagenomic sequence

Termín zadání: 6.2.2023

Termín odevzdání: 29.5.2023

Vedoucí práce: Mgr. Bc. Darina Čejková, Ph.D.

doc. Ing. Jana Kolářová, Ph.D.
předseda rady studijního programu

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá detailní analýzou genů rezistence na antibiotika a těžké kovy a znaků horizontálního přesosu genů u zástupců anaerobních bakterií. Antimikrobiální rezistence (AMR) u bakterií je celosvětově rostoucí hrozbou pro veřejné zdraví. U těchto bakterií jsou geny AMR často spojeny s mobilními genetickými elementy (MGE), které podporují jejich mobilitu a umožňují jim rychlé šíření mezi různými bakteriemi. V práci je popsán horizontální přenos genetické informace, problematika antimikrobiální rezistence a databáze pro detekci genů AMR a MGE. Poté byla provedena detekce a analýza genů AMR a MGE u zástupců anaerobních bakterií. Téměř polovina z nich obsahovala alespoň 1 gen AMR, celkem 112 různých genů. Poté bylo detekováno 66 různých MGE, 4 z nich přenášely 6 různých detekovaných genů AMR.

KLÍČOVÁ SLOVA

Horizontální přenos genů, mobilní genetické elementy, bakterie, antimikrobiální rezistence, geny rezistence, databáze pro detekci genů rezistence, antibiotika, těžké kovy

ABSTRACT

This thesis deals with a detail analysis on antibiotic and heavy-metal resistance genes and horizontal gene transfer traits in anaerobic bacteria. Antimicrobial resistance (AMR) in bacteria is a growing threat to public health globally. In these bacteria, AMR genes are often associated with mobile genetic elements (MGEs), which promote their mobility, enabling them to rapidly spread throughout a bacterial community. The work describes the horizontal gene transfer, the issue of antimicrobial resistance and the database for the detection of AMR genes and MGEs. After that, the detection and analysis of AMR genes and MGEs in anaerobic bacteria was done. Almost half of them contained at least 1 gene coding for antibiotic or heavy-metal resistance, 112 different genes overall. Then, 66 different MGEs were detected, 4 of which carried 6 different AMR detected genes.

KEYWORDS

Horizontal gene transfer, mobile genetic elements, bacteria, antimicrobial resistance, resistance genes, database for resistance gene detection, antibiotics, heavy-metals

VANCOVÁ, Kateřina. *Detailní analýza genů rezistence na antibiotika a těžké kovy a znaků horizontálního přesosu genů u zástupců anaerobních bakterií*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství, 2023, 41 s. Bakalářská práce. Vedoucí práce: Mgr. Bc. Darina Čejková, Ph.D.

Prohlášení autora o původnosti díla

Jméno a příjmení autora:	Kateřina Vancová
VUT ID autora:	231165
Typ práce:	Bakalářská práce
Akademický rok:	2022/23
Téma závěrečné práce:	Detailní analýza genů rezistence na antibiotika a těžké kovy a znaků horizontálního přesosu genů u zástupců anaerobních bakterií

Prohlašuji, že svou závěrečnou práci jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí/ho závěrečné práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené závěrečné práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této závěrečné práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Brno

.....
podpis autorky*

*Autor podepisuje pouze v tištěné verzi.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce paní Mgr. Bc. Darině Čejkové, Ph.D., za odborné vedení, konzultace, trpělivost a podnětné návrhy k práci.

Obsah

Úvod	11
1 Horizontální přenos genetické informace	12
1.1 Konjugace	13
1.2 Transformace	14
1.3 Transdukce	14
1.3.1 Generalizovaná transdukce	15
1.3.2 Specializovaná transdukce	15
1.4 Mobilní genetické elementy	15
1.4.1 Inzerční sekvence	15
1.4.2 Transpozony	17
1.4.3 Integrony	19
1.4.4 Plazmidy	21
2 Rezistence na antibiotika a těžké kovy	22
2.1 Zdroje genů rezistence na antibiotika	22
2.2 Dopady antimikrobiální rezistence	23
2.3 Detekce genů rezistence	23
2.3.1 Databáze pro detekci genů rezistence	24
3 Analýza genů rezistence	28
3.1 Metody	28
3.1.1 Bakteriální izoláty	28
3.1.2 Použité databáze	28
3.2 Výsledky	28
3.2.1 Geny rezistence	30
3.2.2 Mobilní genetické elementy	34
4 Diskuze	36
Závěr	38
Literatura	39

Seznam obrázků

1.1	Mechanismy horizontálního přenosu genetické informace[5]	12
1.2	Struktura inzerční sekvence[13]	16
1.3	Mechanismy přenosu inzerční sekvence mezi molekulami DNA[13]	16
1.4	Struktura transpozonů[13]	18
1.5	Struktura integronu a integrace genových kazet[18]	20
3.1	Skupiny antibiotik, desinfekční prostředky a antiseptika	31
3.2	Mechanismy rezistence	32
3.3	Typy mobilních genetických elementů	34

Seznam tabulek

3.1	Klasifikace bakterií zastoupených v analýze.	29
3.2	Mobilní genetické elementy s geny rezistence.	35

Úvod

Bakalářská práce se zabývá detailní analýzou genů rezistence na antibiotika a těžké kovy a znaků horizontálního přenosu genetické informace u zástupců anaerobních bakterií.

Šíření antimikrobiální rezistence prostřednictvím horizontálního přenosu genetické informace patří mezi jednu z nejzávažnějších výzev současné medicíny. Kvůli rostoucí rezistenci na antibiotika u patogenů se onemocnění způsobená těmito patogeny stávají vážnou hrozbou. Antimikrobiální látky navíc umožnily pokrok v mnoha oblastech lékařské praxe. Antimikrobiální rezistence proto představuje vážnou hrozbu pro velkou část zdravotnictví, jak ji známe. Bakterie mohou také obsahovat geny, které kódují rezistenci vůči biocidům, které jsou důležité jako dezinfekční prostředky, a vůči kovům, které mají antimikrobiální účinky. Primárními zdroji kontaminace antibiotiky jsou domácí, městské, nemocniční a průmyslové odpadní vody, akvakultura a intenzivní chov dobytka. Identifikace genetických determinant antimikrobiální rezistence je kritickou součástí epidemiologických šetření.

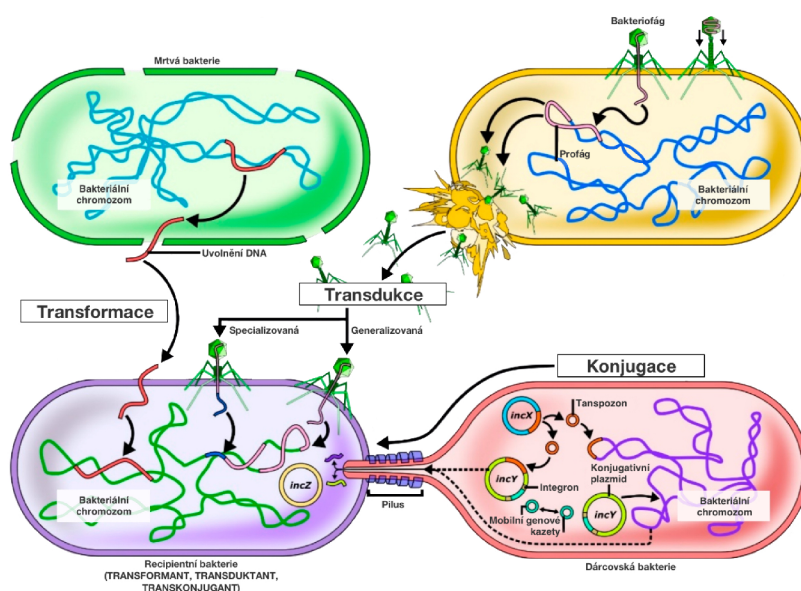
Cílem bakalářské práce je vypracovat literární rešerši zabývající se detekcí genů rezistence na antibiotika a těžké kovy u bakterií, seznámit se s veřejnými databázemi pro detekci genů rezistence a horizontálního přenosu a navrhnout metodu pro detekci a detailní charakterizaci těchto genů z genomických dat bakteriálních anaerobů.

1 Horizontální přenos genetické informace

Genetická informace se mezi organizmy přenáší dvěma cestami - vertikálně a horizontálně (laterálně). Vertikální přenos je z generace na generaci (z rodičů na potomky). Horizontální přenos je sdílení genetického materiálu mezi nepříbuznými organizmy (mezi organizmy, které nejsou ve vztahu rodič-potomek).[1]

Horizontální přenos genetické informace (HGT) je známý mechanismus adaptace u bakterií a archea. U prokaryot probíhá bez jakéhokoliv imunitního rozpoznávání. Je pro ně univerzálním prostředkem, jak reorganizovat své genomy, aby získaly nové metabolické reakce a nové vlastnosti jako patogenitu, virulenci a rezistenci na různé chemické látky vyskytující se v prostředí včetně léků a antibiotik.[2] Mutace je pomalý proces a většina mutací je pro bakterie škodlivá nebo neutrální, není pro ně tak přínosná. Oproti tomu je HGT rychlým způsobem, jak najednou získat velké kusy DNA z jiné bakterie. Mikrobiální antibiotická rezistence a patogenita jsou nejčastěji spojeny s HGT. HGT ale nesouvisí jen s organizmy způsobující nemoci, vyskytuje se mezi prokaryoty, prokaryoty a eukaryoty a i mezi mnohobuněčnými eukaryoty.[3]

Nejvíce známé mechanismy horizontálního přenosu genetické informace u prokaryot jsou konjugace, transformace a transdukce (obrázek 1.1).[3] Konjugace je přenos genů, který je zprostředkován určitými plazmidy nebo konjugativními transpozony s relevantními přenosovými geny. Na rozdíl od transformace nebo transdukce je pro konjugaci nutný kontakt mezi dárcovskou a recipientní buňkou. Transformace je přenos genů, který je zprostředkován vychytáváním volné DNA z okolního prostředí. Transdukce je přenos genů, který je zprostředkován určitými typy bakteriofágů.[4]



Obr. 1.1: Mechanizmy horizontálního přenosu genetické informace[5]

1.1 Konjugace

Bakteriální konjugace je promiskuitní mechanismus transportu DNA, kdy dochází k přenosu genetické informace mezi dvěma bakteriemi prostřednictvím přímého kontaktu a výměny plasmidů, což jsou kruhové molekuly DNA. Konjugativní plasmidy se přenášejí mezi většinou bakterií, jsou tedy jednou z hlavních příčin šíření antibiotické rezistence mezi patogenními bakteriemi. Konjugace poskytuje bakteriím jedinečný prostředek pro genetickou výměnu a je to silný zdroj genetické variability.[6]

Ačkoli je konjugace definována jako přenos DNA z bakterie na bakterii, je možné, že jako příjemce může sloužit jakýkoli typ buňky, protože všechny události, ke kterým dochází během konjugace, jsou řízeny dárcovskou buňkou a jsou typicky kódovány plazmidem.[7] Schopnost dárce je určena specifickými konjugativními plazmidy nazývanými plazmidy plodnosti (F-plazmidy).[8]

Konjugace vyžaduje fyzický kontakt mezi dárcovskou a recipientní buňkou prostřednictvím konjugačního pilu (vlasovitý útvar na povrchu mnoha bakterií sloužící ke konjugaci), přes který se přenáší genetický materiál.[3]

Replikace DNA a transport makromolekul přes membrány jsou základními procesy života. Bakteriální konjugační systémy vykazují podobnosti s replikací DNA a makromolekulárními transportními systémy.[6] Mechanismus konjugace v F-plazmidech zahrnuje relaxozom a transferozom. Relaxozom je proteinový komplex, který hraje důležitou roli při přenosu plasmidů v bakteriích. Shromažďuje se na *oriT* (počátek přenosu na plazmidu). Skládá se z několika proteinů, z nichž každý plní specifickou funkci.[9] Transferozom je komplex konjugativních proteinů, který sestavuje membránový transportér. Patří do sekrečního systému typu IV (T4SS). Sousedí s konjugačním pílím.[6] Konjugativní systémy navíc zahrnují vazebný protein, který působí jako spojovací článek mezi těmito dvěma komplexy (relaxozomem a transferozomem).[9]

Pro konjugaci je nutný plazmid zvaný F-faktor. Bakterie obsahující F-faktor se nazývají F+, ty bez něj se nazývají F-. Buňka F+, tedy dárce, vytváří pilus, kterým se spojuje s recipientní buňkou. Pro zahájení konjugace je F-faktor přerušen na *oriT* relaxozomem, který se spojuje s řetězcem, který má být přenesen (T-DNA). Dojde k uvolnění pomocných proteinů relaxozomu, ale část relaxozomu zvaná relaxáza zůstává připojena k T-DNA. Tento komplex T-DNA a relaxázy je rozpoznán vazebným proteinem a přenesen na membránový transportér. Transportér tlačí komplex T-DNA a relaxázy přes pilus do buňky příjemce. Přenesený řetězec T-DNA se převede na kruhovou dvouřetězcovou F-plazmidovou DNA v recipientní buňce a v dárcovské buňce se syntetizuje nový řetězec, který nahradí přenesený řetězec. Spojení přes pilus je uvolněno. Obě exkonjugantní bakterie jsou F+ a F-plazmid se proto může dále šířit infekcí mezi geneticky kompatibilní populací bakterií.[8]

1.2 Transformace

Transformace je proces, při kterém bakterie přijímá cizí DNA z okolního prostředí a začleňuje ji do svého genomu.[3]

Schopnost bakterií přijímat extracelulární DNA a transformovat se, nazývaná kompetence, se liší podle fyziologického stavu bakterií. Bakterie přijímá cizí DNA dovnitř buňky pomocí speciálních proteinů na povrchu buněčné membrány, které se nazývají kompetenční faktory. Tyto faktory umožňují vstup cizí DNA do buněčného cytoplazmatického prostoru.[8]

V cytoplazmatickém prostoru bakterie se cizí DNA zpracovává a rekombinací může být začleněna do genomu bakterie. Rekombinace je proces, při kterém dochází k přeskupení genetické informace mezi molekulami DNA. Tento proces je katalyzován speciálními enzymy nazývanými rekombinantní proteiny, které umožňují přesun cizí DNA do genomu recipientní bakterie. DNA z dárcovské bakterie se obvykle nemůže replikovat v recipientní bakterii, pokud se rekombinací nestane součástí replikonu, což jsou sekvence DNA, které obsahují informaci nutnou pro replikaci.[8]

1.3 Transdukce

Transdukce je proces, při kterém se genetický materiál přenáší mezi bakteriemi pomocí bakteriofágů. To jsou viry, které infikují bakterie. Bakteriofág vloží některé bakteriální geny do svého genomu, které se následně mohou přenést na další bakterie, které jsou tímto bakteriofágem infikovány.[3]

Transdukce začíná infekcí bakterie. Bakteriofág se váže na specifické receptory na povrchu bakteriální buňky a vstupuje dovnitř. Po vstupu do bakterie využívá bakteriofág replikační systém bakterie k replikaci svého vlastního genomu a k tvorbě nových virových částic. Tento proces může probíhat v cyklu lytickém nebo v cyklu lysogenním.[10]

V lytickém cyklu se virus po infekci hostitelské buňky replikuje. Po replikaci viru dochází k lýze (rozpadu) hostitelské buňky, při které se uvolňují nově vytvořené virové částice. Ty mohou infikovat další buňky. V lysogenním cyklu se virus po infekci hostitelské buňky integruje do genomu buňky a je přítomen ve formě profágu. Profág je neaktivní a replikuje se společně s genomem hostitelské buňky, aniž by způsoboval její poškození. Za určitých podmínek, jako je poškození DNA (např. UV zářením, ionizujícím zářením) nebo stresová situace (např. nedostatek živin, změny v prostředí), může dojít k indukci profágu. Indukce profágu je proces, při kterém je profág uvolněn z genomu buňky a dochází k přechodu viru z cyklu lysogenního do cyklu lytického.[11]

Při transdukcii je genetická informace dárcovské bakterie během lytické replikace začleněna do bakteriogágu a je přenesena do recipientní buňky infekcí[10]. Existují dva typy transdukce, generalizovaná a specializovaná[3].

1.3.1 Generalizovaná transdukce

Při generalizované transdukcii je náhodný kousek hostitelské DNA začleněn během buněčné lýzy.[3] Generalizované transdukující fágy produkované během lytického cyklu obsahují místo části fágové DNA náhodný segment bakteriálního genomu. Každý jednotlivý generalizovaný transdukující fág nese odlišnou sadu genů, které představují tento malý segment bakteriálního genomu. Každá část bakteriálního genomu má přibližně stejnou pravděpodobnost začlenění do fágu a přenosu z dárcovské na recipientní bakterii.[8]

1.3.2 Specializovaná transdukce

Při specializované transdukcii může být do recipientních bakterií přeneseno pouze několik specifických genů, které se nacházejí v místě integrovaného profágu. Specializovaná transdukce je tedy výsledkem lysogenizace.[10] Specializované transdukující fágy se tvoří tehdy, když dárcovská bakterie z cyklu lysogenního vstoupí do cyklu lytického a dojde k indukci integrovaných profágů. Při indukci mohou tyto fágy do svého genomu začlenit sousední geny z genomu hostitelské buňky a přenést je na recipientní bakterii. Mnoho specializovaných transdukujících fágů je defektních a nemůže dokončit lytický cyklus v infikovaných buňkách, pokud zde nejsou přítomny pomocné fágy, které poskytují chybějící fágové funkce.[8]

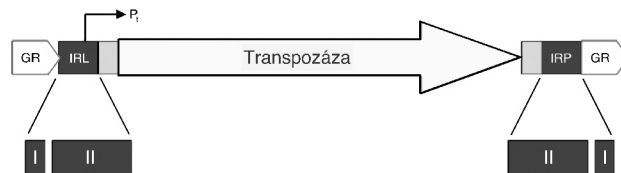
1.4 Mobilní genetické elementy

Mobilní genetické elementy (MGE) jsou segmenty DNA, které kódují enzymy a další proteiny, které zprostředkovávají pohyb DNA v rámci genomů (intracelulární mobilita) nebo mezi bakteriálními buňkami (intercelulární mobilita). Antibiotická rezistence bakterií se šíří získáváním genů rezistence, které existují v transpozonech, integronech a plazmidech.[4]

1.4.1 Inzerční sekvence

Inzerční sekvence (IS) jsou krátké úseky DNA, které jsou schopné nezávislé transpozice v mikrobiálním genomu. Nekódují žádné jiné funkce než ty, které se podílejí na jejich mobilitě.[12] Mimo bakterií se vyskytují také u eukaryot. Způsobují inzerční mutace, rekombinace, případně mobilizují geny virulence nebo rezistence.[13]

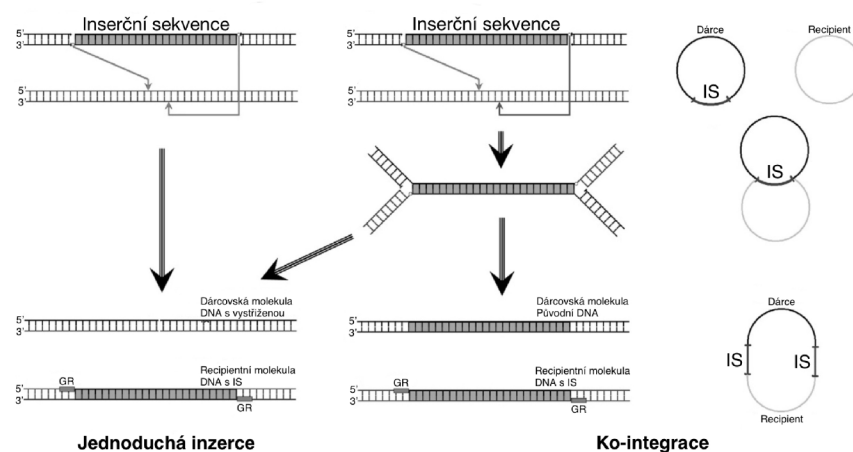
Základní složkou inserční sekvence je gen transpozázy, který je ohraničen invertovanými repeticemi (IRL, IRP), které rozpoznává transpozáza. Invertované repetice se skládají ze dvou podjednotek, první podjednotka (I) je úsek rozpoznávaný transpozázou jako štěpné místo, druhá podjednotka (II) je vazebným místem transpozázy. Poslední součástí u většiny inserčních sekvencí jsou generované repetice (GR), které jsou generovány při inserci inserční sekvence do cílové molekuly DNA (obrázek 1.4.1).[13]



Obr. 1.2: Struktura inserční sekvence[13]

IRL - invertovaná repetice levá, IRP - invertovaná repetice pravá, GR - generované repetice, P_t - promotor genu transpozázy, I - úsek rozpoznávaný transpozázou jako štěpné místo, II - vazebné místo transpozázy.

K transpozici inserční sekvence dochází přímou vazbou transpozázy na invertované repetice s následným rozpojením vazby a přenesením na cílové místo recipientní molekuly DNA. Rozlišují se dva mechanismy transpozice inserční sekvence, jednoduchá inserce, kdy je inserční sekvence přenesena kompletním vystřížením a volné konce na dárcovské molekule DNA jsou následně spojeny, a ko-integrace, kdy po replikaci dojde ke spojení dárcovské a recipientní molekuly DNA (obrázek 1.4.1).[13]



Obr. 1.3: Mechanizmy přenosu inserční sekvence mezi molekulami DNA[13]

Jednoduchá inserce a ko-integrace. IS - inserční sekvence, GR - generované repetice.

Inzerční sekvence jsou klasifikovány podle složení transpozázy, invertovaných a generovaných repetit, atd. U prokaryot bylo popsáno kolem 25 různých rodin, které obsahují několik set různých inzerčních sekvencí.[13]

Významnou úlohou inzerčních sekvencí v šíření antibiotické rezistence je zvýšení exprese genů rezistence. Invertované repetice inzerčních sekvencí jsou silné promotory a lokalizace takového promotoru vede ke zvýšené expresi genů nacházejících se za inzerční sekvencí.[13]

1.4.2 Transpozony

Transpozony jsou mobilní genetické elementy, definovány jako sekvence DNA schopné transpozice. Mohou přeskakovat do různých míst genomu, proto se jim říká skokové geny.[14] Na rozdíl od inzerčních sekvencí kódují další geny, které přímo nesouvisí s jejich funkcí[13]. Transpozici transpozonů katalyzuje enzym transpozáza, který rozeznává koncové obrácené repetice transpozonu, štěpí cílové sekvence, do kterých se vkládá transpozon, a po transpozici spojuje cílové sekvence s vloženým transpozonem[14].

Transpozony obsahují tři funkční složky, gen transpozázy, která umožňuje transpozici, genetickou informaci nepotřebnou k transpozici transpozonu (např. geny rezistence) a invertované repetice na obou koncích transpozonu, které jsou stejně jako v případě inzerční sekvence rozpoznávány transpozázou (obrázek 1.4.2 A).[13]

Rozlišují se dva druhy transpozice, intermolekulární transpozice, která probíhá mezi dárcovskou a recipientní molekulou DNA (např. mezi plazmidem a chromosomem), a intramolekulární transpozice, která probíhá mezi donorovým a cílovým místem na jedné molekule DNA (např. na molekule plazmidu)[15]. Dále se rozlišují dva způsoby transpozice, konzervativní transpozice, kdy dojde k excisi transpozonu z donorového místa a inserci do cílového místa, a replikativní transpozice, kdy se transpozon v donorovém místě zreplikuje a jeho kopie se vloží do cílového místa[16].

Transpozony jsou významným faktorem šíření rezistence na antibiotika, protože jsou na nich lokalizovány geny kódující enzymy, které inaktivují antibiotika. Přenos transpozonu z plazmidu na jiné plazmidy nebo z chromozomu DNA do plazmidu a naopak způsobuje přenos genů rezistence na antibiotika u bakterií. Některé transpozony jsou však vždy zachovány v místě inserce v genomu. Většina transpozonů je deaktivována a v důsledku toho se nemůže pohybovat.[14] Transpozony jsou také důležité při mobilizaci integronů[13].

Na základě způsobu transpozice se transpozony dělí do dvou hlavních skupin, retrotranspozony a DNA transpozony. Bakteriální transpozony (např. kompozitní transpozony nebo transponovatelné bateriofágy) patří do DNA transpozonů, které jsou obvykle nositeli genů pro antibiotickou rezistenci.[14]

Retrotranspozony

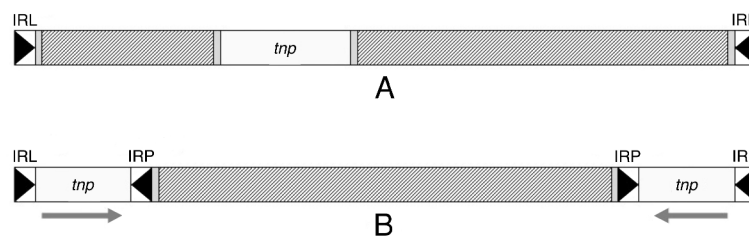
Retrotranspozony se přenáší procesem nazývaným retropozice. Retropozice je transpozice zpětnou transkripcí katalyzovaná enzymem reverzní transkriptáza. Retrotranspon se v donorovém místě přepíše do RNA, která se reverzní transkriptázou přepíše do DNA vkládající se do cílového místa.[14]

Retrotranspozony a další transpozony založené na transpozičních proteinech se dělí do dvou skupin, autonomní a neautonomní. Autonomní retrotranspozony mají otevřený čtecí rámec a geny, které kódují transpoziční proteiny. Neautonomní retrotranspozony nejsou schopny tyto proteiny kódovat, a proto využívají dostupné proteiny autonomních retrotranspozonů.[14]

Retrotranspozony byly nalezeny v bakteriích, archaea i eukaryotech. Často se nacházejí v genomu eukaryot. Bakteriální retrotranskriptáza byla nalezena v retronech a některých intronech. Retrony jsou sekvence DNA, které kódují reverzní transkriptázu. Byly nalezeny v genomu mnoha bakterií. Zatím není jasné, jestli jsou retrony mobilními elementy.[14]

Kompozitní transpozony

Kompozitní transpozony jsou transpozony ohraničené dvěma inzerčními sekvencemi, obvykle v opačné orientaci. Inzerční sekvence poskytují kompozitnímu transpozonu enzym transpozázu a invertované repetice. Obecná struktura transpozonu obsahuje gen transpozázy *tnp* ohraničený genetickou informací nepotřebnou k transpozici transpozonu a levou a pravou invertovanou repeticí IRL a IRP. Kompozitní transpon obsahuje genetickou informaci nepotřebnou k transpozici transpozonu, jsou to např. geny rezistence, s opačně orientovanými inzerčními sekvencemi na koncích (obrázek 1.4.2).[13]



Obr. 1.4: Struktura transpozonů[13]

A - obecná struktura transpozonu, B - struktura kompozitního transpozonu, *tnp* - gen transpozázy, IRL - invertovaná repetice levá, IRP - invertovaná repetice pravá, GR - generované repetice, šedivě jsou zobrazeny místa obsahující genetickou informaci nepotřebnou k transpozici transpozonu (např. geny rezistence).

Konjugativní transpozony

Konjugativní transpozony jsou mobilní genetické elementy schopné intercelulárního přenosu konjugací. Při excizi transpozonu z dárcovské molekuly DNA dojde k vytvoření kruhové dvoušroubovice DNA, která je podobná plazmidu, ale není schopná autonomní replikace. Poté je jednoho vlákno DNA konjugativně přeneseno do recipientní buňky. Tato konjugace není shodná s běžným konjugativním přenosem plazmidů, protože na konjugativních transpozonech nejsou kódovány geny pro sex pilus a ostatní proteiny potřebné k běžnému konjugativnímu přenosu. Za konjugaci transpozonů jsou pravděpodobně zodpovědné peptidové feromony. Po přenosu DNA dochází v dárcovské i recipientní buňce k replikaci druhého vlákna DNA a vytvoření původní kruhové dvoušroubovice DNA transpozonu, který je integrován do genomu v obou buňkách.[13] Konjugativní transpozony mohou mobilizovat plazmidy, které nemají obvyklé vlastnosti mobilizovatelných plazmidů.[17]

Transponovatelné bakteriofágy

Transponovatelné bakteriofágy jsou viry, které mohou transponovat svou DNA do bakteriálního chromozomu, plazmidu nebo profága, během tohoto procesu často duplikují sekvenci obklopující jejich místo vložení. Tyto temperované fágy mohou zůstat ve svých hostitelských genomech jako latentní profágy (lysogenní cyklus) nebo se aktivně replikovat (lytický cyklus).[17]

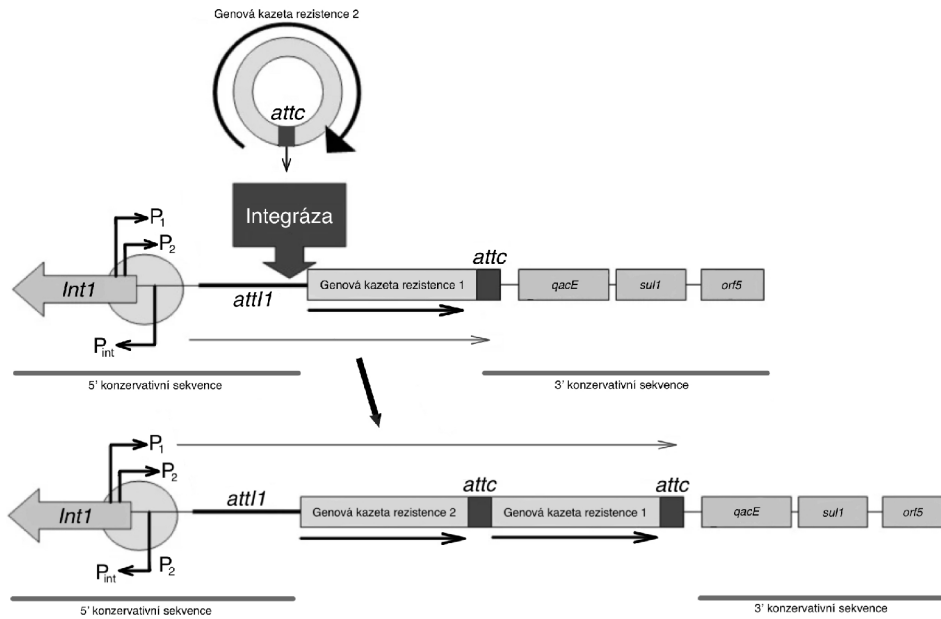
Inzerce tohoto elementu do genu, nebo jeho regulační sekvence, může vést k inaktivaci genu. Mutace vytvořené těmito elementy mají polární účinek. To znamená, že mutace v určité oblasti genu ovlivňuje čtení nebo regulaci genů v jeho blízkém okolí. Geny ve stejném operonu budou tedy také inaktivovány. Operon je úsek DNA pakaryot, který obsahuje více genů, ale funguje jako jedna transkripční jednotka.[17]

Transponovatelné bakteriofágy mohou vyvolat tvorbu různých genomových přeuspořádání, různé velikosti delecí nebo inverzí nebo tvorbu ko-integrátů, které vznikají kombinací dvou nebo více genetických elementů. Mohou také stimulovat mobilitu jiných bakteriofágů nebo vyvolat rekombinaci mezi transponovatelnými prvky.[17]

K přenosu genu rezistence dochází během lytického cyklu transponovatelného bakteriofágu, kdy jsou některé geny bakteriální rezistence zabaleny ve fágu. Pokud jsou jiné bakterie infikovány fágem, jsou tyto geny rezistence přenášeny.[14]

1.4.3 Integrony

Integrony jsou genetické elementy, které sdružují otevřené čtecí rámce a konvertují je do funkčních genů, poskytují jim silné promotory. Struktura integronu je zobrazena na obrázku 1.5.



Obr. 1.5: Struktura integronu a integrace genových kazet[18]

Genová kazeta rezistence se integruje mezi 5' a 3' konzervativní sekvence integronu, *Int1* - gen pro integrázu, P_{int} - promotor genu pro integrázu, *attI1* - vazebné místo pro integrázu na integronu, P_1 a P_2 - promotory genových kazet integrovaných v integronu, *attC* - vazebné místo pro integrázu na genové kazetě, *qacE*, *sul1* a *orf5* - geny rezistence a otevřené čtecí rámce.

Integrony obsahují gen pro integrázu (*Int1*) a promotor genu pro integrázu P_{int} . Integráza je enzym, který umožňuje integraci genových kazet do integronu. Vazebné místo integrázy na integronu je *attI1*. [18]

Genové kazety jsou významnou složkou, která se podílí na struktuře integronu. Jsou to mobilními elementy s kruhovou DNA, které se mohou vyskytovat volně v cytoplazmě. Narozdíl od plazmidů ale nejsou schopny autonomní replikace. Jsou tvořeny otevřeným čtecím rámcem a vazebným místem pro integrázu, *attC*. [13]

Genové kazety antibiotické rezistence jsou integrovány mezi 5' a 3' konzervativní sekvence integronu. Genové kazety nemají promotor před kódující sekvencí. Promotor umístěný v 5' konzervativní sekvenci integronu je tedy nezbytný pro expresi genových kazet. V integronech obsahuje 5' konzervativní sekvence dva potenciální promotory, P_1 a P_2 . [18]

Integrony se dělí do dvou hlavních skupin, superintegrony (SI), které čítají mnoho desítek genových kazet a jsou součástí chromozomu některých bakterií, a integrony, které sdružují geny rezistence na antibiotika (RI). Integrony se od sebe liší strukturou integrázy. Integrony nejsou mobilními elementy, ale mohou být mobilizovány, obvykle jako součást transpozonů. Všechny RI byly popsány jako součást mobilních elementů, proto byly samy integrony dříve považovány za mobilní elementy. [13]

Funkce integronů jako expresních jednotek je významná v šíření antibiotické rezistence, protože umožňuje současnou expresi všech integrovaných genových kazet najednou. Důsledkem toho je sdružená selekce rezistence ke všem antibiotikům, jejichž genové kazety jsou integrovány v integronu.[13]

1.4.4 Plazmidy

Plazmidy jsou molekuly dvouvláknové kruhové DNA schopné samostatné replikace v cytoplazmě bakterií. Obsahují geny nutné pro zahájení a kontrolu vlastní replikace a geny zajišťující trvalou přítomnost plazmidů u daného kmene, například gen, který synchronizuje replikaci plazmidu s buněčným dělením nebo geny, které umožňují konjugaci. Tyto geny nejsou pro bakterie esenciální, proto jsou plazmidy pro základní funkce bakterie postradatelné.[13] Některé plazmidy jsou kryptické a nemají žádné rozpoznatelné účinky na bakteriální buňky, které je obsahují.[8]

Proces horizontálního přenosu plazmidů se nazývá konjugace, aktivní (závislý na energii) kontaktní přenos genetické informace. Konjugace plazmidů je nejdůležitější způsob výměny genetické informace u bakterií. Konjugativní plazmid je takový plazmid, na kterém je kódován celý bílkovinný aparát, který je při konjugaci nutný pro přenos z dárcovské buňky do recipientní. Plazmidy, které jsou schopné konjugace pouze za účasti pomocného konjugativního plazmidu, se nazývají mobilizovatelné.[13]

Mnoho plazmidů kontroluje medicínsky důležité vlastnosti patogenních bakterií, včetně rezistence na jedno nebo několik antibiotik, produkce toxinů a syntézy struktur buněčného povrchu potřebných pro adheenci (interakce mezi strukturami na povrchu bakterií) nebo kolonizaci. Plazmidy, které určují rezistenci na antibiotika, se často nazývají R-plazmidy (R-faktory).[8]

2 Rezistence na antibiotika a těžké kovy

Šíření antimikrobiální rezistence prostřednictvím horizontálního přenosu genetické informace patří mezi jednu z nejzávažnějších výzev současné medicíny. Kvůli rostoucí rezistenci na antibiotika u patogenů se onemocnění způsobená těmito patogeny stávají vážnou hrozbou, jsou-li způsobena klony rezistentními na antibiotika.[19]

Zatímco antimikrobiální léky jsou nejvíce studovanými a běžně diskutovanými antimikrobiálními sloučeninami, bakterie mohou také obsahovat geny které kódují rezistenci na biocidy, které jsou důležité jako dezinfekční prostředky, a na kovy, které mají antimikrobiální účinky (např. měď, zinek).[20]

2.1 Zdroje genů rezistence na antibiotika

Antibiotika jsou kritickou složkou moderní medicíny, vyvinutá tak, aby vyvolávala prospěšné účinky na infekce vyvolané patogeny. Antibiotika běžně podléhají metabolismu nebo biotransformačním procesům v organismu, aby byly účinněji eliminovány. K vylučování těchto sloučenin a jejich metabolitů dochází hlavně močí, stolicí nebo kombinací obojího.[21]

Primárními zdroji kontaminace antibiotiky z lidské perspektivy proto jsou domácí, městské, nemocniční a průmyslové odpadní vody, akvakultura a intenzivní chov dobytka. Vzhledem k tomu, že stávající čistírny odpadních vod je nedokážou účinně odstraňovat, mohou se v detekovatelném množství dostávat do přírodních povrchových a podzemních vod. Slabou účinnost městských čistíren odpadních vod prokazuje detekce látek výhradně pro lidské použití. Kontaminace podzemních vod byla prokázána přítomností látek ve studních. Antibiotika, kromě jiných kontaminantů, mohou narušit mikroekosystém rozšířením rezistence vůči nim.[21]

Antibiotika nejsou striktně selektivní pouze vůči patogenům, takže při každém použití antibiotik je ovlivněn a podroben selekci na rezistentní klony nejen cílový patogen, ale také komenzální mikroflóra. Jakékoli použití antibiotik k potlačení infekce způsobené jedním bakteriálním patogenem tedy nevyhnutelně vede k selekci stovek komenzálních druhů, které jsou také vůči jejich působení odolné. Rezistentní komenzálové mohou později působit jako rezervoáry genů antibiotické rezistence.[19]

Střevní mikrobiota představuje komplexní ekosystém s ohromnou diverzitou. Skládá se z více než tisíce druhů bakterií, počet všech jejich genů (mikrobiom) převyšuje více než stokrát počet genů v lidském genomu.[22] Jedná se tedy o velmi rozsáhlé rezervoáry genů antibiotické rezistence. Testy provedené u kuřat prokázaly, že mikroflóra kuřecího střeva představuje důležitý zdroj genů rezistence na antibiotika[19]

2.2 Dopady antimikrobiální rezistence

Antimikrobiální látky umožnily pokrok v mnoha oblastech lékařské praxe. Úspěšné výsledky mnoha chirurgických zákroků a imunosupresivní léčby závisí na antibiotické profylaxi a schopnosti léčit infekční komplikace. Antimikrobiální rezistence proto představuje vážnou hrozbu pro velkou část zdravotnictví, jak ji známe. Má významné důsledky pro zdraví populace i ekonomické dopady.[23]

Počet případů infekcí, které jsou způsobeny bakteriemi zcela nebo téměř zcela rezistentními k antibiotikům, stále stoupá. Vzhledem k rostoucímu podílu populace ve věku nad 65 let, jejich vyšší míře komorbidit, a rostoucímu používání stále komplikovanějších lékařských postupů s přidruženými riziky infekce, může potřeba antimikrobiálních látek jen narůstat. Méně účinná antibiotika způsobí prodloužení doby hospitalizace, negativní dopad na výsledky mnoha chirurgických zákroků a imunosupresivní léčby a nedostatek perorálních antibiotik k léčbě infekcí v komunitě. Rostoucí počet neléčitelných infekcí a snížená účinnost empirických antibiotických režimů povede ke zvýšené morbiditě a mortalitě. Odhaduje se, že tisíce lidí ročně zemře na infekce získané v nemocnici způsobené rezistentními bakteriemi.[23]

Zatímco se antimikrobiální rezistence stále zvyšuje, zdroje pro vývoj nových antibiotik docházejí. Po osmi desetiletích používání antibiotik se bakteriální infekce, které byly kdysi snadno léčitelné, stávají neléčitelnými. Antibiotická rezistence koreluje s užíváním antibiotik, takže lepší antimikrobiální dohled s lepší prevencí a diagnostikou infekcí může pomoci zachovat v současnosti dostupná antimikrobiální činidla. Má-li vývoj nových antiinfekčních přípravků držet krok se zvyšující se rezistencí, je zapotřebí významných globálních akcí a investic, z veřejných i soukromých zdrojů.[23]

2.3 Detekce genů rezistence

Antimikrobiální rezistence (AMR) je hrozbou pro globální veřejné zdraví a identifikace genetických determinant antimikrobiální rezistence je kritickou součástí epidemiologických šetření.[20]

Kontrola a zkoumání antimikrobiální rezistence je velmi náročná i proto, že mnoho genetických determinant může být přeneseno a rozšířeno mezi různé typy bakterií. Pochopení, případně předvídání, vzniku a přenosu antimikrobiální rezistence vyžaduje charakterizaci determinant rezistence mezi patogeny a nepatogeny. Charakterizace celého mikrobiomu je nyní možná díky sekvenování nové generace (next-generation sequencing, high-throughput sequencing), které poskytuje přístup ke genetickým determinantům pro antimikrobiální rezistenci napříč všemi mikrobiálními genomy ve vzorku (tj. metagenomu). Rychlý vývoj v technologiích sekvenování nové

generace zpřístupnil tuto technologii výzkumníkům a mikrobiologům v rutinních laboratořích po celém světě.[24] Tento přístup zdůraznil význam mikrobiální ekologie při vzniku a perzistenci antimikrobiální rezistence, včetně interakce mezi procesy, jako je horizontální přenos genetické informace a křížová selekce.[20]

2.3.1 Databáze pro detekci genů rezistence

Existuje řada různých databází genů AMR. Různé databáze a jejich různá řešení splňují různé potřeby, proto se do značné míry spíše doplňují, než že si konkurují.[24]

Detekce a charakterizace genetických prvků, které zprostředkovávají AMR, je problematická z mnoha důvodů, z nichž mnohé souvisí s problémy s databázemi AMR. Jednak může mít evoluční dynamika AMR za následek rychle se hromadící sekvenční variace, což znamená, že databáze AMR musí být neustále aktualizovány, aby zahrnovaly nové varianty.

Kromě toho jsou genetické mechanismy antimikrobiální rezistence různé, což znamená, že identifikace genu AMR v rámci metagenomických datových souborů musí brát v úvahu geny AMR na základě mechanismu. Například databáze musí rozlišovat bodové mutace, které modifikují cílová místa antibiotik, oproti genovým sekvencím plné délky, které poskytují rezistenci, když jsou vyjádřeny jako funkční proteiny. To musí být zohledněno v rámci bioinformatického přístupu k identifikaci a počítání determinant rezistence v rámci metagenomických dat. Databáze by podle toho měla být strukturovaná.

Dále také existují geny, které jsou rezistentní na více sloučenin (včetně biocidů, kovů a antibiotik), zatímco jiné geny jsou rezistentní pouze na jednu sloučeninu.[20]

CARD

CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database, Komplexní databáze antibiotické rezistence) (<http://arpcard.mcmaster.ca>) je bioinformatická databáze genů rezistence, jejich produktů a souvisejících fenotypů. Obsahuje geny rezistence na antibiotika i těžké kovy. Je široce využívána ve výzkumu, diagnostice a monitorování rezistence bakterií.

CARD obsahuje nástroje pro analýzu molekulárních sekvencí, včetně BLAST a softwaru RGI. RGI (Resistance Gene Identifier, Identifikátor genu rezistence) (<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>) lze použít k predikci rezistomů z proteinových nebo nukleotidových dat na základě homologie a SNP modelů. Rezistom je termín, který se používá pro soubor všech genů a mechanismů, které umožňují mikroorganismům odolat účinkům antimikrobiálních látek. Tvoří širokou škálu genů, enzymů a transportních systémů, které jsou kódovány buď na chromozomu mikroorganismu nebo na mobilních genetických elementech.[25]

ResFinder

ResFinder (<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>) je online služba provozována na serveru CGE (Center for Genomic Epidemiology, Centrum pro genomickou epidemiologii). Jejím původním cílem bylo umožnit uživatelům s omezenými bioinformatickými zkušenostmi identifikovat geny antimikrobiální rezistence v datech získaných sekvenováním nové generace.[24]

Byl vyvinut tak, aby poskytoval volně dostupné, snadno použitelné online bioinformatické nástroje umožňující nezkušeným výzkumníkům a mikrobiologům provádět jednoduché bioinformatické analýzy. Software a databáze ResFinder jsou volně dostupné.[24]

Aktuální verze ResFinder je postavena na třech Git repozitářích, oddělujících databáze získaných genů (databáze ResFinder), bodové mutace (databáze PointFinder) a aplikaci ResFinder (software ResFinder). To umožňuje uživatelům s bioinformatickými zkušenostmi používat ResFinder offline a lokálně na svých počítačích a také ji podle potřeby začlenit do svých vlastních výzkumů. Pro splnění původního cíle ResFinder je poskytován také uživatelům s omezenými bioinformatickými schopnostmi prostřednictvím jednoho z webových nástrojů CGE.[24]

ResFinder se skládá z různých databází se známými geny, jako základ byla použita databáze CARD. Na základě literárních rešerší byla upravena se snahou zahrnout pouze geny AMR, které byly získány horizontálním přenosem genů. Neustále se vyvíjí a nejnovější funkce zahrnují předpovědi fenotypů na základě identifikovaných genů AMR. Rovněž byly implementovány druhově specifické predikce pro vybrané antimikrobiální látky, aby byly prezentovány pouze klinicky relevantní fenotypy pro tyto druhy a také aby byly zahrnuty fenotypy zprostředkované mutacemi. Srovnání, které bylo provedeno pro ResFinder 4.0, ukázalo shodu mezi genotypově předpovězenými a fenotypově detekovanými fenotypy v celkovém průměru nad 95 %.[24]

MobileElementFinder

MobileElementFinder (<https://cge.food.dtu.dk/services/MobileElementFinder/>) je nástroj k identifikaci mobilních genetických elementů a jejich vztahů ke genům antimikrobiální rezistence a faktorům virulence. Byl vyvinut tak, aby umožnil rychlou detekci MGE a jejich genetického kontextu v zarovnaných sekvenčních datech.[26]

MobileElementFinder je, stejně jako ResFinder, provozován jako online služba na serveru CGE. Online verze se liší od instalovatelné tím, že jsou v ní integrované ResFinder, VirulenceFinder nebo PlasmidFinder, které se používají k anotaci genů antimikrobiální rezistence, genů virulence a plazmidů. Databáze obsažená v MobileElementFinder byla vytvořena z nukleotidových sekvencí shromážděných z dat v NCBI

(National Center for Biotechnology Information, Národní centrum pro biotechnologické informace) RefSeq a GenBank s výjimkou syntetických a částečně mobilních prvků. Anotace a metadata byly shromážděny z databází The Transposon Registry (<https://transposon.lstmed.ac.uk>), ISfinder (<https://isfinder.biotoul.fr>) a ICEberg (<http://db-mml.sjtu.edu.cn/ICEberg/>). MGE jsou detekovány na základě sekvenční podobnosti s databází 4452 známých elementů.[26]

MEGARes

MEGARes (<https://megares.meglab.org>) je komplexní databáze genů antimikrobiální rezistence. Zahrnuje sekvence rezistence pro antimikrobiální léčiva a sekvence pro determinanty rezistence na kovy a biocidy.[20]

Důležitým aspektem databáze MEGARes je specifická anotace genů, které vyžadují přítomnost jednonukleotidových polymorfismů (SNP, single nucleotide polymorphisms) ve specifických lokusech ke vzniku rezistence. SNP je variace v jediném nukleotidu, která je v populaci přítomna v jisté patrné míře. Informace o SNP lze použít k integraci RGI (resistance gene identifier, identifikátor genu rezistence) pro potvrzení přítomnosti aminokyselinových zbytků potřebných k udělení rezistence.[20] RGI lze použít k predikci rezistomů z proteinových nebo nukleotidových dat na základě homologie a SNP modelů[27]. To usnadňuje analýzu SNP pro tyto geny a zároveň zlepšuje přesnost identifikace genu AMR z metagenomických dat[20].

MEGARes je strukturován jako relační databáze. Obsahuje sekvence antimikrobiální rezistence získané stažením a začleněním nových sekvencí z nejnovějších dostupných verzí CARD, Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database (Databáze referenčních genů bakteriální antimikrobiální rezistence) a ResFinder. Výsledná databáze MEGARes 2.0 obsahuje 7 868 unikátních sekvencí antimikrobiální rezistence. Uzly hierarchické ontologie zahrnují čtyři typy antimikrobiálních sloučenin, 57 tříd, 220 mechanismů rezistence a 1 345 skupin genů, které klasifikují 7 868 přístupů.[20]

ISEScan

ISEScan (<https://github.com/xiezhq/ISEScan>) je software k identifikaci inzerčních sekvencí v genomu. Standardně hlásí úplné i částečné IS elementy. Lze použít k identifikaci/anotaci IS elementů v jakékoli sekvenci DNA, ale byl testován pouze na prokaryotickém genomu včetně daft genomu a metagenomu. ISEScan při spuštění nejprve naskenuje sekvence ve FASTA souboru jednu po druhé, poté identifikuje IS elementy v každé sekvenci, nakonec vypíše všechny identifikované IS elementy pro každou sekvenci a statistiku identifikovaných IS elementů ze všech sekvencí ve vstupním souboru.[28]

ISfinder

ISfinder (<https://isfinder.biotoul.fr>) je databáze, která poskytuje seznam inzerčních sekvencí izolovaných z bakterií a archea. Obsahuje jejich obecné vlastnosti (jméno, velikost, původ nebo rodina), jejich DNA a potenciální proteinové sekvence. Zahrnuje také určité transpozony. Vyhledávač umožňuje vyhledání a zobrazení jednotlivých IS nebo skupin IS na základě kombinace jejich obecných vlastností. ISfinder také zahrnuje prohlížeč genomů ISbrowser, který umožňuje vizualizaci IS v určitých genomech, a ISsaga navržený tak, aby pomáhal při anotaci genomu IS.

ICEberg

ICEberg (<http://db-mml.sjtu.edu.cn/ICEberg/>) je databáze, která poskytuje komplexní informace o bakteriálních integrativních a konjugativních elementech (ICE). Mnoho ICE nese pravděpodobné determinanty virulence, geny antibiotické rezistence a geny kódující další vlastnosti prospěšné pro bakterie. ICEberg nabízí organizovaný, snadno prozkoumatelný archiv jak předpokládaných, tak experimentálně podporovaných ICE dat. Současně obsahuje podrobnosti o 1032 ICE. ICE často mobilizují integrativní a mobilizovatelné elementy (IME) a cis-mobilizovatelné elementy (CIME), které jsou v databázi také zahrnuty.[29]

ICEberg také poskytuje online nástroj ICEfinder pro predikci ICE nebo IME v sekvencích bakteriálního genomu. ICEfinder byl navržen tak, aby usnadnil rychlou detekci ICE a IME typu T4SS v sekvencích bakteriálního genomu. ICEfinder nejprve detekuje sekvence rekombinačních a konjugačních modulů. Hledá také oblast *oriT*. Poté lokalizuje, filtruje a seskupuje odpovídající gen. Prvky nesoucí gen integrázy, gen relaxázy a genové klastry T4SS jsou považovány za ICE, zatímco prvky bez T4SS, ale s integrázou a relaxázou, jsou označeny jako domnělé IME. ICEfinder se také pokouší detekovat některé konkrétní IME s integrázou a *oriT*, ale bez relaxázy.[29]

ICEberg poskytuje dobrou možnost pro pochopení biologických vlastností ICE, zejména proto, že jejich interakce s mobilizovatelnými elementy může dále podporovat horizontální přenos genů.[29]

INTEGRALL

INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt>) je volně dostupný textový vyhledávací systém vyvinutý s cílem shromažďovat a organizovat informace o integronech v jediné databázi. Aktuální verze obsahuje přes 4800 integronových sekvencí a poskytuje veřejné genetické repozitáře pro sekvenční data a nomenklaturu, které vědcům nabízí snadný a interaktivní přístup k sekvencím DNA integronu, jejich molekulárnímu uspořádání a jejich genetickým souvislostem.[30]

3 Analýza genů rezistence

3.1 Metody

3.1.1 Bakteriální izoláty

Do analýzy bylo zahrnuto celkem 452 izolátů bakteriálních anaerobů získaných ze zemědělských zvířat. Jedná se o komenzální bakterie, které nejsou cílem při užívání antibiotik. Slouží ale jako rozsáhle rezervoáry genů rezistence na antibiotika a těžké kovy. Tyto genomové sekvence jsou uloženy v NCBI.

3.1.2 Použité databáze

Pro detekci genů rezistence na antibiotika a těžké kovy u zástupců bakteriálních anaerobů byly na několika vybraných izolátech vyzkoušeny různé databáze, jako CARD, ResFinder, MobileElementFinder, MEGARes, ISfinder nebo ICEberg. Každá databáze je koncipována jinak, proto také každá databáze poskytuje trochu jiné výsledky, které se víceméně doplňují.

Pro analýzu všech 452 izolátů byla z vyzkoušených databází vybrána databáze CARD. Je velmi rozsáhlá a poskytuje komplexní informace o genových determinantech rezistence na antibiotika i těžké kovy, mnoho dalších databází ji uvádí jako zdroj informací, nebo jako svůj základ. Je považována za jednu z nejkompexnějších a nejaktuálnějších databází v oblasti genů rezistence. Její použití je snadné a rychlé, výhodou je také možnost provádět detekci genů na více genomových sekvencích najednou. Poté byla použita databáze MobileElementFinder ke zjištění, zda jsou detekované geny rezistence součástí známých MGE a přenáší se společně s nimi dál mezi různé bakterie.

3.2 Výsledky

Celkem 452 bakteriálních izolátů bylo klasifikováno do 9 kmenů: *Bacillota* (247 izolátů, z toho 52 % obsahovalo geny rezistence), *Bacteroidota* (113 izolátů, z toho 58 % obsahovalo geny rezistence), *Actinomycetota* (63 izolátů, z toho 21 % obsahovalo geny rezistence), *Pseudomonadota* (14 izolátů, z toho 21 % obsahovalo geny rezistence), *Fusobacteriota* (7 izolátů, z toho 57 % obsahovalo geny rezistence), *Thermodesulfobacteriota* (5 izolátů, z toho 20 % obsahovalo geny rezistence), *Elusimicrobiota* (1 izolát, neobsahoval žádné geny rezistence), *Synergistota* (1 izolát, neobsahoval žádné geny rezistence) a *Verrucomicrobiota* (1 izolát, neobsahoval žádné geny rezistence).

Klasifikace bakterií je detailněji popsána v tabulce 3.1, kde jsou uvedeny kmeny, třídy a řády bakteriálních izolátů zastoupených v analýze, počet bakteriálních izolátů v jednotlivých taxonomických kategoriích a poté počet bakteriálních izolátů, ve kterých byly detekovány nějaké geny rezistence.

Tab. 3.1: Klasifikace bakterií zastoupených v analýze.

Kmen	Třída	Řád	Počet bakterií	Počet rezistentních bakterií
<i>Actinomycetota</i>	<i>Actinomycetes</i>	<i>Acidaminococcales</i>	7	1
		<i>Actinomycetales</i>	3	2
		<i>Bifidobacteriales</i>	8	8
		<i>Micrococcales</i>	1	0
		<i>Propionibacteriales</i>	1	0
	<i>Coriobacteria</i>	<i>Coriobacteriales</i>	48	2
		<i>Eggerthellales</i>	2	1
<i>Bacillota</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	5	2
		<i>Lactobacillales</i>	59	18
	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacteriales</i>	140	99
	<i>Erysipelotrichia</i>	<i>Erysipelotrichales</i>	21	5
	<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	9	3
		<i>Veillonellales</i>	6	0
<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	113	65
<i>Elusimicrobiota</i>	<i>Elusimicrobia</i>	<i>Elusimicrobiales</i>	1	0
<i>Fusobacteriota</i>	<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteriales</i>	7	4
<i>Pseudomonadota</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	9	0
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Aeromonadales</i>	2	0
		<i>Enterobacterales</i>	3	3
<i>Synergistota</i>	<i>Synergistia</i>	<i>Synergistales</i>	1	0
<i>Thermodesulfobacteriota</i>	<i>Desulfovibrionia</i>	<i>Desulfovibrionales</i>	5	1
<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	1	0

3.2.1 Geny rezistence

Porovnání s databází CARD ukázalo, že téměř polovina (214 izolátů, 47,3 % z celkových 452 izolátů) bakteriálních izolátů obsahovala alespoň 1 gen rezistence na antibiotika nebo těžké kovy. Seznam všech bakteriálních izolátů včetně jejich klasifikace a počtu detekovaných genů je uveden v tabulce v příloze 1. V příloze 2 je tabulka se všemi detekovanými geny pomocí databáze CARD, jsou zde uvedeny izoláty, ve kterých byly detekovány geny rezistence, scaffold, na kterém se daný gen nachází a číslo genu, pozice (start a stop), na které se v daném scaffoldu nachází detekovaný gen, název genu, procentuální shoda genu a sekvence, skupina antibiotik, na kterou poskytuje gen rezistenci, a mechanismus rezistence.

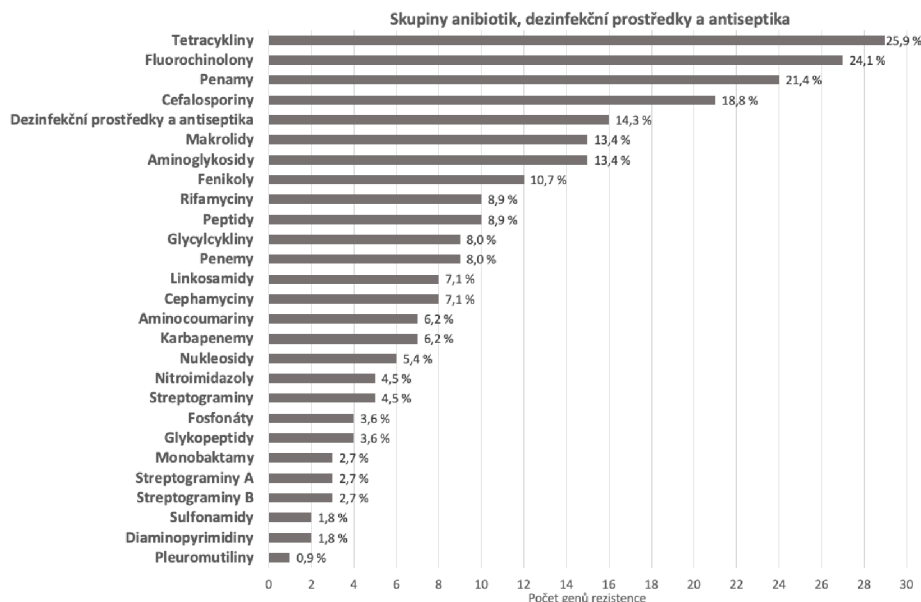
V 214 bakteriálních izolátech bylo celkově detekováno 446 genů rezistence na antibiotika a těžké kovy. Jednalo se o 112 různých genů. Z toho 72 genů poskytuje rezistenci na 1 skupinu antibiotik, 12 genů poskytuje rezistenci na 2 skupiny antibiotik, 9 genů poskytuje rezistenci na 3 skupiny antibiotik, 5 genů poskytuje rezistenci na 4 skupiny antibiotik, 4 geny poskytují rezistenci na 5 skupin antibiotik, 1 gen poskytuje rezistenci na 6 skupin antibiotik, 5 genů poskytuje rezistenci na 8 skupin antibiotik, 1 gen poskytuje rezistenci na 9 skupin antibiotik, 2 geny poskytují rezistenci na 12 skupin antibiotik a 1 gen (*TolC*) poskytuje rezistenci na 15 skupin antibiotik. Z toho 105 genů poskytuje 1 mechanismus rezistence, 6 genů poskytuje 2 různé mechanismy rezistence a 1 gen (*Escherichia coli soxS* s mutací udělující antibiotickou rezistenci) poskytuje 3 různé mechanismy rezistence. Seznam jednotlivých genů s počtem izolátů, ve kterých byly detekovány, s počtem a výpisem skupin antibiotik, na které poskytují rezistenci, a s počtem a výpisem jejich mechanismů rezistence jsou uvedeny v tabulce v příloze 3.

Gen *tet(W)* byl nejčastěji detekovaný gen. Byl detekován v 75 izolátech. Poskytuje rezistenci na tetracykliny. Mechanismus rezistence je ochrana cílové struktury antibiotika. Další hojně detekované geny byly *tet(Q)* (ve 40 izolátech), *Mef(En2)* (ve 26 izolátech), *tet(O)* (ve 26 izolátech) a *lnuC* (ve 22 izolátech). Ostatní geny se vyskytovaly v méně než 10 izolátech.

Nejvíce genů rezistence bylo detekováno v bakteriálních izolátech *Escherichia*, které patří do kmene *Pseudomonadota*, třídy *Gammaproteobacteria* a řádu *Enterobacterales*. Izolát *Escherichia coli An190* obsahoval 53 různých genů rezistence, izolát *Escherichia coli An786* obsahoval 48 různých genů rezistence a izolát *Escherichia fergusonii ET78* také obsahoval 48 různých genů rezistence na různé skupiny antibiotik, dezinfekční prostředky a antiseptika. Ostatní izoláty obsahovaly méně než 7 různých genů rezistence.

Antimikrobiální látky

V bakteriálních izolátech byly detekovány geny, které poskytovaly rezistenci na 27 různých skupin antibiotik, dezinfekčních prostředků a antiseptik. Jejich zastoupení je zobrazeno v grafu na obrázku 3.1, v grafu je také zobrazeno procentuální zastoupení genů (z celkových 112), které poskytují rezistenci na dané látky.



Obr. 3.1: Skupiny antibiotik, definfekční prostředky a antiseptika

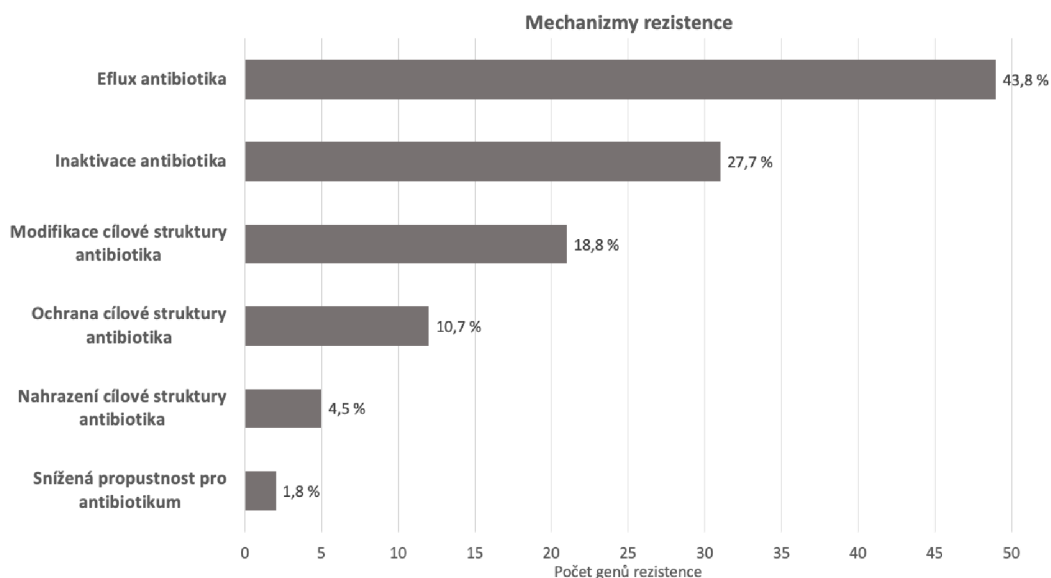
V grafu jsou zobrazeny jednotlivé skupiny antibiotik, dezinfekční prostředky a antiseptika, které byly detekovány v bakteriálních izolátech, v závislosti na počtu genů, které poskytovaly rezistenci na dané látky. Procenta vyjadřují zastoupení genů (z celkových 112), které poskytovaly rezistenci na danou látku, 1 gen mohl poskytovat rezistenci na více různých skupin antibiotik.

Nejvíce detekovaných genů poskytovalo rezistenci na tetracykliny (29 z celkových 112). Tetracykliny jsou skupinou širokospektrálních antibiotik, která se používají k léčbě infekcí způsobených různými bakteriemi. Patří mezi semisyntetická antibiotika odvozená z přírodního zdroje. Inhibují bakteriální růst tím, že se vážou na ribozomy. Interferují tak s procesem syntézy proteinů. Blokováním ribozomální funkce zabraňují bakteriím v tvorbě nových proteinů a tím brání jejich růstu a množení.[31]

Celkem 162 bakteriálních izolátů (35,8 % z celkových 452) obsahovalo alespoň 1 gen rezistence na tetracykliny. Rezistenci na tetracykliny poskytovalo 27 různých genů. Gen *tet(W)* byl detekován v 75 izolátech, *tet(Q)* byl detekován ve 40 izolátech, *tet(O)* byl detekován ve 26 izolátech, *tet(40)*, *tet(O/W)* a *tetB(P)* byly detekovány v 6 izolátech a *tet(M)* byl detekován v 5 izolátech, zbytek genů rezistence na tetracykliny byl detekován v méně než 4 izolátech. Mezi mechanismy rezistence těchto genů patří ochrana cílové struktury antibiotika a eflux antibiotika.

Mechanismy rezistence

V bakteriálních izolátech byly detekovány geny, které poskytovaly 6 různých mechanismů rezistence. Jejich zastoupení je zobrazeno v grafu na obrázku 3.2, v grafu je také zobrazeno procentuální zastoupení genů (z celkových 112), které poskytují daný mechanismus rezistence.



Obr. 3.2: Mechanismy rezistence

V grafu jsou zobrazeny jednotlivé mechanismy rezistence v závislosti na počtu genů, které poskytují daný mechanismus rezistence. Procenta vyjadřují zastoupení detekovaných genů (z celkových 112), které poskytovaly daný mechanismus rezistence, 1 gen mohl poskytovat více různých mechanismů.

Nejvíce genů, 43,8 % (49 z celkových 112), poskytovalo mechanismus rezistence eflux antibiotik. V bakteriálních izolátech byl detekován celkově 160krát. Tento mechanismus spočívá v aktivním vylučování antibiotika z bakteriální buňky pomocí speciálních transportních proteinů, které působí jako pumpy (efluxní pumpy). Tyto proteiny odčerpávají antibiotikum z buněčného prostoru do vnějšího prostředí a zabraňují tím jeho vazbě a koncentraci na cílových strukturách, kde by mohlo vyvinout svůj účinek.[32]

Inaktivaci antibiotika poskytovalo 27,7 % genů (31 z celkových 112). V bakteriálních izolátech byl detekován celkově 74krát. Tento mechanismus spočívá v enzymatické inaktivaci antibiotik v bakteriální buňce. Bakterie mohou produkovat enzymy, které umožní rozklad antibiotika na neaktivní metabolity. Antibiotikum poté nedokáže interagovat s cílovou strukturou nebo vykazovat své baktericidní (zabíjení bakterií) nebo bakteriostatické (inhibice růstu a reprodukce bakterií) účinky.[33]

Modifikaci cílové struktury antibiotika poskytovalo 18,8 % genů (21 z celkových 112). V bakteriálních izolátech byl detekován celkově 51krát. Tento mechanismus spočívá v modifikaci cílových struktur antibiotik. Dochází k mutaci nebo změně cílové struktury. Antibiotika často působí na specifické molekulární cíle v buňce, jako jsou enzymy, bílkoviny nebo ribozomy, které jsou nezbytné pro život a funkci bakterií. Bakterie mění strukturu nebo vlastnosti cílové struktury tak, aby se na ni antibiotikum již nedokázalo vázat nebo působit. To zabraňuje antibiotiku v jeho účinném působení.[34]

Ochranu cílové struktury antibiotika poskytovalo 10,7 % genů (12 z celkových 112). V bakteriálních izolátech byl detekován nejvícekrát, celkově 167krát, hlavně proto, že ho poskytovaly dva nejčastěji detekované geny *tet(W)*, *tet(Q)* a jiné často detekované geny rezistence na tetracykliny. Tento mechanismus spočívá v ochraně cílových struktur antibiotik, které jsou v bakteriální buňce zodpovědné za buněčné procesy a přežití. Bakterie vyvinou ochranný mechanismus, který zabraňuje antibiotiku v navázání nebo účinku na cílovou strukturu. Ochranný mechanismus může být změna vazebných vlastností cílové struktury nebo tvorba ochranných proteinů, které brání působení antibiotika. Antibiotikum poté není schopno se na cílovou strukturu vázat nebo inhibovat její aktivitu.[33]

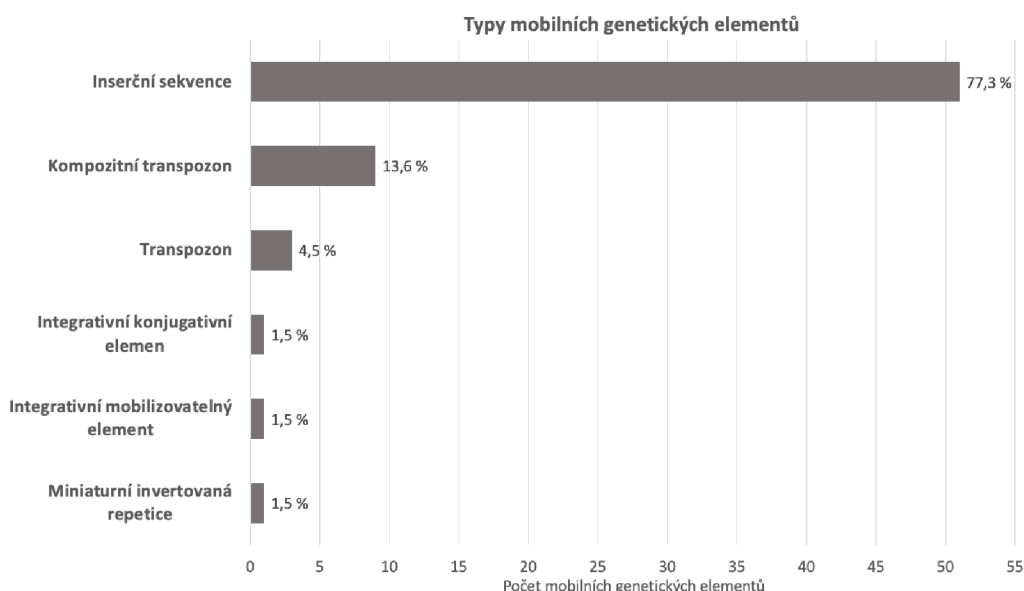
Nahrazení cílové struktury antibiotika poskytovalo 4,5 % genů (5 z celkových 112). V bakteriálních izolátech byl detekován celkově 15krát. Tento mechanismus spočívá v nahrazení cílových struktur antibiotik v bakteriální buňce novými, odlišnými proteiny, které se nemohou vázat na antibiotikum. Tím se antibiotikum stává neúčinné, protože není schopné se vázat na novou cílovou strukturu nebo na ni působit.[33]

Nejméně zastoupeným mechanismem mezi detekovanými geny byla snížená propustnost pro antibiotikum, poskytovalo ji 1,8 % genů (2 z celkových 112). V bakteriálních izolátech byl detekován celkově 6krát. Tento mechanismus spočívá v redukcii propustnosti membrány bakterie pro antibiotika, což zabraňuje jejich vstupu do buněčného prostoru a tím i jejich účinku na cílové struktury. Změna propustnosti membrány může být způsobena snížením počtu nebo změnou struktury porinů, což jsou buněčné proteiny umožňující průchod látek přes membránu, nebo zvýšením vývoje vnější membrány s nižší propustností. Díky těmto změnám se bakterie stávají méně citlivé na antibiotika, protože je méně pravděpodobné, že se antibiotika dostanou dovnitř buňky a budou působit na cílové struktury.[33]

3.2.2 Mobilní genetické elementy

Pomocí nástroje a databáze MobileElementFinder bylo v bakteriálních izolátech identifikováno celkově 159 MGE. V příloze 4 je tabulka se všemi detekovanými MGE pomocí MobileElementFinder, jsou zde uvedeny izoláty, ve kterých byly detekovány MGE, název a typ MGE, scaffold, na kterém se daný MGE nachází, pozice (start a stop), na které se v daném scaffoldu nachází detekovaný MGE, a délka MGE. Poté jsou v tabulce uvedeny geny rezistence, které se na daném MGE nachází, včetně scaffoldu, pozice (start a stop) a délky genu. Jednalo se o 66 různých MGE. Jejich seznam je uvedený v tabulce v příloze 5, ve které je název a typ MGE, počet izolátů, ve kterých byl MGE detekovaný, a gen rezistence, který se na MGE nachází.

V bakteriálních izolátech bylo detekováno 6 typů MGE. Jejich zastoupení je zobrazeno v grafu na obrázku 3.3, v grafu je také zobrazeno procentuální zastoupení typů MGE (z celkových 66).



Obr. 3.3: Typy mobilních genetických elementů

V grafu jsou zobrazeny jednotlivé typy mobilních genetických elementů v závislosti na počtu jednotlivých mobilních genetických elementů detekovaných v bakteriálních izolátech. Procenta vyjadřují zastoupení jednotlivých typů (z celkových 66).

Nejčastěji detekovaným typem MGE, 77,3 % (51 z celkových 66), byly inzerční sekvence. V bakteriálních izolátech byly detekovány celkově 106krát. Nejčastěji se vyskytující inzerční sekvence byla *ISEnfa110*, která byla detekována ve 24 izolátech. Inzerční sekvence *IS612* byla detekována v 8 izolátech, *ISLjo1* byla detekována v 6 izolátech a *IS614*, *ISBf3*, *ISBf6* a *ISLhe4* byly detekovány ve 3 různých izolátech. Ostatní inzerční sekvence se vyskytovaly v méně než 3 izolátech.

Mezi detekovanými MGE se vyskytovalo 13,6 % (9 z celkových 66) kompozitních transpozonů. Kompozitní transpozony *cn_1731_ISLhe30* a *cn_3635_ISS1W* se vyskytovaly ve 2 různých izolátech. Na poslední pozici v názvu kompozitního transpozonu je vždy uvedena obsažená inzerční sekvence (*ISLhe30* a *ISS1W*). Ostatní kompozitní transpozony se vyskytovaly v 1 izolátu.

Mezi detekovanými MGE se vyskytovalo 4,5 % (3 z celkových 66) transpozonů. Transpozony *Tn2*, *Tn917* a *Tn6082* se vyskytovaly každý v 1 izolátu.

Mezi detekovanými MGE byl 1 integrativní mobilizovatelný element *MTnSag1* (též *tISSag10*), který se vyskytoval ve 21 izolátech, 1 miniaturní invertovaná repetic *MITEEc1*, která se vyskytovala v 11 izolátech, a 1 integrativní konjugativní element *Tn6009*, který se vyskytoval ve 3 izolátech.

Jen 4 MGE z celkových 66 obsahovaly ve své struktuře detekované geny rezistence (tabulka 3.2). Ostatní MGE se nacházely buď na scaffoldu těsně před nebo za detekovaným genem rezistence, nebo na jiném scaffoldu, než detekované geny rezistence.

Tab. 3.2: Mobilní genetické elementy s geny rezistence.

Název MGE	Typ MGE	Počet izolátů	Gen rezistence
<i>MTnSag1</i> ; (<i>tISSag10</i>)	Integrativní mobilizovatelný element	21	<i>lnuC</i>
<i>cn_4228_ISBbi1</i>	Kompozitní transpozon	1	<i>sul2</i>
			<i>APH(3'')-Ib</i>
			<i>APH(6)-Id</i>
<i>Tn2</i>	Transpozon	1	<i>TEM-1</i>
<i>Tn917</i>	Transpozon	1	<i>ErmB</i>

Integrativní mobilizovatelný element *MTnSag1* (nebo *tISSag10*) byl detekován ve 21 izolátech a obsahoval ve své struktuře gen *lnuC*, který poskytuje rezistenci na linkosamidy. Kompozitní transpozon *cn_4228_ISBbi1* byl detekován v izolátu *Bacteroides xyloxylovens An931* a obsahoval ve své struktuře 3 geny rezistence, *sul2*, který poskytuje rezistenci na sulfonamidy, *APH(3'')-Ib*, který poskytuje rezistenci na aminoglykosidy, a *APH(6)-Id*, který také poskytuje rezistenci na aminoglykosidy. Transpozon *Tn2* byl detekován v izolátu *Escherichia coli An190* a obsahoval ve své struktuře gen *TEM-1*, který poskytuje rezistenci na monobaktamy, cefalosporiny, penamy a penemy. Transpozon *Tn917* byl detekován v izolátu *Enterococcus cecorum An144* a obsahoval ve své struktuře gen *ErmB*, který poskytuje rezistenci na makrolidy, linkosamidy, streptograminy, streptograminy A a streptograminy B.

4 Diskuze

Šíření antimikrobiální rezistence horizontálním přenosem genetické informace je jednou z nejzávažnějších výzev současné medicíny. Tato práce se zabývala šířením genů antimikrobiální rezistence mezi komenzálními bakteriemi izolovanými ze zemědělských zvířat. Jedná se tedy o bakterie, které nikdy nebyly cílem antimikrobiální terapie. I přes to výsledky ukazují, že téměř polovina izolátů (214 izolátů, 47,3 % z celkových 452 izolátů) obsahovala alespoň 1 gen rezistence na antibiotika nebo těžké kovy. Celkově bylo v bakteriálních izolátech detekováno 446 genů rezistence na antibiotika a těžké, jednalo se o 112 různých genů.

Toto číslo může být ve skutečnosti mnohonásobně vyšší, protože byly detekovány pouze geny, které jsou obsaženy v databázích CARD a MobileElementFinder. Evoluční dynamika genů antimikrobiální rezistence má za následek hromadění sekvencních variací, které můžou být dost odlišné od variant zaznamenaných v databázi. Navíc se jedná o draft genomy, genom organismu je tedy sestaven ze scaffoldů, jejichž přesnou polohu v genomu neznáme. To znamená, že tam některé segmenty chybí, nebo tam jsou naopak vícekrát, že jsou ve špatném pořadí, nebo v opačné orientaci. Při detekci se tedy gen nemusí ukázat, i přes to, že je tam skutečně přítomný.

I s tímto omezením byly detekovány geny rezistence na 27 různých skupin antibiotik a na těžké kovy, které se můžou používat jako dezinfekční prostředky nebo antiseptika. Nejvíce genů (25,9 %) kódovalo rezistenci na tetracykliny, a to pravděpodobně kvůli širokému použití tetracyklinů jako přísad do krmiv a stimulátorů růstu[19]. Bylo detekováno 6 různých mechanismů rezistence, z nichž nejčtenější (43,8 %) byl podle očekávání eflux antibiotika.

Nejčastěji detekovaným genem rezistence byl gen *tet(W)*, který byl detekován v 16,6 % (75 z celkových 452) bakteriálních izolátů, ve 2 různých kmenech a 7 různých řádech, v kmenu *Bacillota* a řádech *Eubacteriales*, *Lactobacillales* a *Selenomonadales*, a v kmenu *Actinomycetota* a řádech *Actinomycetales*, *Bifidobacteriales*, *Coriobacteriales* a *Eggerthellales*. Gen *tet(W)* se uvádí jako jeden z nejrozšířenějších genů rezistence na tetracykliny, přítomný v anaerobních bakteriích. Většina získaných *tet* genů se přesouvá mezi nepříbuznými druhy konjugací.[35]

Výsledky dále ukazují, že v bakteriálních izolátech obsahujících geny rezistence se nacházelo 159 mobilních genetických elementů, jednalo se o 66 různých MGE. Z toho jen 4 MGE ve své struktuře prokazatelně obsahovaly geny rezistence, které se prostřednictvím těchto MGE mohou šířit mezi bakteriemi. Podle toho bychom mohli předpokládat, že geny rezistence na těchto mobilních elementech jsou přenositelné, a ostatní geny rezistence jsou zakotveny v chromozomu.

MGE jsou úseky DNA definované jejich schopností pohybovat se uvnitř a/nebo mezi bakteriálními buňkami. Jsou řazeny do typů na základě jejich vlastností a ge-

netického uspořádání. Detekováno bylo 6 typů.

Nejčastěji detekovaným typem MGE byly inzerční sekvence. Inzerční sekvence neobsahují geny rezistence. Často se ale nacházely těsně před nebo za detekovaným genem rezistence. Jejich invertované repetice slouží jako silné promotory. Zvyšují tak expresi genů nacházejících se za inzerčními sekvencemi. Tím hrají významnou roli v šíření antimikrobiální rezistence. Mohou také podporovat mobilitu vytvářením kompozitních transpozonů.[26]

Kompozitní transpozony byly dalším často detekovaným typem MGE. Ve své struktuře mohou obsahovat geny rezistence a na krajích jsou ohraničené dvěma inzerčními sekvencemi v opačné orientaci. Opět tak mohou zvyšovat expresi genů. Kompozitní transpozon *cn_4228_ISBbi1* obsahoval 3 geny rezistence, *sul2*, *APH(3'')-Ib* a *APH(6)-Id*, a inzerční sekvenci *ISBbi1*.

Integrativní mobilizovatelné elementy a integrativní konjugativní elementy jsou větší MGE schopné konjugace. Mohou se buď konjugovat nezávisle, nebo být komobilizovány konjugací jiných prvků.[26] Mohou nést mnoho přídatných genů a dalších MGE. Integrativní mobilizovatelný element *MTnSag1* (též *tISSag10*) obsahoval ve své struktuře gen rezistence *lnuC*. Byl detekován ve 21 izolátech ze dvou kmenů a 7 řádů, v kmenu *Bacillota* a řádech *Acidaminococcales*, *Eubacteriales*, *Erysipelotrichales*, *Lactobacillales* a *Selenomonadales*, a v kmenu *Fusobacteriota* a řádu *Fusobacteriales*.

Transpozony mohou nést přídatné geny a další MGE. Transpozon *Tn2* obsahoval ve své struktuře gen rezistence *TEM-1* a transpozon *Tn917* obsahoval ve své struktuře gen rezistence *ErmB*. Miniaturní invertované repetice jsou neautonomní inzerční sekvence nebo transpozony, které prošly delecemi ve svých základních genech, ale zachovaly si invertované repetice a mohou vytvářet struktury podobné kompozitním transpozonům.[26] V 11 izolátech byla detekována miniaturní invertovaná repetice *Tn6009*, která se skládá z konjugativního transpozonu *Tn916* spojeného s *Staphylococcus aureus mer* operonem.

MGE vzájemně interagují a vytvářejí komplexní síť s potenciálem získávat a šířit geny v celé bakteriální populaci. Tím hrají klíčovou roli v AMR. Schopnost identifikovat a charakterizovat MGE je zásadní pro objasnění epidemiologie AMR.[26]

Je nutné podotknout, že to, že je v genomu bakterie detekovaný gen rezistence, nemusí znamenat, že je gen funkční. Aby byl gen aktivní, musí být exprimovaný. Exprese genu by se měla experimentálně ověřit. To se ale ve většině genomických studiích nedělá, *in silico* analýzy to pouze nějakým způsobem predikují. Naopak to, že v genomu bakterie nebyl detekovaný žádný gen rezistence, nemusí znamenat, že bakterie nemá žádný takový gen. Znamená to jen, že nic v použité databázi genů rezistence rezistenci nenaznačuje, a že gen není součástí databáze.

Závěr

Cílem bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši zabývající se detekcí genů rezistence na antibiotika a těžké kovy u bakterií, seznámit se s veřejnými databázemi pro detekci genů rezistence a horizontálního přenosu a navrhnout metodu pro detekci a detailní charakterizaci těchto genů z genomických dat bakteriálních anaerobů.

Nejprve byl popsán horizontální přenos genetické informace, jeho nejvíce známé mechanismy konjugace, transformace a transdukce, a mobilní genetické elementy. Poté byla popsána problematika rezistence na antibiotika a těžké kovy a byly uvedeny různé příklady databází pro detekci genů zprostředkovávajících rezistenci a mobilních genetických elementů. Následně byla provedena detekce a analýza genů rezistence a mobilních genetických elementů z genomických dat bakteriálních izolátů.

Pro detekci genů rezistence a mobilních genetických elementů byly použity databáze CARD a MobileElementFinder. V bakteriálních izolátech bylo detekováno 446 genů rezistence na antibiotika a těžké, jednalo se o 112 různých genů. Nejvíce genů rezistence poskytovalo podle očekávání rezistenci na tetracykliny, nejčteněji detekovaný gen byl *tet(W)*.

Poté bylo v bakteriálních izolátech detekováno 159 mobilních genetických elementů, jednalo se o 66 různých MGE, které se dělily na 6 typů. Jen 4 MGE obsahovaly ve své struktuře detekované geny rezistence, které se prostřednictvím těchto MGE mohou šířit bakteriemi.

Literatura

- [1] BENCKO, Vladimír a Petr ŠÍMA. Horizontální přenos genetické informace a jeho význam pro vznik antibiotické rezistence. *Časopis lékařů českých*. 2018, 157(3), 141-145.
- [2] BENCKO, Vladimír a Petr ŠÍMA. Antibiotická rezistence a význam horizontálního přenosu genetické informace. *Praktický lékař*. 2018, 98(5), 195-199.
- [3] SOUCY, S. M., J. HUANG a J. P. GOGARTEN. Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature Reviews Genetics*, 2015, 16(8): 472-482.
- [4] FROST, L. S., R. LEPLAE, A. SUMMERS, et al. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*. 2005, 3(9), 722-732.
- [5] BELLO-LÓPEZ, J. M., O. A. CABRERO-MARTÍNEZ, G. IBÁÑEZ-CERVANTES, et al. Horizontal gene transfer and its association with antibiotic resistance in the genus *Aeromonas* spp. *Microorganisms*. 2019, 7(9), 363.
- [6] LLOSA, M., F. X. GOMIS-RÜTH, M. COLL, et al. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Molecular microbiology*. 2002, 45(1), 1-8.
- [7] WATERS, Virginia L. Conjugation between bacterial and mammalian cells. *Nature genetics*. 2001, 29(4), 375-376.
- [8] HOLMES, Randall K a Michael G. JOBLING. *Medical Microbiology: Genetics* [online]. 4th edition. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996 [cit. 2022-12-06]. ISBN 10: 0-9631172-1-1. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7908/>
- [9] WONG, J. J. W., J. LU a J. N. M. GLOVER. Relaxosome function and conjugation regulation in F-like plasmids – a structural biology perspective. *Molecular microbiology*. 2012, 85(4), 602-617.
- [10] PAUL, John H. a Sunny C. JIANG. Lysogeny and transduction. *Methods in microbiology*. 2001, Academic Press, Vol. 30, 105-125.
- [11] MAURICE, C. F., C. BOUVIER, R. DE WIT, et al. Linking the lytic and lysogenic bacteriophage cycles to environmental conditions, host physiology and their variability in coastal lagoons. *Environmental microbiology*. 2013, 15(9), 2463-2475.

- [12] MAHILLON, Jacques a Michael CHANDLER. Insertion sequences. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998, 62(3), 725-774.
- [13] HRABÁK, J., A. ZEMANOVÁ a E. CHUDÁČKOVÁ. Mobilní genetické elementy v epidemiologii rezistence bakterií k antibiotikům. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie*. 2010, 59(2), 55-66.
- [14] BABAKHANI, Sajad a Mana OLOOMI. Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *Journal of basic microbiology*. 2018, 58(11), 905-917.
- [15] GORYSHIN, Igor Yu a William S. REZNIKOFF. Tn5 in vitro transposition. *Journal of Biological Chemistry*. 1998, 273(13), 7367-7374.
- [16] HALLET, Bernard a David J. SHERRATT. Transposition and site-specific recombination: adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements *FEMS Microbiology Reviews*. 1997, 21(2), 157-178.
- [17] DARMON, Elise a David R. F. LEACH. Bacterial genome instability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2014, 78(1), 1-39.
- [18] CARATTOLI, Alessandra. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*. 2001, 32(3-4), 243-259.
- [19] JURICOVA H., J. MATIASOVICOVA, T. KUBASOVA, et al. The distribution of antibiotic resistance genes in chicken gut microbiota commensals. *Scientific Reports*. 2021, 11(1), 3290.
- [20] DOSTER E., S. M. LAKIN, C. J. DEAN, et al. MEGARes 2.0: a database for classification of antimicrobial drug, biocide and metal resistance determinants in metagenomic sequence data. *Nucleic acids research*. 2020, 48(D1), D561-D569.
- [21] VIANA, P., L. MEISEL, A. LOPES, et al. Identification of antibiotics in surface-groundwater. A tool towards the ecopharmacovigilance approach: a Portuguese case-study. *Antibiotics*. 2021, 10(8), 888.
- [22] TLASKALOVÁ HOGENOVÁ, H., Z. JIRÁSKOVÁ ZÁKOSTELSKÁ, J. PETANOVÁ, et al. Mikrobiota, imunita a imunologicky mediované choroby. *Vnitřní lékařství*. 2019, 65(2), 98-107.
- [23] MACGOWAN, Alasdair a Emily MACNAUGHTON. Antibiotic resistance. *Medicine*. 2017, 45(10), 622-628.
- [24] FLORENSA, A. F., R. S. KAAS, P. T. L. C. CLAUSEN, et al. ResFinder - an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in

- next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microbial Genomics*. 2022, 8(1), 000748.
- [25] ALCOCK, B. P., W. HUYNH, R. CHALIL, et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*. 2022, 51(D1), D690-D699.
- [26] JOHANSSON, M. H. K., V. BORTOLAIA, S. TANSIRICHAIIYA, et al. Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2021, 76(1), 101-109.
- [27] CARD: Comprehensive Antibiotic Resistance Database [online]. [cit. 2022-12-27]. Dostupné z: <https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>
- [28] XIE, Zhiqun a Haixu TANG. ISEScan: automated identification of insertion sequence elements in prokaryotic genomes. *Bioinformatics*. 2017, 33(21), 3340-3347.
- [29] LIU, M., X. LI, Y. XIE, et al. ICEberg 2.0: an updated database of bacterial integrative and conjugative elements. *Nucleic acids research*. 2019, 47(D1), D660-D665.
- [30] MOURA, A., M. SOARES, C. PEREIRA, et al. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics*. 2009, 25(8), 1096-1098.
- [31] CHOPRA, Ian a Marilyn ROBERTS. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2001, 65(2), 232-260.
- [32] WEBBER, M. A. a L. J. V. PIDDOCK. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2003, 51(1), 9-11.
- [33] BLAIR, J. M. A., M. A. WEBBER, A. J. BAYLAY, et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*. 2015, 13(1), 42-51.
- [34] SPRATT, Brian G. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science*. 1994, 264(5157), 388-393.
- [35] ROBERTS, Marilyn C. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS microbiology letters*. 2005, 245(2), 195-203.