

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav mikrobiologie

**CHARAKTERIZACE BAKTERIÁLNÍCH PATOGENŮ, VČETNĚ GENŮ
REZISTENCE, POMOCÍ PCR A ANALÝZY KŘIVKY TÁNÍ**

Doktorská dizertačná práca

Pod'akovanie

Rada by som touto cestou poďakovala svojmu školiteľovi prof. MUDr. Milanovi Kolářovi, Ph.D. za pomoc v priebehu celého doktorského štúdia a za cenné rady, námety a odborné vedenie pri spracovávaní danej problematiky.

Pod'akovanie tiež patrí doc. MUDr. Dagmar Koukalovej, CSc. za cenné pripomienky k dizertačnej práci a rovnako aj mojím kolegom Mgr. Pavlovi Sauerovi, Ph.D., Mgr. Taťáne Štosovej, Ph.D., Mgr. Kristýne Hricovej, Mgr. Vendule Husičkovej, MVDr. Janovi Bardoňovi, Ph.D., MBA a ďalším, ktorí sa akýmkoľvek spôsobom podieľali na realizácii mojej dizertačnej práce.

V neposlednom rade by som chcela poďakovať svojej rodine a priateľom za ich neustálu morálnu podporu.

Čestné vyhlásenie

Čestne vyhlasujem, že doktorskú prácu s názvom „Charakterizace bakteriálních patogenů, včetně genů rezistence, pomocí PCR a analýzy křivky tání“ som vypracovala samostatne. Použitú literatúru a všetky podkladové materiály uvádzam v priloženom zozname literatúry.

V Olomouci dňa.....

.....

Podpis

OBSAH

1	ÚVOD	8
1.1	Problematika bakteriálnej rezistencie	9
1.2	Mechanizmy bakteriálnej rezistencie a ich genetická podstata	9
1.2.1	Modifikácia cieľovej štruktúry	9
1.2.2	Zhoršený prienik antibiotika daný zmenou permeability bunkovej steny	10
1.2.3	Aktívne vylučovanie antibiotika z bakteriálnej bunky (eflux).....	10
1.2.4	Produkcia bakteriálnych enzýmov modifikujúcich alebo rozkladajúcich molekulu antibiotika	10
1.2.4.1	β-laktamázy typu ESBL	11
1.2.4.2	β-laktamázy typu AmpC	12
1.3	Problematika detekcie bakteriálnej rezistencie	13
1.3.1	Fenotypová detekcia.....	13
1.3.2	Genetická detekcia.....	14
1.3.2.1	Genetické metódy stanovenia produkcie ESBL	14
1.3.2.1.1	DNA sondy, metóda oligotypizácie	14
1.3.2.1.2	Polymerázová reťazová reakcia.....	15
1.3.2.1.3	Metóda jednovláknového konformačného polymorfizmu v spojení s PCR (PCR-SSCP).....	15
1.3.2.1.4	Metóda polymorfizmu dĺžky restričných fragmentov v spojení s PCR (RFLP-PCR)	16
1.3.2.1.5	Ligázová reťazová reakcia (LCR)	16
1.3.2.1.6	Analýza krivky topenia DNA s vysokým rozlíšením (HRM analýza).....	17
1.3.2.1.7	DNA mikročipy	18
1.3.2.1.8	Priame sekvenovanie	18
1.3.2.2	Genetické metódy stanovenia produkcie AmpC	18
1.3.3	Porovnanie genetických a fenotypových metód na stanovenie citlivosti/ rezistencie voči antibiotikám	19
1.4	Molekulárno-genetické metódy používané na monitorovanie klonálneho šírenia ESBL a AmpC produkujúcich izolátov a určenie horizontálneho prenosu determinantov rezistencie	20
2	CIELE PRÁCE	22
3	MATERIÁL A METÓDY	23
3.1	Analýza enterobaktérií s produkciou širokospektrálnych β-laktamáz v humánnej populácii	23
3.1.1	Zber, izolácia a identifikácia enterobaktérií.....	23
3.1.1.1	ESBL-pozitívne izoláty <i>Klebsiella pneumoniae</i> od pacientov v intenzívnej starostlivosti.....	23
3.1.1.2	Enterobaktérie s produkciou širokospektrálnych β-laktamáz v gastrointestinálnom trakte chorých osôb.....	23
3.1.1.3	Enterobaktérie s produkciou širokospektrálnych β-laktamáz v gastrointestinálnom trakte zdravých osôb.....	24
3.1.1.4	AmpC-pozitívne izoláty <i>Klebsiella pneumoniae</i> od pacientov s hematónkologickým ochorením.....	24
3.1.1.5	AmpC-pozitívne izoláty čeľade <i>Enterobacteriaceae</i> od novorodencov.....	24
3.1.2	Fenotypová detekcia produkcie širokospektrálnych β-laktamáz	25
3.1.2.1	Fenotypová detekcia produkcie ESBL	25
3.1.2.2	Fenotypová detekcia produkcie AmpC	25
3.1.3	Genetická detekcia širokospektrálnych β-laktamáz	25
3.1.3.1	Polymerázová reťazová reakcia	26
3.1.3.2	Elektroforetické delenie produktov amplifikácie	30

3.1.3.3	Restrikčná analýza.....	30
3.1.3.4	Elektroforetické delenie produktov restrikcie	31
3.1.3.5	Priame sekvenovanie.....	31
3.1.4	Epidemiologická typizácia izolátov produkujúcich širokospektrálne β -laktamázy	31
3.1.4.1	Pulzná gélová elektroforéza	31
3.2	Analýza enterobaktérií s produkciou širokospektrálnych β-laktamáz v animálnej populácii.....	32
3.2.1	Zber, izolácia a identifikácia enterobaktérií	32
3.2.2	Fenotypová detekcia produkcie širokospektrálnych β -laktamáz	33
3.2.2.1	Fenotypová detekcia produkcie ESBL	33
3.2.2.2	Fenotypová detekcia produkcie AmpC	33
3.2.3	Genetická detekcia širokospektrálnych β -laktamáz.....	33
3.2.4	Epidemiologická typizácia izolátov s produkciou širokospektrálnych β -laktamáz	33
3.3	Využitie metódy PCR a analýzy krivky topenia DNA pri genetickej charakterizácii ESBL-pozitívnych izolátov	34
3.3.1	Genetická charakterizácia <i>bla</i> génu pomocou multiplex PCR a analýzy krivky topenia u zbierkových kmeňov	34
3.3.1.1	Multiplex PCR	34
3.3.1.2	Analýza krivky topenia s vysokým rozlíšením.....	37
3.3.1.3	Elektroforetické delenie produktov amplifikácie	38
3.3.2	Genetická charakterizácia <i>bla</i> génu pomocou multiplex PCR a analýzy krivky topenia u klinických izolátov	38
3.3.2.1	Zber, izolácia, identifikácia a fenotypové určenie produkcie ESBL u klinických izolátov <i>Escherichia coli</i> od pacientov hospitalizovaných na jednotkách intenzívnej starostlivosti.....	38
3.3.2.2	Multiplex PCR	39
3.3.2.3	Analýza krivky topenia s vysokým rozlíšením.....	39
3.3.2.4	Elektroforetické delenie produktov amplifikácie	39
3.3.2.5	Priame sekvenovanie.....	39
3.4	Epidemiologická analýza ESBL-pozitívnych izolátov <i>Escherichia coli</i> z JIS a charakterizácia génov kódujúcich ich produkciu.....	40
3.4.1	Pulzná gélová elektroforéza.....	40
3.4.2	Detekcia inzerčných sekvencií pomocou PCR.....	40
3.4.3	Izolácia plazmidov.....	41
3.4.4	Konjugačné experimenty a charakterizácia vybraných plazmidov.....	42
4	VÝSLEDKY.....	45
4.1	Analýza enterobaktérií s produkciou širokospektrálnych β-laktamáz v humánnej populácii	45
4.1.1.	Stanovenie prevalence enterobaktérií produkujúcich širokospektrálne β -laktamázy ESBL a AmpC typu.....	45
4.1.1.1	Výskyt ESBL-pozitívnych izolátov <i>Klebsiella pneumoniae</i> u pacientov v intenzívnej starostlivosti.....	45
4.1.1.2	Výskyt ESBL- a AmpC-pozitívnych enterobaktérií v gastrointestinálnom trakte chorých osôb	45
4.1.1.3	Výskyt ESBL a AmpC pozitívnych enterobaktérií v gastrointestinálnom trakte zdravých osôb.....	46
4.1.1.4	Výskyt AmpC-pozitívnych izolátov <i>Klebsiella pneumoniae</i> u pacientov s hematológickým ochorením.....	46
4.1.1.5	Výskyt AmpC-pozitívnych izolátov čeľade <i>Enterobacteriaceae</i> u novorodencov	46
4.1.2	Genetická charakterizácia enterobaktérií produkujúcich širokospektrálne β -laktamázy ESBL a AmpC typu.....	47
4.1.2.1	ESBL-pozitívne izoláty <i>Klebsiella pneumoniae</i> u pacientov v intenzívnej starostlivosti.....	47
4.1.2.2	ESBL- a AmpC-pozitívne izoláty čeľade <i>Enterobacteriaceae</i> v gastrointestinálnom trakte chorých osôb	49
4.1.2.3	ESBL a AmpC-pozitívne izoláty čeľade <i>Enterobacteriaceae</i> v gastrointestinálnom trakte zdravých osôb.....	52

4.1.2.4	AmpC-pozitívne izoláty <i>Klebsiella pneumoniae</i> od pacientov s hematookologickým ochorením.....	54
4.1.2.5	AmpC-pozitívne izoláty čeľade <i>Enterobacteriaceae</i> u novorodencov.....	54
4.2	Analýza enterobaktérií s produkciou širokospektrálnych β-laktamáz v animálnej oblasti	57
4.2.1	Stanovenie prevalencie enterobaktérií produkujúcich širokospektrálne β -laktamázy ESBL a AmpC typu.....	57
4.2.2	Genetická charakterizácia enterobaktérií produkujúcich širokospektrálne β -laktamázy	57
4.2.2.1	Genetická detekcia ESBL.....	57
4.2.2.2	Genetická detekcia AmpC β -laktamáz	59
4.3	Využitie metódy PCR a analýzy krivky topenia DNA pri genetickej charakterizácii ESBL-pozitívnych izolátov	60
4.3.1	Genetická charakterizácia <i>bla</i> génu pomocou multiplex PCR a analýzy krivky topenia u zbierkových kmeňov	60
4.3.2	Genetická charakterizácia <i>bla</i> génu pomocou multiplex PCR a analýzy krivky topenia u klinických izolátov <i>Escherichia coli</i>	65
4.4	Epidemiologická analýza ESBL-pozitívnych izolátov <i>Escherichia coli</i> a charakterizácia génov kódujúcich ich produkciu	80
4.4.1	Pulzná gélová elektroforéza klinických izolátov <i>Escherichia coli</i>	80
4.4.2	Detekcia inzerčných sekvencií	84
4.4.3	Izolácia plazmidov u vybraných kmeňov z JIS	88
4.4.4	Konjugačné experimenty a charakterizácia vybraných plazmidov.....	88
5	DISKUSIA.....	92
5.1	Analýza enterobaktérií s produkciou širokospektrálnych β-laktamáz v humánnej populácii	92
5.1.1	Prevalencia a charakterizácia β -laktamáz typu ESBL	92
5.1.2	Prevalencia a charakterizácia β -laktamáz typu AmpC	95
5.2	Analýza enterobaktérií s produkciou širokospektrálnych β-laktamáz v animálnej oblasti	99
5.2.1	Problematika β -laktamáz typu ESBL	99
5.2.2	Problematika β -laktamáz typu AmpC	100
5.3	Využitie metódy PCR a analýzy krivky topenia pri genetickej charakterizácii ESBL-pozitívnych izolátov	101
5.4	Epidemiologická analýza ESBL-pozitívnych izolátov <i>Escherichia coli</i> a charakterizácia génov kódujúcich ich produkciu	103
5.4.1	Epidemiologická typizácia kmeňov produkujúcich širokospektrálne enzýmy	104
5.4.2	Charakterizácia mobilných genetických elementov – inzerčných sekvencií.....	105
5.4.3	Charakterizácia mobilných genetických elementov – plazmidov.....	105
6	ZÁVERY	107
7	SÚHRN.....	109
8	SUMMARY.....	112
9	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	115
10	PUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY	127
10.1	Publikácie v časopisoch s impakt faktorom.....	127
10.1	Publikácie v recenzovaných časopisoch bez impakt faktoru	127
10.3	Prednášky a posterly s abstraktom	128

11	ZOZNAM TABULIEK, OBRÁZKOV, GRAFOV A POUŽITÝCH SKRATIEK	130
11.1	Zoznam tabuliek.....	130
11.2	Zoznam obrázkov.....	132
11.4	Zoznam použitých skratiek.....	135

1 ÚVOD

Baktérie boli, sú a naďalej aj budú neoddeliteľnou súčasťou života človeka. Mnohé z nich sú predstaviteľmi prirodzenej mikroflóry ľudského tela, vyskytujú sa v prostredí, ktoré nás obklopuje a za normálnych podmienok nespôsobujú u človeka žiadne ochorenia. Infekcie vyvolané baktériami však na druhej strane predstavujú závažný problém medicíny, mnohokrát ohrozujúci život samotného pacienta. Preto sa ľudia od nepamäti všemožným spôsobom snažia nájsť účinnú zbraň v boji proti pôvodcom závažných bakteriálnych ochorení.

V roku 1928 bolo vďaka škótskemu biológovi a farmakológovi sirovi Alexandrovi Flemingovi objavené prvé antibiotikum, penicilín. Netrvalo dlho a penicilín sa začal využívať ako účinná antimikrobiálna látka v klinickej praxi. Za to vďačíme predovšetkým nemeckému biochemikovi Ernestovi Chainovi a austrálskemu farmakológovi Howardovi Floreyemu, ktorí v roku 1939 úspešne izolovali penicilín a použili ho na liečbu bakteriálnych infekcií počas druhej svetovej vojny. Tento zlom sa označuje ako začiatok veľkej éry vo vývoji a užívaní antibiotík v klinickej praxi, tzv. antibiotickej éry¹. So zavedením penicilínu do medicínskej oblasti sa podarilo dostať pod kontrolu mnoho infekčných ochorení, ktoré boli do tej doby častou príčinou úmrtnosti.

Netrvalo však dlho a vo svete boli zaznamenané prvé kmene odolávajúce účinku tohto antibiotika, tzv. penicilín rezistentné stafylokoky^{2,3}. Objavil sa nový nepriateľ v podobe baktérií rezistentných voči pôsobeniu penicilínu. Od tejto doby začína neustály boj medzi vedecko-výskumnými tímami hľadajúcimi účinné antibiotiká a bakteriálnymi populáciami odolávajúcimi účinku týchto nových látok. Až na niekoľko výnimiek, každé zavedenie novej účinnej látky do terapie bolo po niekoľkých rokoch sprevádzané objavením rezistentných kmeňov.

V súčasnosti predstavuje bakteriálna rezistencia voči antibiotikám významný celosvetový medicínsky problém, ktorý nielenže ohrozuje aktuálnu terapiu pacientov, ale ju aj významným spôsobom predražuje a čo viac, môže viesť až ku smrti pacienta a to najmä v prípadoch, kedy rezistentné baktérie predstavujú pôvodcov závažných ochorení.

Preto sa v súčasnosti kladie čoraz väčší dôraz na presnú a najmä rýchlu detekciu rezistencie a popri klasických fenotypových metódach stanovenia citlivosti sa siaha aj po moderných genetických metódach, do ktorých sa vkladá čoraz väčšia nádej.

1.1 Problematika bakteriálnej rezistencie

Bakteriálnu rezistenciu voči antibiotikám možno definovať ako schopnosť bakteriálnej populácie odolávať účinku inhibičnej koncentrácie danej skupiny antimikrobiálnych látok⁴. Ide o prirodzený biologický fenomén, ktorý vznikol v priebehu evolučného vývoja a v dnešnej dobe je poháňaný nadmernou spotrebou antibiotík, predstavujúcou neustály selekčný tlak prostredia. V základe rozlišujeme dva typy rezistencie a to prirodzenú (primárnu) a získanú (sekundárnu). Prvý typ je definovaný ako rezistencia charakteristická pre všetkých zástupcov určitého bakteriálneho rodu alebo druhu, ide teda o vlastnosť rodovú resp. druhovú. Táto vzniká buď prirodzenou neprítomnosťou cieľovej štruktúry pre danú skupinu antibiotík, nedostatočným prienikom lieku do bunky, prítomnosťou tzv. efluxných pump alebo iným chromozomálnym mechanizmom rezistencie⁵. Druhý typ rezistencie, tzv. získaná, predstavuje z terapeutického hľadiska oveľa významnejší problém, pretože sa môže veľmi ľahko šíriť v rámci citlivej bakteriálnej populácie a to vďaka mobilným genetickým elementom ako sú konjugatívne plazmidy, transpozóny, prípadne rôzne integrónové systémy, schopné prenášať gény rezistencie z jedného DNA systému na druhý a z bunky rezistentnej do citlivej⁶.

1.2 Mechanizmy bakteriálnej rezistencie a ich genetická podstata

Mechanizmy rezistencie, ktorými sa baktérie bránia účinku antibiotík, možno rozdeliť do štyroch základných skupín.

1.2.1 Modifikácia cieľovej štruktúry

Jednou z príčin pozmenenej štruktúry môžu byť mutácie v géne kódujúcom cieľové miesto. Výsledkom je zabránenie väzby antibiotika na cieľovú štruktúru v bakteriálnej bunke, čím táto získa schopnosť odolať účinku antimikrobiálnej látky. Ako príklad možno uviesť rezistenciu voči rifampicínu u druhu *Mycobacterium tuberculosis*, ktorá vzniká ako dôsledok mutácií v *rpoB* géne, kódujúcom β -podjednotku RNA polymerázy, cieľového miesta pre rifampicín^{7,8}.

Iným typom je získanie génu kódujúceho cieľovú štruktúru so zníženou afinitou pre dané antibiotikum, ako je tomu u druhu *Staphylococcus aureus*, ktorý vďaka prijatiu *mecA*

génu a jeho následnej expresii produkuje pozmenené PBP2a proteíny so zníženou afinitou na β -laktámové antibiotika⁹.

1.2.2 Zhoršený prienik antibiotika daný zmenou permeability bunkovej steny

Vonkajšia membrána gramnegatívnych baktérií, pozostávajúca z fosfolipidovej dvojvrstvy obsahujúcej sacharidy a proteíny, predstavuje účinnú bariéru regulujúcu transport rôznych látok, vrátane antibiotík¹⁰. Malé molekuly antibiotík, ako napr. hydrofilné β -laktámové antibiotiká, tetracyklíny, chloramfenikol a fluorochinolóny, využívajú na vstup do bunky transmembránové proteíny tzv. poríny, tvoriace hydrofilné kanály vo vonkajšej membráne¹¹. V dôsledku straty funkčných kanálov dochádza k zníženému prieniku antibiotík do bunky, čo jej umožňuje odolať účinku antimikrobiálneho prípravku¹². Príkladom môže byť rezistencia izolátov *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli* voči cefotaximu a ceftazidimu sprostredkovaná práve stratou porínu Omp K35¹³.

1.2.3 Aktívne vylučovanie antibiotika z bakteriálnej bunky (efflux)

V prípade efluxných pump ide o transmembránové proteíny, ktoré za fyziologických podmienok slúžia u grampozitívnych i gramnegatívnych baktérií k transportu špecifických metabolitov a toxických cudzorodých látok z bunky, využívajúc pritom protónmotívnu silu ako zdroj energie. Tieto transportné proteíny môžu byť špecifické pre jeden substrát alebo pre celú škálu štrukturálne odlišných látok, vrátane antibiotík¹⁴. Najlepšie popísanou skupinou efluxných pump sú tzv. tetracyklínové pumpy vyskytujúce sa ako u grampozitívnych tak aj u gramnegatívnych baktérií. Po vstupe tetracyklínu do bunky sa tento viaže na TetR proteín fungujúci ako represor *tetA* génu, čím dochádza k nadprodukcii 42-kDa TetA pumpy. Tento transportný proteín sa okamžite začlení do cytoplazmatickej membrány a vypumpováva tetracyklín von z bunky⁹.

1.2.4 Produkcia bakteriálnych enzýmov modifikujúcich alebo rozkladajúcich molekulu antibiotika

Najznámejším príkladom tohto mechanizmu rezistencie sú bakteriálne β -laktamázy, ktorých účinok spočíva v interakcii s β -laktámovým antibiotikom a jeho následnou inaktiváciou v dôsledku hydrolýzy C-N väzby štvorčlenného β -laktámového kruhu¹⁵.

Bakteriálne β -laktamázy sa pravdepodobne vyvinuli z penicilín viažucich proteínov, s ktorými vykazujú vysokú sekvenčnú homológiu¹⁶. Podľa Bush-Jacoby-Medeirosovej klasifikačnej schémy, založenej na substrátovej špecificite a citlivosti na inhibítory, rozdeľujeme β -laktamázy do 4 skupín (1 – 4)¹⁷. Oveľa používanjšou sa však stala Amblerova klasifikačná schéma rozdeľujúca tieto enzýmy do štyroch tried (A – D) a to na základe aminokyselinových sekvencií¹⁸. Výskyt β -laktamáz je charakteristický pre grampozitívne aj pre gramnegatívne baktérie. Gény kódujúce ich produkciu môžu byť lokalizované na chromozóme alebo na mobilných genetických elementoch, ako sú plazmidy a transpozóny, alebo sa môžu vyskytnúť ako súčasť integrónov lokalizovaných na mobilných elementoch.

Produkcia β -laktamáz predstavuje u gramnegatívnych baktérií najvýznamnejší mechanizmus rezistencie voči β -laktámovým antibiotikám. Vážnym klinickým problémom v dnešnej dobe sú tzv. širokospektrálne β -laktamázy (ESBL) a AmpC enzýmy so širokým spektrom účinku a to najmä kvôli možnému zlyhaniu pri terapii s použitím oxyimino-cefalosporínov¹⁹.

1.2.4.1 β -laktamázy typu ESBL

Enzýmy typu ESBL zahŕňajú β -laktamázy, ktoré sú schopné hydrolyzovať oxyimino-cefalosporíny (cefotaxim, ceftazidim, ceftriaxon, atď.) a monobaktámy. Nie sú však aktívne voči cefamycínom a karbapenémom a obecné sú inhibované inhibítormi β -laktamáz ako je kyselina klavulanová, sulbaktam a tazobaktám²⁰. Podľa Bush-Jacoby-Medeirosovej klasifikácie ich zaraďujeme do triedy 2be, podľa Amblerovho klasifikačného schématu do molekulárnej triedy A (čiastočne D)^{17, 18}. Tieto plazmidovo-kódované β -laktamázy sú často hlavnou príčinou rezistencie voči cefalosporínom a monobaktámom u čelade *Enterobacteriaceae*. ESBL typu TEM a SHV, ktoré predstavovali najrozšírenejšiu skupinu týchto enzýmov, vznikli dôsledkom bodových mutácií v génoch kódujúcich β -laktamázy s úzkym spektrom účinku (SHV-1, TEM-1, resp. TEM-2)^{21, 22}. Dnes je zaznamenaných viac ako 160 TEM a 100 SHV variant (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>) vyskytujúcich sa hlavne u kmeňov *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. a *Escherichia coli*²³.

CTX-M typy ESBL sú veľmi rýchlo sa šíriacou skupinou. Prednostne hydrolyzujú cefotaxim než ceftazidim a sú účinnejšie inhibované tazobaktámom a sulbaktámom²⁰. Súčasný stav CTX-M enzýmov zahŕňa viac ako 40 typov, ktoré možno rozdeliť na základe poradia aminokyselín do piatich skupín : CTX-M-1 skupina (CTX-M-1, -3, -10, -12, -15, -28,

-30 a FEC-1); CTX-M-2 skupina (CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20 a Toho-1); CTX-M-8 skupina (CTX-M-8); CTX-M-9 skupina (CTX-M-9, -13, -14, -16, -17, -19, -21, -24, -27 a Toho-2) a CTX-M-25 skupina (CTX-M-25 a -26)²⁴. *Escherichia coli* ostáva v súčasnej dobe hlavným producentom tohto typu β -laktamáz, či už v nemocničnej alebo komunitnej oblasti^{25, 26, 27}.

OXA rodina širokospektrálnych β -laktamáz (OXA-18 a deriváty OXA-2 a OXA-10) sa u čel'adi *Enterobacteriaceae* vyskytujú zriedka, ich produkcia bola zaznamenaná hlavne u izolátov *Pseudomonas aeruginosa*²⁸.

Z hľadiska epidemiológie kmeňov s produkciou ESBL došlo k značnej zmene. V deväťdesiatych rokoch minulého storočia prevládal výskyt kmeňov *Klebsiella pneumoniae* s produkciou SHV a TEM variant, pričom tieto kmene boli často izolované od nemocničných pacientov (jednotky intenzívnej starostlivosti) než od pacientov z komunity^{23, 29}. V posledných rokoch sa však situácia dramaticky zmenila a hlavnými producentmi ESBL sa stali kmene *Escherichia coli*, u ktorých bol detegovaný CTX-M-typ β -laktamáz, pričom ich epidemiológia súvisí skôr s výskytom mobilných genetických elementov než s klonálnym šírením. Zvýšil sa aj počet izolátov z komunitnej oblasti, hlavne od pacientov s infekciami močových ciest. V nemocničných zariadeniach došlo k výraznému nárastu záchyty ESBL aj na ostatných oddeleniach, než len z jednotiek intenzívnej starostlivosti²³.

1.2.4.2 β -laktamázy typu AmpC

Ďalšou významnou skupinou enzýmov prispievajúcich k rezistencii voči β -laktamovým antibiotikám sú tzv. AmpC enzýmy. Ide o skupinu cefalosporináz patriacich do skupiny 1 podľa Bush-Jacoby-Medeirosovej klasifikácie a do triedy C podľa Amblerovej klasifikačnej schémy^{17, 18}. Tieto β -laktamázy sa vyznačujú schopnosťou štiepiť penicilíny, cefalosporíny (a to vrátane oxyimino-cefalosporínov), cefamycíny a monobaktámy. Ostávajú však citlivé na karbapenémy a v mnohých prípadoch aj na cefalosporíny štvrtej generácie. Ďalším charakteristickým znakom je, že nie sú inhibované inhibítormi β -laktamáz, ako tomu bolo u enzýmov typu ESBL. Gény kódujúce produkciu AmpC enzýmov sú prítomné buď na chromozóme alebo na mobilných genetických elementoch – plazmidoch. Tzv. *ampC* gény sa prirodzene vyskytujú na chromozómoch mnohých enterobaktérií, zahrňujúcich *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Providencia stuartii*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Hafnia alvei*, *Buttiauxella* spp. a *Ewingella americana*, ako aj u iných zástupcov gramnegatívnych baktérií ako *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas* spp., *Acinetobacter baumannii* a *Ochrobactrum anthropi*. Produkcia týchto

enzýmov je inducibilná (okrem *Escherichia coli*) účinkom niektorých β -laktámových antibiotík, napr. cefoxitínu alebo imipenemu a za normálnych okolností, t. j. bez prítomnosti induktora, nepredstavuje vážny klinický problém. Ten však nastáva, ak dochádza k ich nadprodukcii a to v dôsledku mutácií v *ampC*, *ampD*, *ampR* a *ampG* génoch kódujúcich funkčný AmpC enzým, N-acetyl-muramyl-L-alanín amidázu, AmpR regulátor a transmembránový AmpG proteín. Druhou významnou skupinou AmpC β -laktamáz sú enzýmy kódované na plazmidoch. K ich hlavným producentom patria *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. a *Escherichia coli* (hoci tento druh nesie aj chromozomálny *ampC* gén, avšak za normálnych okolností exprimovaný len vo veľmi malej miere). U týchto sa *ampC* gény preniesli z druhov nesúcich chromozomálne typy, z ktorých sa pravdepodobne vyvinuli. U niektorých AmpC β -laktamáz je však obtížne určiť ich pôvod, pretože so známymi enzýmami, kódovanými na chromozóme, vykazujú nízky stupeň homológie. Väčšina týchto enzýmov nie je inducibilná v dôsledku neprítomnosti *ampR* regulačného génu a nadprodukcia β -laktamáz je teda následkom mutácií v promótoch^{30,31}.

1.3 Problematika detekcie bakteriálnej rezistencie

1.3.1 Fenotypová detekcia

Fenotypovému stanoveniu bakteriálnej rezistencie predchádza izolácia infekčného agens z klinického materiálu pomocou štandardných kultivačných a identifikačných metód a následné použitie difúzných alebo dilučných testov na stanovenie citlivosti alebo rezistencie baktérie voči konkrétnemu antibiotiku. Toto testovanie umožňuje vybrať najvhodnejší terapeutický prípravok, poprípade určiť aj jeho optimálne dávkovanie.

Na detekciu produkcie ESBL a AmpC β -laktamáz v klinických laboratóriách bolo navrhnutých hneď niekoľko metód. V prípade ESBL sú najpoužívanejšími metódami Double-Disk Synergy Test (DDST), E-test alebo CLSI metóda, založené na synergickom účinku cefalosporínu III. generácie a inhibítora β -laktamáz (napr. kyseliny klavulanovej). U AmpC β -laktamáz je možné využiť AmpC diskovú metódu, 3D test, CAM (cefoxitín agar medium) metódu alebo diskovú metódu za použitia kyseliny 3-aminofenylboritej³².

1.3.2 Genetická detekcia

Genetické metódy stanovenia rezistencie sú na rozdiel od predchádzajúcich založené na určení genotypu. Ich veľkou výhodou je vysoká detekčná schopnosť (senzitivita i špecificita), rýchlosť prevedenia a získania konečného výsledku, ako aj zníženie biologického rizika pre personál vykonávajúci analýzu. Tieto techniky môžu byť ďalej nápomocné u obtiažne interpretovateľných antibiogramov, na potvrdenie špecifických mechanizmov odolnosti a pri určení rezistencie u kultivačne náročných alebo pomaly rastúcich baktérií, napr. u *Mycobacterium tuberculosis*. Ich veľký potenciál ďalej spočíva vo využití pri rôznych epidemiologických štúdiách, pretože umožňujú sledovanie šírenia tzv. epidemiologických klonov, ale aj mobilných genetických elementov a to ako v humánnej tak aj v animálnej populácii^{33, 34, 35}.

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) sa od svojho objavu v roku 1985 stala najdôležitejšou a hlavne najpoužívanejšou metódou genetickej detekcie. V oblasti klinickej mikrobiológie našla svoje uplatnenie pri detekcii a identifikácii významných ľudských patogénov a pri stanovení ich vlastností, ako sú schopnosť odolávať účinku rôznych antimikrobiálnych látok a produkovať rôzne faktory virulencie. Rýchle a presné odhalenie mikrobiálnej rezistencie môže následne pomôcť s nasadením adekvátnej antimikrobiálnej liečby, čím sa dá vyhnúť nesprávnej preskripcii liečiv, súvisiacej s nesprávnym určením rozsahu rezistencie. Hoci na druhej strane prítomnosť génu rezistencie nemusí nutne viesť k zlyhaniu liečby³⁶. V klinickej praxi nemusí napr. produkcia inducibilných AmpC β -laktamáz znamenať neúspech liečby cefalosporínmi III. generácie a tieto prípravky je teda možné terapeuticky použiť³².

1.3.2.1 Genetické metódy stanovenia produkcie ESBL

Na detekciu génov kódujúcich produkciu ESBL bolo navrhnutých hneď niekoľko metód, založených buď na amplifikácii cieľového úseku DNA alebo použití špecifických hybridizačných sond.

1.3.2.1.1 DNA sondy, metóda oligotypizácie

Prvou metódou použitou na detekciu génov kódujúcich produkciu β -laktamáz bola technika využívajúca DNA sondy. Autori Huovinen et al. využili rádioaktívne značené

oligonukleotidy na detekciu TEM-1, SHV-1, OXA-1 a OXA-2 (β -laktamázy s úzkym spektrom účinku). Hoci šesť kmeňov bolo falošne pozitívnych, celková špecificita reakcie dosiahla 99 %³⁷. Prvé štúdie zaoberajúce sa využitím hybridizačných sond na detekciu ESBL boli venované TEM variantám a založené na detekcii mutácií rozširujúcich spektrum účinku v rámci *bla*_{TEM} génu, čím bolo možné rozlíšiť medzi TEM-1, TEM-3 a TEM-6 β -laktamázami³⁸. Štúdia autorov Arlet a Philippon bola zameraná na syntézu oligonukleotidových sond hybridizujúcich s TEM-1, TEM-2 a šiestimi širokospektrálnymi variantami (TEM-2 až TEM-7 a TEM-20) počas kolónovej hybridizácie a Southern blotu. SHV sondy umožnili rozlíšenie SHV-1 (β -laktamázy s úzkym spektrom účinku) od tých širokospektrálnych (SHV-2, SHV-3, SHV-4 a SHV-5)³⁹.

1.3.2.1.2 Polymerázová reťazová reakcia

Najjednoduchším spôsobom, ako geneticky stanoviť prítomnosť β -laktamázového génu je jeho amplifikácia pomocou PCR s využitím špecifických oligonukleotidových primerov. Génové sekvencie jednotlivých enzýmových rodín sú voľne dostupné vo verejných vedeckých databázach, napríklad GenBank (National Center for Biotechnology Information, <http://ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). Hoci PCR umožňuje detekciu jednotlivých *bla* génov, nie je schopná rozlíšiť medzi β -laktamázami s úzkym a širokým spektrom účinku, preto je potrebné využiť ďalších metód, ktoré to umožňujú. Obvykle sú založené na detekcii bodových mutácií zodpovedných za rozšírenie spektra účinku.

1.3.2.1.3 Metóda jednovláknového konformačného polymorfizmu v spojení s PCR (PCR-SSCP)

Táto pomerne jednoduchá a citlivá metóda umožňuje sledovať sekvenčné zmeny v štruktúre DNA. Je založená na rozličnej pohyblivosti jednovláknovej DNA v polyakrylamidovom géle v dôsledku zmeny primárnej štruktúry nukleovej kyseliny⁴⁰. Jednonukleotidové mutácie v príslušnom géne sa prejavujú ako zmeny v migrácii jednoreťazcového vlákna a odrazia sa vo výsledku gélovej elektroforézy; zaznamenaná sa posun príslušného bandu oproti bandu zodpovedajúcom pôvodnej β -laktamáze⁴¹. Ako príklad uplatnenia tejto metódy v oblasti detekcie ESBL možno uviesť práce M'Zaliho a Chanawonga, ktorí týmto spôsobom boli schopní rozlíšiť medzi hneď niekoľkými variantmi SHV enzýmov^{42, 43}.

1.3.2.1.4 Metóda polymorfizmu dĺžky restričných fragmentov v spojení s PCR (RFLP-PCR)

RFLP analýza je metóda charakterizácie DNA pomocou jej štiepenia restričnými endonukleázami na jednotlivé fragmenty a následnej separácii týchto fragmentov pomocou gélovej elektroforézy. Rozlíšenie DNA je založené na polymorfizme dĺžky restričných fragmentov, pričom tento polymorfizmus vzniká v dôsledku prítomnosti resp. neprítomnosti špecifického restričného miesta, napríklad jednonukleotidovými zmenami v príslušnom géne. Preto našla táto pomerne rýchla metóda uplatnenie aj v oblasti ESBL detekcie, kde bodové mutácie v určitých miestach génu rozširujú spektrum účinku príslušného enzýmu. V prípade TEM β -laktamáz ide o aminokyselinové pozície 104 (kyselina glutámová za lyzín), 164 (arginín buď za serín alebo histidín), 238 (glycín za serín) a 240 (kyselina glutámová za lyzín)²⁸. Arlet et al. použili RFLP metódu na detekciu jednonukleotidových mutácií vo vnútri *bla*_{TEM} génu. Okrem už spomínaných aminokyselinových substitúcií sledovali aj tie, ktoré síce menia výsledné poradie aminokyselinového reťazca, ale nie sú zodpovedné za rozšírenie spektra účinku⁴⁴. Veľmi jednoduchá metóda na rozlíšenie SHV-ESBL a SHV-s úzkym spektrom účinku bola vyvinutá autormi Chanawong et al. Použitie restričnej endonukleázy *NheI* umožnilo sledovať zmeny v aminokyselinovej pozícii 238, pričom práve zmena glycínu za serín je typická pre väčšinu skorších SHV-ESBL⁴³.

1.3.2.1.5 Ligázová reťazová reakcia (LCR)

LCR zahŕňa použitie dvoch oligonukleotidových párov primerov, pričom každý z nich je navrhnutý tak, aby hybridizoval k cieľovým jednovláknovým molekulám nukleovej kyseliny získaných po predchádzajúcej denaturácii. Iba v prípade dokonalej komplementarity dochádza k ligácii príslušných oligonukleotidov a následnej amplifikácii sledovaného úseku. Akákoľvek jednonukleotidová zmena má za následok inhibíciu reakcie. Kim et al. použili LCR na rozlíšenie génov kódujúcich SHV-1, -2, -2a, -3, -5 a -12. Použité oligonukleotidové primery boli navrhnuté na sledovanie aminokyselinových substitúcií v pozíciách 35 (glutamín za kyselinu glutámovú), 205 (leucín za arginín), 238 (serín za glycín) a 240 (lyzín za kyselinu glutámovú)⁴⁵.

1.3.2.1.6 Analýza krivky topenia DNA s vysokým rozlíšením (HRM analýza)

Ide o novú post-amplifikačnú metódu umožňujúcu charakterizáciu PCR amplikónov pomocou tzv. krivky topenia DNA, pričom metóda vyžaduje počiatočnú amplifikáciu cieľovej sekvencie napríklad pomocou PCR v reálnom čase. PCR v reálnom čase umožňuje monitorovať množstvo PCR produktu počas celej reakcie a to použitím primerov, oligosond alebo amplikónov značených molekulami schopnými fluorescencie. Nárast fluorescencie je meraný počas každého cyklu a jeho úroveň odráža množstvo nasyntetizovanej nukleovej kyseliny. Technika HRM využíva najčastejšie nešpecifických fluorescenčných interkalačných farbíčiek (SYBR Green, LCGreen, SYTO 9 alebo EVA Green) na sledovanie priebehu topenia DNA počas postupného zahrievania PCR produktov. Na začiatku reakcie je fluorescencia vysoká v dôsledku prítomnosti veľkého množstva dvojvláknovej DNA, do ktorej sa príslušné farbičky ešte počas amplifikácie zabudovali. Zahrievaním však dochádza k postupnej disociácii vlákien a uvoľňovaniu nešpecifických detekčných systémov, čím sa zaznamenáva pokles meranej fluorescencie. Výsledkom je získanie tzv. krivky topenia DNA, ktorá odráža celý priebeh topenia sledovaného úseku DNA. Ako teplota topenia, T_m sa označuje teplota, pri ktorej je 50 % DNA vo forme dvojvláknovej a 50 % vo forme jednovláknovej. HRM analýza (monitorovanie priebehu topenia s vysokým rozlíšením) umožňuje charakterizovať vzorky na základe rozdielnosti v dĺžke sekvencií, obsahu GC báz a komplementarity jednotlivých báz a predstavuje novú metódu na detekciu jednonukleotidových polymorfizmov (SNP), genotypizáciu, DNA metylačnú analýzu a podobne^{46,47}.

PCR v reálnom čase s následnou analýzou krivky topenia DNA našla svoje využitie aj v detekcii SHV β -laktamáz. Randegger a Hächler vyvinuli rýchlu, citlivú a špecifickú metódu detekcie mutácií v troch aminokyselinových pozíciách *bla*_{SHV} (179, 238, 240) a to v rámci jednej reakcie. Táto metóda bola vďaka fluorescenčne značeným hybridizačným sondám a analýze krivky topenia schopná rozlíšiť medzi génmi kódujúcimi SHV β -laktamázy s úzkym a širokým spektrom účinku⁴⁸. Kombinácia multiplex PCR v reálnom čase a analýzy krivky topenia bola popísaná autormi Chia et al. a umožňuje súčasnú identifikáciu SHV a CTX-M β -laktamáz. Po ukončení optimalizácie bol tento detekčný systém použitý na charakterizáciu 199 izolátov z čeľade *Enterobacteriaceae*. Výsledky ukázali na vhodnosť použitia metódy na detekciu SHV a CTX-M enzýmov u klinických izolátov, dokonca aj v oblastiach, kde by sa mohli vyskytnúť kmene produkujúce rôzne kombinácie β -laktamáz⁴⁹. Birkett et al. vyvinuli metódu využívajúcu multiplex PCR v reálnom čase na báze Taq Man

sond, pre detekciu a genotypizáciu enterobaktérií produkujúcich CTX-M β -laktamázy. Podľa názoru autorov by mohla byť táto metóda použiteľná na sledovanie epidemických výskytov kmeňov s produkciou ESBL v regionálnych alebo v referenčných laboratóriách⁵⁰.

1.3.2.1.7 DNA mikročipy

Hlavnou nevýhodou všetkých vyššie spomenutých metód je limitujúce množstvo cieľových sekvencií, ktoré môžu byť sledované v jednej reakcii. Naproti tomu moderné DNA mikročipy vďaka mnohonásobnej detekčnej schopnosti umožňujú detekovať súčasne tisíce až desaťtisíce špecifických DNA sekvencií a to na malej sklenenej alebo silikónovej doštičke veľkosti iba 1 – 2 cm. DNA mikročipy sa v súčasnej dobe využívajú hlavne v týchto troch medicínskych oblastiach : a) na analýzu génovej expresie – umožňujú zmerať mieru expresie tisícok génov, b) na genotypizáciu – sledovanie génov majúcich vzťah k ľudským chorobám, c) sekvenovanie DNA – skrining špecifických génov a vyhľadávanie mutácií v týchto sekvenciách, pátranie po tzv. polymorfizme jednonukleotidových mutácií⁵¹. Jedným z autorov, ktorý využil túto modernú a hlavne rýchlu techniku na identifikáciu ESBL u gramnegatívnych baktérií boli Grimm et al. Využitie mikročipov bolo založené na súčasnej genotypizácii *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M} génov. Samotné prevedenie reakcie pozostávalo so 168 sond pokrývajúcich detekciu mutácií zodpovedných za 156 aminokyselinových substitúcií, pričom celkový reakčný čas bol iba 5 hodín⁵².

1.3.2.1.8 Priame sekvenovanie

Metóda priameho sekvenovania ostáva akýmsi „zlatým“ štandardom medzi genetickými metódami na identifikáciu rôznych produktov amplifikačnej reakcie. Súčasná technika pokročila do takej miery, že je možné bez väčších problémov a ekonomických nákladov určiť prítomnosť génu rezistencie alebo detegovať mutácie spôsobujúce vznik tejto rezistencie⁵³.

1.3.2.2 Genetické metódy stanovenia produkcie AmpC

Množstvo techník používaných na detekciu *ampC* génu nie je až také rozsiahle ako pri stanovení ESBL. U génov nachádzajúcich sa na chromozóme sa využíva klasická PCR s využitím špecifických primerov zachycujúcich sledovanú oblasť. Následné priame

sekvenovanie je schopné odhaliť mutácie vyskytujúce sa v špecifických oblastiach amp operonu (pozostávajúceho z *ampC*, *ampD*, *ampR*, *ampE* a *ampG* génov), ktorý reguluje produkciu inducibilných a chromozomálne kódovaných AmpC enzýmov^{54, 55}. U *Escherichia coli* však produkcia týchto β -laktamáz nie je inducibilná, v dôsledku neprítomnosti *ampR* regulačného génu a za normálnych okolností je exprimovaná vo veľmi malej miere. Nadprodukcia AmpC β -laktamáz súvisí s výskytom mutácií v špecifických oblastiach *ampC* promótoru a atenuátora^{56, 57}, ktoré možno opäť detekovať použitím PCR a následného priameho sekvenovania. Iným spôsobom sledovania prítomnosti *ampC* génu môže byť použitie špecifických sond nasadzujúcich na sledovaný úsek tohto génu⁵⁸.

Na detekciu AmpC enzýmov kódovaných na plazmidoch bola vyvinutá technika multiplex PCR, ktorá na základe použitia šiestich sád primerov je schopná v jednej reakcii rozlíšiť šesť skupín týchto enzýmov u organizmov ako *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium⁵⁹.

Novšou metódou je použitie tzv. asymetrickej multiplex PCR v spojení s DNA mikročipmi na detekciu skupinovo špecifických plazmidovo-kódovaných génov. Autori pri tejto metóde súčasne spojili detekciu AmpC a ESBL u izolátov čeľade *Enterobacteriaceae*⁶⁰.

1.3.3 Porovnanie genetických a fenotypových metód na stanovenie citlivosti/rezistencie voči antibiotikám

Ako už bolo spomenuté, genetické metódy sa vyznačujú vysokou detekčnou schopnosťou, citlivosťou, znížením detekčného a interpretačného času a znížením biologického rizika pre personál vykonávajúci analýzu v porovnaní s kultivačnými metódami. Tak isto žiadna metóda založená na určení fenotypu nie je schopná sledovať šírenie rezistentných mikroorganizmov alebo determinanty rezistencie v populácii. Podobne určenie fenotypu citlivosti či rezistencie u organizmov obtiažne či dlhodobo kultivovateľných môže byť v mnohých prípadoch problematické. V prípade detekcie produkcie ESBL alebo AmpC β -laktamáz môže táto v rade prípadov zlyhať a príslušné baktérie sú následne falošne interpretované ako citlivé k širokospektrálnym β -laktámovým antibiotikám⁶¹. Ďalším problémom klasických fenotypových metód je, že môžu zlyhať v situáciách, kedy dochádza k slabej expresii génu rezistencie, ktorú nie sú schopné zachytiť.

Na druhej strane rozhodnutia o zahájení určitej liečby sú prednostne založené na určení citlivosti pomocou fenotypových metód a to z toho dôvodu, že prítomnosť génu rezistencie ešte nemusí znamenať, že sa gén skutočne exprimuje, resp. že sa exprimuje iba

do takej miery, ktorá z klinického hľadiska nie je významná. Genetické metódy tiež nie sú schopné vziať do úvahy nové mechanizmy rezistencie. Ďalšou nevýhodou je možnosť kontaminácie nukleovou kyselinou z vonkajšieho zdroja, prítomnosťou tzv. „silent genes“ alebo pseudogénov, čím môže dôjsť k falošne pozitívnym výsledkom.

Hoci sa zdá, že genetické metódy napredujú veľkou rýchlosťou na poli detekcie mikrobiálnej rezistencie voči antimikrobiálnym látkam, nie je pravdepodobné, že v blízkej budúcnosti nahradia tradičné flexibilné a pomerne lacné fenotypové testy. Môžu však byť nápomocné pri vysvetľovaní nezvyčajných a komplexných mechanizmov rezistencie, pri potvrdzovaní nešpecifických prípadov, pri detekcii citlivosti u pomaly rastúcich organizmov ako napríklad u *Mycobacterium tuberculosis* alebo pri konfirmácii výsledkov fenotypového určenia. Veľký potenciál však tieto moderné genetické metódy majú v oblasti monitorovania šírenia rezistentných kmeňov, poprípade genetických elementov, a to ako v humánnej, tak aj v animálnej oblasti, čím získavajú na význame najmä pre rozsiahle epidemiologické štúdie ^{33, 34, 53}.

1.4 Molekulárno-genetické metódy používané na monitorovanie klonálneho šírenia ESBL a AmpC produkujúcich izolátov a určenie horizontálneho prenosu determinantov rezistencie

Prvýkrát sa vedecká a klinická verejnosť stretla s fenoménom ESBL v Nemecku, v roku 1983 ⁶². Netrvalo však dlho a množstvo enzýmov so širokým spektrom sa mnohonásobne zvýšilo a rozšírilo aj do iných oblastí, pričom ich prevalencia sa líši nielen medzi krajinami, ale dokonca aj medzi nemocnicami v rámci jednej oblasti. Podobná situácia je aj u AmpC β-laktamáz, ktoré boli sledované už od 70 rokov minulého storočia a dnes sa rozšírili do rôznych oblastí ⁶³. Na základe rôznych sledovaných epidemiologických charakteristík je známe, že za takýmto rozšírením je nielen klonálne šírenie kmeňov s produkciou ESBL a AmpC β-laktamáz, ale aj horizontálny prenos *bla* a *ampC* génov na rozličných mobilných genetických elementoch medzi kmeňmi, ktoré nevykazujú genetickú príbuznosť.

Tieto mobilné genetické elementy môžeme rozdeliť do dvoch hlavných skupín: I) elementy, ktoré sa môžu pohybovať z jednej bakteriálnej bunky do druhej (tzv. R plazmidy, konjugatívne transpozóny) a II) elementy, ktoré sa pohybujú z jednej genetickej lokalizácie na

druhú ale len v rámci bunky (transpozóny, génové kazety a mobilizácia sprostredkovaná ISCR elementami)⁶.

Každý rok je publikovaných množstvo štúdií venovaných genetickej charakterizácii mobilných genetických elementov zahrnutých v prenose génov rezistencie medzi citlivou a rezistentnou bakteriálnou populáciou. K najvýznamnejším metódam patrí izolácia plazmidov, a to buď pomocou modifikovanej alkalickej metódy alebo pomocou komerčných kitov, následné zaradenie vyizolovaných plazmidov do tzv. inkompatibilných skupín⁶⁴, ďalej charakterizácia plazmidovej DNA pomocou restriktívnej analýzy, Southern blot, hybridizácia so špecifickými sondami, sekvenovanie určitého úseku plazmidu, prenos týchto elementov konjugačnými alebo transformačnými experimentami^{65, 66, 67}. Na klasifikáciu integrónov do jednotlivých tried a na stanovenie prítomnosti rozličných génových kaziet bolo navrhnutých množstvo PCR primerov^{68, 69}. Technika PCR nám tak isto umožňuje charakterizáciu okolia *bla* génov a určenie prítomnosti jednotlivých inzerčných sekvencií zahrnutých v mobilizácii a expresii príslušných génov^{69, 70, 71}.

Ďalšie využitie genetických metód je v oblasti sledovania epidemiológie kmeňov zahrnutých v epidemických výskytoch. Hoci na typizáciu rozličných mikroorganizmov nie sú všetky metódy rovnako efektívne, pulzná gélová elektroforéza, založená na restriktívnej analýze genómovej DNA vyzerá byť univerzálnou pre väčšinu patogénov. Inými využívanými metódami sú analýza plazmidovej DNA, ribotypizácia, typizácia inzerčných sekvencií, techniky založené na PCR, ako polymorfizmus náhodne amplifikovaných úsekov DNA (RAPD), analýza repetitívnych extragénových sekvencií pomocou PCR (REP-PCR), polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov (RFLP), amplifikácia rozptýlených restriktívnych miest (IRS-PCR), dĺžkový polymorfizmus amplifikovaných fragmentov (AFLP), analýza enterobakteriálnych repetitívnych intragénových sekvencií (ERIC), fingerprinting, typizácia multilokálnych sekvencií (MLST) a iné, ktoré sa vzájomne líšia opakovateľnosťou, rozlišovacou schopnosťou, jednoduchosťou interpretácie alebo prevedenia^{72, 73, 74}.

2 CIELE PRÁCE

Hlavné ciele v rámci doktorského študijného programu možno charakterizovať nasledujúcimi bodmi :

1. Analýza enterobaktérií s produkciou širokospektrálnych β -laktamáz v humánnej oblasti.
2. Analýza enterobaktérií s produkciou širokospektrálnych β -laktamáz v animálnej oblasti.
3. Využitie metódy PCR a analýzy krivky topenia DNA pri genetickej charakterizácii ESBL-pozitívnych izolátov.
4. Epidemiologická analýza ESBL-pozitívnych izolátov z jednotiek intenzívnej starostlivosti a charakterizácia génov kódujúcich produkciu týchto enzýmov.

3 MATERIÁL A METÓDY

3.1 Analýza enterobaktérií s produkciou širokospektrálnych β -laktamáz v humánnej populácii

3.1.1 Zber, izolácia a identifikácia enterobakterií

Jedným z cieľov dizertačnej práce bola analýza enterobaktérií produkujúcich širokospektrálne β -laktamázy vo vybraných súboroch získaných z humánnej populácie, pričom zber, spôsob izolácie a identifikácia jednotlivých skupín izolátov sú popísané v nasledujúcich kapitolách.

3.1.1.1 ESBL-pozitívne izoláty *Klebsiella pneumoniae* od pacientov v intenzívnej starostlivosti

V období 1.11.2006 – 30.3.2007 boli z klinického materiálu (tracheálneho endosekréty, sputa, krvi, moču, punkčátu, sekréty z rany) pacientov, hospitalizovaných na Klinike anesteziológie a resuscitácie Fakultnej nemocnice Olomouc (FNOL), získavané izoláty *Klebsiella pneumoniae*. Na kultiváciu vzoriek boli použité štandardné mikrobiologické postupy, identifikácia prebiehala pomocou ENTEROtestu 16 (Pliva-Lachema Diagnostika, Česká republika) a/alebo automatizovaného systému Vitek 2 (bioMérieux, Francúzsko). Od každého pacienta a príslušného materiálu bol do súboru zaradený iba jeden izolát, ten, ktorý bol zachytený ako prvý.

3.1.1.2 Enterobaktérie s produkciou širokospektrálnych β -laktamáz v gastrointestinálnom trakte chorých osôb

V období 1.5.2007 – 1.5.2008 boli pacientom hospitalizovaným na rôznych klinikách vo FNOL odoberané rektálne výtery, ktoré boli následne inokulované na chromID ESBL selektívne médium (bioMérieux, Francúzsko), odporúčané na predbežnú identifikáciu enterobaktérií s produkciou širokospektrálnych β -laktamáz. Inkubácia prebiehala aerobne pri 37 °C po dobu 24 hodín. Identifikácia využívala ENTEROtest 16 (Pliva-Lachema

Diagnostika, Česká republika) a/alebo automatizovaný systém Phoenix (Becton Dickinson, USA). Od každého pacienta bol zaradený iba jeden rektálny výter.

3.1.1.3 Enterobaktérie s produkciou širokospektrálnych β -laktamáz v gastrointestinálnom trakte zdravých osôb

V období 1.5.2007 – 1.5.2008 boli za rovnakých podmienok ako u hospitalizovaných pacientov (kap. 3.1.1.2) odoberané a spracovávané rektálne výtery od zdravých osôb žijúcich v komunitnom prostredí Olomouckého kraja Českej republiky, pričom tieto osoby neboli po dobu troch mesiacov pred odberom hospitalizované v žiadnom zdravotníckom zariadení. Od každej osoby bol zaradený iba jeden rektálny výter.

3.1.1.4 AmpC-pozitívne izoláty *Klebsiella pneumoniae* od pacientov s hematoonkologickým ochorením

Z klinického materiálu (rektálneho výteru, sputa, krvi, moču, výteru z horných dýchacích ciest, uretry a pochvy) pacientov hospitalizovaných na Hemato-onkologickej klinike FNOL boli v priebehu dvoch mesiacov (5.1. – 5.3.2007) zhromažďované izoláty *Klebsiella pneumoniae*. Na kultiváciu vzoriek boli použité štandardné mikrobiologické postupy, identifikácia prebiehala s využitím ENTEROtestu 16 (Pliva-Lachema Diagnostika, Česká republika) a automatizovaného systému Vitek 2 (bioMérieux, Francúzsko). Od každého pacienta bol zaradený vždy iba jeden izolát, zachytený z jednotlivých klinických materiálov v priebehu 14 dní.

3.1.1.5 AmpC-pozitívne izoláty čeľade *Enterobacteriaceae* od novorodencov

V období 1.4.2008 – 31.8.2009 boli z klinického materiálu novorodencov (výterov z krku a nosa, stolice, bronchoalveolárnej laváže, hemokultúry, endosekréty), hospitalizovaných na novorodeneckom oddelení FNOL, získavané izoláty čeľade *Enterobacteriaceae*. Kultivácia vzoriek prebiehala podľa štandardných mikrobiologických postupov, na identifikáciu baktérií bol použitý ENTEROtest 16 (Pliva-Lachema Diagnostika, Česká republika) a/alebo automatizovaný systém Phoenix (Becton Dickinson, USA). Od každého pacienta bol zaradený vždy len jeden izolát príslušného druhu, ktorý bol izolovaný ako prvý.

3.1.2 Fenotypová detekcia produkcie širokospektrálnych β -laktamáz

Fenotypové určenie produkcie širokospektrálnych β -laktamáz vychádzalo z použitia modifikovaného Double Disc Synergy Testu (DDST) a AmpC diskového testu, ktorých popis uvádzajú nasledujúce kapitoly.

3.1.2.1 Fenotypová detekcia produkcie ESBL

Citlivosť získaných izolátov k antibiotikám bola stanovená štandardnou dilučnou mikrometódou^{75, 76}. U všetkých izolátov enterobaktérií, s minimálnou inhibičnou koncentráciou (MIC) aspoň jedného z testovaných cefalosporínov III. generácie (cefotaximu, ceftazidimu alebo cefoperazonu) vyššou ako 1 $\mu\text{g/ml}$ bol vykonaný modifikovaný DDST na stanovenie produkcie ESBL. Modifikácia klasického DDST podľa Jarliera spočívala v zaradení disku s cefepimom a súčasnom použití disku ceftazidimu s kyselinou klavulanovou³².

Všetky suspektné kolónie z chromID ESBL agaru, identifikované ako zástupcovia čeľade *Enterobacteriaceae*, boli následne podrobené fenotypovému určeniu produkcie ESBL pomocou modifikovaného DDST.

3.1.2.2 Fenotypová detekcia produkcie AmpC

Citlivosť jednotlivých izolátov k antibiotikám bola rovnako, ako v prípade detekcie ESBL, stanovená dilučnou mikrometódou^{75, 76}. U všetkých izolátov enterobaktérií s minimálnou inhibičnou koncentráciou aspoň jedného z testovaných cefalosporínov III. generácie (cefotaximu, ceftazidimu alebo cefoperazonu) vyššou ako 1 $\mu\text{g/ml}$, bol vykonaný AmpC diskový test na detekciu AmpC β -laktamáz. V prípade tohto testu boli použité disky cefotaximu, ceftazidimu, ceftazidimu s kyselinou klavulanovou a ich kombinácie s kyselinou 3-aminofenylboritou, ktorá je inhibítorom AmpC β -laktamáz^{77, 32}.

3.1.3 Genetická detekcia širokospektrálnych β -laktamáz

Detekcia špecifického genotypu vychádzala z amplifikácie β -laktamázového génu a z použitia ďalších metód umožňujúcich charakterizáciu získaného amplicónu.

3.1.3.1 Polymerázová reťazová reakcia

Na detekciu génov kódujúcich produkciu širokospektrálnych β -laktamáz pomocou PCR boli jednotlivé izoláty preočkované na mäso-peptónový agar (Oxoid, Veľká Británia) a inkubované aerobne pri 37 °C, 16 hodín. Nasledovalo rozsuspendovanie dvoch kolónií v 100 μ l vody a zahriatie na 95 °C po dobu 10 minút. Supernatant obsahujúci bakteriálnu DNA bol získaný centrifugáciou (13000 g, 2 minúty) a použitý pre následnú amplifikáciu ako templátová DNA.

PCR analýza génov kódujúcich produkciu ESBL bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{CTX-M} a bla_{OXA} prebiehala v termocyklery Robocycler Gradient 96 Temperature Cycler (Stratagen, Kanada) v reakčnom objeme 50 μ l s využitím špecifických primerov (syntetizovaných firmou East Port, Česká republika) pre jednotlivé bla gény. Použité sady primerov, zloženie reakčnej zmesi a parametre PCR uvádzajú tabuľky 1, 2 a 3. Ako pozitívne kontroly boli použité kmene so známym zastúpením β -laktamáz (*Escherichia coli* produkujúca TEM-1, CTX-M-15, OXA-1 enzýmy a *Klebsiella pneumoniae* CCM 4985 s produkciou SHV-18 (CCM Brno, Česká republika)). Na kontrolu kvality PCR slúžila tzv. negatívna kontrola (t. j. bez obsahu bakteriálnej DNA).

Tabuľka 1: Použité oligonukleotidové primery na detekciu bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{CTX-M} a bla_{OXA} génov

Cieľové miesto	Primer (nukleotidová sekvencia)	Referencie
bla_{TEM}	TEM-F 5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG-3'	44
	TEM-R 5'-CCAATGCTTAATCAGTGAGC-3'	
bla_{SHV}	SHV-F 5'-CTTTACTCGCTTTATCG-3'	43
	SHV-R 5'-TCCCGCAGATAAATCACCA-3'	
bla_{CTX-M}	CTX-MU1 5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGT-3'	78
	CTX-MU2 5'-TGGGTRAARTARGTSACCAGA-3'	
bla_{OXA}	OXA-1F 5'-ACACAATACATATCAACTTCGC-3'	79
	OXA-1R 5'-AGTGTGTTTAGAATGGTGATC-3'	
	OXA-2F 5'-TTCAAGCCAAAGGCACGATAG-3'	
	OXA-2R 5'-TCCGAGTTGACTGCCGGGTTG-3'	
	OXA-10F 5'-CGTGCTTTGTAAAAGTAGCAG-3'	
	OXA-10R 5'-CATGATTTTGGTGGGAATGG-3'	

Tabuľka 2: Zloženie reakčnej zmesi na detekciu *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} a *bla*_{OXA} génov

PCR komponenty	Výsledná koncentrácia
PCR voda (Top-Bio, Česká republika)	
10x koncentrovaný reakčný pufo (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 pri 25 °C), 500 mM KCl, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl ₂) (Top-Bio, Česká republika)	1 x c(Mg ²⁺) = 1,5 mM
dNTPs (Promega, USA)	200 µM
Primer-forward	1 µM
Primer-reverse	1 µM
<i>Taq</i> DNA Polymeráza Unis (Top-Bio, Česká republika)	2 U
Templátová DNA	

Tabuľka 3: Reakčné podmienky na detekciu *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} a *bla*_{OXA} génov

Jednotlivé kroky reakcie	Počet cyklov	Teplota/Čas
Počiatočná denaturácia	1	95 °C/5 min
Denaturácia	30	95 °C/1 min
Hybridizácia primerov		58 °C/1 min
Extenzia		72 °C/1 min
Záverečná extenzia	1	72 °C/10 min

Na detekciu génov kódujúcich produkciu plazmidovo-kódovaných AmpC β-laktamáz bola použitá multiplex PCR. Zvolené sady primerov, zloženie reakčnej zmesi a parametre PCR uvádzajú tabuľky 4, 5 a 6. Ako pozitívna kontrola bol použitý kmeň so známym zastúpením β-laktamázy (*Klebsiella pneumoniae* s produkciou DHA enzýmu). Na kontrolu kvality PCR slúžila negatívna kontrola (bez obsahu bakteriálnej DNA).

Tabuľka 4: Použité oligonukleotidové primery na detekciu plazmidovo-kódovaných AmpC β -laktamáz

Cieľové miesto	Primer (nukleotidová sekvencia)	Referencie
MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 až CMY-11	MOXMF 5'-GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT-3' MOXMR 5'-CACATTGACATAGGTGTGC-3'	59
LAT-1 až LAT-4, CMY-2 až CMY-7, BIL-1	CITMF 5'-TGGCCAGAACTGACAGGCAAA-3' CITMR 5'-TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC-3'	
DHA-1, DHA-2	DHAMF 5'-AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT-3' DHAMR 5'-CCGTACGCATACTGGCTTTGC-3'	
ACC	ACCMF 5'-AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA-3' ACCMR 5'-TTCGCCGCAATCATCCCTAGC-3'	
MIR-1T, ACT-1	EBCMF 5'-TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG-3' EBCMR 5'-CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT-3'	
FOX-1 až FOX-5b	FOXMF 5'-AACATGGGGTATCAGGGAGAT-3' FOXMR 5'-CAAAGCGCGTAACCGGATTGG-3'	

Tabuľka 5: Zloženie reakčnej zmesi na detekciu plazmidovo-kódovaných AmpC β -laktamáz

PCR komponenty	Výsledná koncentrácia
PCR voda (Top-Bio, Česká republika)	
10x koncentrovaný reakčný pufor (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 pri 25 °C), 500 mM KCl, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl ₂) (Top-Bio, Česká republika)	1 x c(Mg ²⁺) = 1,5 mM
dNTPs (Promega, USA)	200 μ M
Primer-forward	1 μ M (každý)
Primer-reverse	1 μ M (každý)
<i>Taq</i> DNA Polymeráza Unis (Top-Bio, Česká republika)	2 U
Templátová DNA	

Tabuľka 6: Reakčné podmienky na detekciu plazmidovo-kódovaných AmpC β -laktamáz

Jednotlivé kroky reakcie	Počet cyklov	Teplota/Čas
Počiatočná denaturácia	1	95 °C/5 min
Denaturácia	30	95 °C/40 s
Hybridizácia primerov		64 °C/40 s
Extenzia		72 °C/1 min
Záverečná extenzia	1	72 °C/10 min

Na amplifikáciu *ampC* promótoru/atenuátora bola použitá dvojica primerov (Tab. 7). Zloženie reakčnej zmesi a parametre PCR uvádzajú tabuľky 8 a 9. Na kontrolu kvality PCR slúžila negatívna kontrola (bez obsahu bakteriálnej DNA).

Tabuľka 7: Použité oligonukleotidové primery na detekciu *ampC* génu

Cieľové miesto	Primer (nukleotidová sekvencia)	Referencie
<i>ampC</i>	Ec1 5'-GATCGTTCTGCCGCTGTG -3' Ec2 5'-GGGCAGCAAATGTGAGCAA -3'	57

Tabuľka 8: Zloženie reakčnej zmesi na detekciu *ampC* génu

PCR komponenty	Výsledná koncentrácia
PCR voda (Top-Bio, Česká republika)	
10x koncentrovaný reakčný pufor (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 pri 25 °C), 500 mM KCl, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl ₂) (Top-Bio, Česká republika)	1 x c(Mg ²⁺) = 1,5 mM
dNTPs (Promega, USA)	200 μ M
Primer-forward	0,25 μ M
Primer-reverse	0,25 μ M
<i>Taq</i> DNA Polymeráza Unis (Top-Bio, Česká republika)	2,5 U
Templátová DNA	

Tabuľka 9: Reakčné podmienky na detekciu *ampC* génu

Jednotlivé kroky reakcie	Počet cyklov	Teplota/Čas
Počiatočná denaturácia	1	95 °C/5 min
Denaturácia	30	95 °C/1 min
Hybridizácia primerov		65 °C/1 min
Extenzia		72 °C/1 min
Záverečná extenzia	1	72 °C/10 min

3.1.3.2 Elektroforetické delenie produktov amplifikácie

Výsledné PCR produkty boli podrobené elektroforetickej separácii v 1,5% (w/v) agarózovom géle, pripravenom rozpustením potrebného množstva práškovej agarózy (Serva, Nemecko) v 1x TBE pufrí (Biotech, Česká republika), zahriatím, ochladením na teplotu 50 °C, pridaním ethidium bromidu (1µg/ml) (Sigma-Aldrich, Nemecko) a následnou polymerizáciou na vzduchu. Samotná separácia prebiehala po preliatí zatuhnutého gélu elektródovým pufróm (1x TBE) pri napätí zodpovedajúcom veľkosti použitej vaničky (Elektroforetické vane Easy-Cast, model B2, Owl (Thermo Scientific, Veľká Británia)) (5 V/cm vzdialenosti elektród). Výsledné amplikóny boli vizualizované po expozícii UV svetlom (Transiluminátor Discovery TM (UltraLum, USA)) a ich veľkosť stanovená pomocou DNA markera s rozsahom fragmentov 200 – 1500 bp (Top-Bio, Česká republika).

3.1.3.3 Restričná analýza

SHV-pozitívne PCR produkty boli rozštiepené restričnou endonukleázou *NheI* (NewEngland BioLabs, USA) na identifikáciu mutácie v pozícii 238⁴³. Pre TEM-pozitívne PCR produkty boli použité restričné endonukleázy *MseI*, *Sau3AI*, *MspI* a *HphI* (NewEngland BioLabs, USA) na dôkaz mutácií v pozíciách 104, 164, 238 a 240⁴⁴. Zmes pre restrikciiu pozostávala zo sterilnej vody, reakčného pufru pre daný enzým, restričného enzýmu, PCR amplikónu (podľa doporučenia výrobcu) a bola inkubovaná pri 37 °C po dobu 16 hodín.

3.1.3.4 Elektroforetické delenie produktov restrikcie

Získané produkty po štiepení boli rozseparované gélovou elektroforézou v 2% (w/v) (SHV) alebo 2,5% (w/v) (TEM) agarózovom géle, pripravenom podľa postupu uvedenom v kap. 3.1.3.2. Výsledná veľkosť jednotlivých fragmentov bola stanovená pomocou vhodne zvolených DNA markerov s rozsahom fragmentov 200 – 1500 bp (Top-Bio, Česká republika) pre SHV a 20 – 1000 bp (Sigma-Aldrich, Nemecko) pre TEM vzorky.

3.1.3.5 Priame sekvenovanie

PCR pozitívne amplikóny boli purifikované využitím QIAquick Purification Kit (50) (QIAGEN, Nemecko) a podrobené sekvenovaniu na analyzátoře 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Purifikácia a následné sekvenovanie PCR produktov boli zabezpečené firmou Genex CZ, s.r.o. (Brno, Česká republika). Získané DNA sekvencie boli vyhodnotené pomocou voľne dostupných softwarov ClustalX: Multiple sequence alignment (<http://www.clustal.org/>), BLAST (Basic Local Alignment Searching Tool, National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov) a BioEdit (Biological Sequence Alignment Editor, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

3.1.4 Epidemiologická typizácia izolátov produkujúcich širokospektrálne β -laktamázy

Metóda pulznej gélovej elektroforézy (PFGE) umožňuje detegovať genetickú príbuznosť získaných izolátov a tým sledovať ich epidemiológiu.

3.1.4.1 Pulzná gélová elektroforéza

Celková genómová DNA bola izolovaná podľa postupu autorov Shi et al.⁸⁰ a následne štiepená cez noc restričným enzýmom *Xba*I (Roche Diagnostics, Nemecko). Separácia takto naštiepených fragmentov prebiehala pomocou PFGE na prístroji CHEF-DRII System (Bio-rad, USA) za nasledujúcich podmienok: 1,2% agarózový gél, 24 hodín pri napätí 6 V/cm a pulzných časoch 2 – 35 s. Po ukončení bol gél ofarbený v ethidium bromide (Sigma-Aldrich) (1 μ g/mL) a jednotlivé fragmenty boli vizualizované pod UV svetlom (Transiluminátor Discovery TM (UltraLum, USA)). Získané restričné mapy jednotlivých

izolátov boli porovnané použitím softwaru GelCompar II, version 2.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Koeficient podobnosti bol vypočítaný použitím Diceho algoritmu (na základe Diceho koeficientu podobnosti makrorestrikčných profilov stanovenom na 1,5 %) a analýza jednotlivých klastrov bola vykonaná využitím UPGNA algoritmu.

3.2 Analýza enterobaktérií s produkciou širokospektrálnych β -laktamáz v animálnej populácii

3.2.1 Zber, izolácia a identifikácia enterobakterií

V priebehu roku 2008 boli na hydinových farmách v rámci celej Moravy odoberané vzorky slepých čriev brojlerov (starých cca 35 až 40 dní). Pre pokrytie sezónneho výskytu boli vzorky na farmách odoberané vždy jedenkrát mesačne po celý rok 2008. Z jednej farmy bolo vždy získaných 10 vzoriek slepých čriev od náhodne vybraných vtákov v rámci jednej farmy. Všetkých 10 bolo uložených do sterilného umelohmotného vrečka a transportovaných ako zmesová vzorka do laboratória. Takto bolo v roku 2008 odobraných k vyšetreniu 154 zmesových vzoriek obsahov slepých čriev. V laboratóriu boli obsahy týchto čriev premiešané a zmesová vzorka bola vyočkovaná na selektívnu pôdu chromID ESBL (bioMérieux, Francúzsko) a inkubovaná aerobne pri 37 °C po dobu 24 hodín.

Ďalšími vzorkami boli kloakálne výtery moriek z troch rôznych fariem, získané ihneď po usmrtení. Morky boli približne 12 týždňov staré. Vzorky boli zozbierané v troch časových intervaloch, v septembri 2008, v marci 2009 a v máji 2009. Ihneď po zozbieraní boli jednotlivé vzorky poslané do laboratória a vyočkované na selektívne médium chromID ESBL (bioMérieux, Francúzsko) a inkubované aerobne pri 37 °C po dobu 24 hodín.

Všetky suspektné kolónie vyrastené na selektívnom médiu boli vyočkované na krvný agar (bioMérieux, Francúzsko), identifikované použitím ENTEROtestu 16 (Pliva-Lachema Diagnostika, Česká republika) a podrobené fenotypovej a genetickej detekcii širokospektrálnych β -laktamáz.

3.2.2 Fenotypová detekcia produkcie širokospektrálnych β -laktamáz

Obdobne ako u izolátov z humánnej oblasti, fenotypové stanovenie bolo zamerané na identifikáciu produkcie ESBL a AmpC enzýmov pomocou modifikovaného DDST a AmpC diskového testu.

3.2.2.1 Fenotypová detekcia produkcie ESBL

Na fenotypové stanovenie produkcie ESBL bol použitý modifikovaný DDST popísaný v kap. 3.1.2.1

3.2.2.2 Fenotypová detekcia produkcie AmpC

AmpC β -laktamázy boli detegované modifikovaným AmpC diskovým testom popísaným v kap. 3.1.2.2

3.2.3 Genetická detekcia širokospektrálnych β -laktamáz

Genetické stanovenie prítomnosti *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} génu bolo vykonané pomocou PCR, s následnou charakterizáciou získaných produktov metódou restriktívnej analýzy a priameho sekvenovania. Na potvrdenie produkcie AmpC β -laktamáz bola použitá multiplex PCR. Všetky postupy sú popísané v kap. 3.1.3.

3.2.4 Epidemiologická typizácia izolátov s produkciou širokospektrálnych β -laktamáz

Na epidemiologickú typizáciu získaných izolátov bola použitá metóda PFGE (kap. 3.1.4.1).

3.3 Využitie metódy PCR a analýzy krivky topenia DNA pri genetickej charakterizácii ESBL-pozitívnych izolátov

Jedným z dôležitých cieľov práce bola snaha o vyvinutie rýchlej a nenáročnej metodiky na detekciu troch najvýznamnejších génov (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M}) kódujúcich produkciu β -laktamáz a to v rámci jednej reakcie.

3.3.1 Genetická charakterizácia *bla* génu pomocou multiplex PCR a analýzy krivky topenia u zbierkových kmeňov

Základom genetickej analýzy bola amplifikácia jednotlivých génov pomocou multiplex PCR a následná charakterizácia získaných amplikónov pomocou analýzy krivky topenia DNA.

3.3.1.1 Multiplex PCR

Za účelom vyvinutia a optimalizácie metodiky na detekciu *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M} génu v jednej reakcii bola využitá časť bakteriálnej zbierky Ústavu mikrobiologie LF UP v Olomouci, pozostávajúca z 51 bakteriálnych kmeňov, u ktorých bola prítomnosť jednotlivých β -laktamáz určená pomocou PCR a metódy priameho sekvenovania (Tab. 10).

Tabuľka 10: Zoznam zbierkových kontrolných kmeňov so známym obsahom β -laktamáz

Bakteriálny druh	Počet kmeňov	Typ prítomnej β -laktamázy
<i>Escherichia coli</i>	2	TEM-1
<i>Escherichia coli</i>	3	CTX-M-1
<i>Escherichia coli</i>	10	CTX-M-15
<i>Escherichia coli</i>	2	CTX-M-9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	SHV-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	SHV-2a
<i>Escherichia coli</i>	2	SHV-12
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	SHV-12
<i>Escherichia coli</i>	11	CTX-M-15 + TEM-1
<i>Escherichia coli</i>	2	CTX-M-9 skupina + TEM-1
<i>Escherichia coli</i>	1	CTX-M-14 + TEM-1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	SHV-2 + TEM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	SHV-2a + TEM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	CTX-M-1 skupina + TEM-1 + SHV-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	CTX-M-15 + TEM-1 + SHV-1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	CTX-M-15 + TEM-1 + SHV-1

Pred samotným stanovením boli jednotlivé kmene preočkované na mäso-peptónový agar (Oxoid, Veľká Británia) a inkubované aerobne pri 37 °C, 16 hodín. Nasledovalo rozsuspendovanie dvoch kolónií v 100 μ l vody a zahriatie na 95 °C po dobu 10 minút. Supernatant obsahujúci bakteriálnu DNA bol získaný centrifugáciou (13000 g, 2 minúty) a použitý pre následnú amplifikáciu ako templátová DNA.

Multiplex PCR analýza génov kódujúcich produkciu troch najvýznamnejších typov β -laktamáz *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} prebiehala v prístroji Rotor-Gene 6000 (QIAGEN, Nemecko) v reakčnom objeme 25 μ l s využitím špecifických primerov pre jednotlivé *bla* gény. Použité sady primerov, zloženie reakčnej zmesi a parametre PCR uvádzajú tabuľky 11, 12 a 13. Na kontrolu kvality PCR slúžila negatívna kontrola (bez obsahu bakteriálnej DNA).

Na otestovanie reprodukovateľnosti nového detekčného systému bola vykonaná opätovná kultivácia zbierkových kmeňov, izolácia DNA a následná multiplex PCR, takže pre ďalšiu analýzu boli k dispozícii dve nezávislé sady amplikónov.

Tabuľka 11: Použité oligonukleotidové primery na detekciu *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M} génov pomocou multiplex PCR

Cieľové miesto	Primer (nukleotidová sekvencia)	Referencie
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-F 5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG-3'	44
	TEM-R 5'-CCAATGCTTAATCAGTGAGC-3'	
<i>bla</i> _{SHV}	SHV2-F 5'-TCAGCGAAAAACACCTTG-3'	42
	SHV2-R 5'-TCCCGCAGATAAATCACCA-3'	
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-MU1 5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGT-3'	78
	CTX-MU2 5'-TGGGTRAARTARGTSACCAGA-3'	

Tabuľka 12: Zloženie reakčnej zmesi na detekciu *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M} génov pomocou multiplex PCR

PCR komponenty	Výsledná koncentrácia
PCR voda (Top-Bio, Česká republika)	
10x koncentrovaný reakčný pufor bez MgCl ₂ (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 pri 25 °C), 500 mM KCl, 1% Triton X-100) (Top-Bio, Česká republika)	1 x
25 mM MgCl ₂ (Top-Bio, Česká republika)	c(Mg ²⁺) = 2 mM
dNTPs (Promega, USA)	200 μM
Primer-forward	0,8 μM (TEM-F, SHV2-F) 0,4 μM (CTX-MU1)
Primer-reverse	0,8 μM (TEM-R, SHV2-R) 0,4 μM (CTX-MU2)
<i>Taq</i> DNA Polymeráza Unis (Top-Bio, Česká republika)	2 U
LCGreen Plus+ (Idaho Technology, USA)	0,4 x
Templátová DNA	

Tabuľka 13: Reakčné podmienky na detekciu *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M} génov pomocou multiplex PCR

Jednotlivé kroky reakcie	Počet cyklov	Teplota/Čas
Počiatočná denaturácia	1	95 °C/7 min
Denaturácia	35	95 °C/30 s
Hybridizácia primerov		58 °C/30 s
Extenzia		72 °C/1 min
Záverečná extenzia	1	72 °C/7 min

3.3.1.2 Analýza krivky topenia s vysokým rozlíšením

Po ukončení amplifikácie bolo 10 µl PCR produktov prenesených do sklenených kapilárnych kyviet (Roche, Nemecko), ktoré boli scentrifugované (1000 g, 60 s) a následne umiestnené do prístroja HR-1 high resolution melter (Idaho, Technology, USA), v ktorom bola vykonaná samotná analýza. Rýchlosť teplotného prechodu bola nastavená na 0,3 °C/s, z počiatocnej hodnoty 75 °C po konečnú hodnotu 99 °C. Získané výsledky boli spracované pomocou softwaru HR-1 Melt Analysis (Idaho Technology, USA). Počas spracovania vzoriek boli jednotlivé krivky normalizované podľa odporúčaní výrobcu. Cieľom normalizácie bolo nastaviť fluorescenčný signál pred a po analýze na rovnakú hodnotu (od hodnoty 100 % až po hodnotu 0 %). Optimálne teplotné intervaly pre normalizáciu boli určené v rozmedzí 81 – 83 °C až 96 – 98 °C, iba pre SHV a pre kombináciu SHV + TEM β-laktamáz bol zvolený mierne pozmenený teplotný interval 82 – 84 °C až 96 – 98 °C. Po ukončení analýzy boli data exportované do programu Microsoft Office Excel, z dôvodu neschopnosti softwaru spracovať naraz viac než 32 vzoriek. Pre lepšie optické porovnanie boli jednotlivé data a ich opakované merania rozdelené podľa obsahu *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M} génov alebo ich vzájomných kombinácií do jednotlivých zošitov programu Microsoft Office Excel a boli vytvorené konečné grafy. Výsledné krivky topenia predstavujú závislosť hodnoty fluorescencie (os Y) od narastajúcej teploty (os X).

3.3.1.3 Elektroforetické delenie produktov amplifikácie

Získané PCR produkty boli podrobené elektroforetickej separácii v 1,5% (w/v) agarozovom géle (postup prípravy a samotnej realizácie popísaný v kap. 3.1.3.2) za účelom overenia presnosti amplifikácie.

3.3.2 Genetická charakterizácia *bla* génu pomocou multiplex PCR a analýzy krivky topenia u klinických izolátov

Štúdia zameraná na genetickú charakterizáciu ESBL-pozitívnych kmeňov *Escherichia coli* od pacientov z jednotiek intenzívnej starostlivosti bola realizovaná za účelom overenia aplikovateľnosti novej metódy v klinickej praxi.

3.3.2.1 Zber, izolácia, identifikácia a fenotypové určenie produkcie ESBL u klinických izolátov *Escherichia coli* od pacientov hospitalizovaných na jednotkách intenzívnej starostlivosti

Štúdia prebiehala v 3 zdravotníckych zariadeniach Českej republiky, v Krajskej nemocnici Tomáša Baťu (KNTB) v Zlíne, Fakultnej nemocnici Ostrava (FNO) a FNOL. Enterobaktérie boli izolované z klinického materiálu (tracheálneho endosekrétu, bronchoalveolárnej laváže, sputa, krvi, hnisu, punktátu, sekrétu z rany) pacientov hospitalizovaných v období 1.1. – 31.12.2009. Kultivácia vzoriek prebiehala podľa štandardných mikrobiologických postupov, na identifikáciu baktérií bol použitý ENTEROtest 16 (Pliva-Lachema Diagnostica, Česká republika) a v určitých prípadoch aj automatizovaný systém Phoenix (Becton Dickinson, USA). Výber bol realizovaný tak, že od jedného pacienta bol zaradený iba jeden izolát daného druhu, ktorý bol získaný z príslušného materiálu ako prvý. Na ďalšiu analýzu boli použité iba kmene *Escherichia coli* od pacientov z jednotiek intenzívnej starostlivosti (JIS), u ktorých sa potvrdila produkcia ESBL pomocou modifikovaného DDST (postup metodiky popísaný v kap. 3.1.2.1).

3.3.2.2 Multiplex PCR

Izolácia genómovej DNA a následná multiplex PCR na detekciu jednotlivých *bla* génov v jednej reakcii prebiehala podľa rovnakého postupu akým bola realizovaná u zbierkových kmeňov (kap. 3.3.1.1), vrátane opakovanej izolácie a amplifikačnej reakcie. Ako pozitívne kontroly boli použité kmene so známym zastúpením β -laktamáz *Escherichia coli* (SHV-12), *Escherichia coli* (TEM-1), *Escherichia coli* (CTX-M-9) a *Escherichia coli* (CTX-M-15).

3.3.2.3 Analýza krivky topenia s vysokým rozlíšením

Získanie zastúpenia jednotlivých *bla* génov pomocou analýzy krivky topenia s vysokým rozlíšením u jednotlivých vzoriek bolo realizované podľa postupu uvedeného v kap. 3.3.1.2.

3.3.2.4 Elektroforetické delenie produktov amplifikácie

Prebiehalo analogicky ako u amplikónov získaných pri amplifikácií génov u zbierkových kmeňov (kap. 3.3.1.3).

3.3.2.5 Priame sekvenovanie

Na získanie presnej sekvencie jednotlivých amplikónov bola použitá metóda priameho sekvenovanie popísaná v kap. 3.1.3.5.

3.4 Epidemiologická analýza ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* z JIS a charakterizácia génov kódujúcich ich produkciu

3.4.1 Pulzná gélová elektroforéza

Na sledovanie výskytu identických kmeňov medzi rôznymi pacientmi bola použitá PFGE realizovaná podľa postupu uvedeného v kap. 3.1.4.1.

3.4.2 Detekcia inzerčných sekvencií pomocou PCR

Okolie *bla*_{CTX-M} génu bolo charakterizované použitím PCR. Jednotlivé primery umožnili amplifikáciu inzerčných sekvencií *ISEcp1* a *IS26* (vyskytujúcich sa často v upstream pozícií od génu kódujúceho CTX-M β -laktamázy) (Tab. 14). Do reakcie bola použitá templátová DNA vyizolovaná pre multiplex PCR. Zloženie reakčnej zmesi a parametre PCR uvádzajú tabuľky 15 a 16. Na kontrolu kvality PCR slúžila negatívna kontrola (bez obsahu bakteriálnej DNA).

Tabuľka 14: Použité oligonukleotidové primery na detekciu inzerčných sekvencií

Cieľové miesto	Primer (nukleotidová sekvencia)	Referencie
<i>tnpISEcp1</i>	<i>ISEcp1</i> 5'-AAAAATGATTGAAAGGTGGT-3'	81
	CTX-MU2 5'-TGGGTRAARTARGTSACCAGA-3'	78
<i>tnpIS26</i>	<i>IS26</i> 5'-AGCGGTAAATCGTGGAGTGA-3'	81
	CTX-MU2 5'-TCCCGCAGATAAATCACCA-3'	78

Tabuľka 15: Zloženie reakčnej zmesi na detekciu inzerčných sekvencií

PCR komponenty	Výsledná koncentrácia
PCR voda (Top-Bio, Česká republika)	
10x koncentrovaný reakčný pufo (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 pri 25 °C), 500 mM KCl, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl ₂) (Top-Bio, Česká republika)	1 x c(Mg ²⁺) = 1,5 mM
dNTPs (Promega, USA)	200 µM
Primer-forward	0,8 µM
Primer-reverse	0,8 µM
<i>Taq</i> DNA Polymeráza Unis (Top-Bio, Česká republika)	1 U
Templátová DNA	

Tabuľka 16: Reakčné podmienky na detekciu inzerčných sekvencií

Jednotlivé kroky reakcie	Počet cyklov	Teplota/Čas
Počiatočná denaturácia	1	95 °C/5 min
Denaturácia	30	95 °C/1 min
Hybridizácia primerov		60 °C/1 min
Extenzia		72 °C/1 min
Záverečná extenzia	1	72 °C/10 min

Výsledné produkty boli rozseparované v 1,5% (w/v) agarózovom géle (popis postupu v kap. 3.1.3.2). Vzhľadom na to, že u PCR nebola použitá pozitívna kontrola, bolo potrebné vybrané produkty osekvenovať. Samotné sekvenovanie prebiehalo podľa postupu uvedeného v kap. 3.1.3.5.

3.4.3 Izolácia plazmidov

Izolácia plazmidovej DNA prebiehala z tekutej kultúry, pripravenej naočkovaním dvoch kolónií testovaného kmeňa do média s prídavkom ampicilínu (Biotika, Slovenská republika) tak, aby výsledná koncentrácia antibiotika bola 100 µg/ml. Tekuté médium bolo

pripravené navážením potrebného množstva práškoveho tryptónu (Oxoid, Veľká Británia), kvasničného extraktu (HiMedia, India) a chloridu sodného (Lach-Ner, Česká republika), doplnením vodou a vysterilizovaním. Nasledovala aerobna kultivácia pri 37 °C, 16 hodín, 150 rpm (vodný kúpeľ, trepací SW 22 (JULABO, Nemecko)). Na izoláciu DNA bol použitý QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Nemecko) a postup uvedený v popise od výrobcu. Na záver boli získané plazmidy rozseparované v 0,8% (w/v) agarózovom géle a ich približná veľkosť stanovená porovnaním s fragmentmi markera DNA ladder, supercoiled (Sigma-Aldrich, Nemecko).

3.4.4 Konjugačné experimenty a charakterizácia vybraných plazmidov

Ako akceptor sledovaných determinantov rezistencie (plazmidov) pri konjugačných experimentoch bol použitý kmeň *Escherichia coli* DH5 α (Kan^R) (kmeň pochádzal z bakteriálnej zbierky Ústavu mikrobiologie LF UP), ako donor 6 vybraných CTX-M-positívnych klinických izolátov *Escherichia coli* od pacientov z FNOL. Tekuté kultúry donora a akceptora pripravené naočkovaním dvoch kolónií do média (podľa postupu uvedeného v kap. 3.4.3) boli zmiešané v pomere 1:4 a inkubované pri 37 °C, 16 hod. Konjuganty boli získané rastom na selektívnych pevných pôdach. Príprava týchto pôd spočívala v navážení potrebného množstva kvasničného extraktu, tryptónu, chloridu sodného, bakteriologického agaru, doplnením vodou, vysterilizovaním, ochladením na teplotu 50 °C, pridaním selekčných látok, kanamycínu (Kan) (Carl-Roth, Nemecko) a cefotaximu (CTX) (Serva, Nemecko) tak, aby výsledná koncentrácia bola $c_{\text{Kan}} = 700 \mu\text{g/ml}$ a $c_{\text{CTX}} = 1 \mu\text{g/ml}$ a zatuhnutím. U vyrastených kolónií bola izolovaná plazmidová DNA (kap. 3.4.3), overená prítomnosť *bla* génov pomocou PCR a gélovej elektroforézy (kap. 3.1.3.1 a 3.1.3.2).

U vybraných izolátov bola uskutočnená typizácia plazmidov a zaradenie do tzv. inkompatibilných skupín metódou PCR založenou na amplifikácii replikónov. Použité primery umožnili amplifikovať replikón F (FIA, FIB, FII), H (HI1, HI2) a K (Tab. 17). Zloženie reakčnej zmesi a parametre PCR reakcie uvádzajú tabuľky 18 a 19. Na kontrolu kvality PCR reakcie slúžila negatívna kontrola (bez obsahu bakteriálnej DNA).

Tabuľka 17: Použité oligonukleotidové primery na typizáciu plazmidov

Cieľové miesto	Primer (nukleotidová sekvencia)	Referencie
RNAI/ <i>repA</i>	F _{rep} FW 5'-TGATCGTTTAAGGAATTTTG-3' F _{rep} RV 5'-GAAGATCAGTCACACCATCC-3'	64
Iterony	FIA FW 5'-CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG-3' FIA RV 5'-GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG-3'	
<i>repA</i>	FIB FW 5'-CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT-3' FIB RW 5'-CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT-3'	
<i>parA-parB</i>	HI1 FW 5'-GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC-3' HI1 RV 5'-TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA-3'	
Iterony	HI2 FW 5'-TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC-3' HI2 RV 5'-GGCTCACTACCGTTGTCATCCT-3'	
RNAI	K/B FW 5'-GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC-3' K RV 5'-TCTTTCACGAGCCCGCCAAA-3'	
<i>repA</i>	CA1 5'-ATGTCGCASAYHGAAAATGC-3' OR1 5'-CCTTGCAGTTWWHTGTGRRTAA-3'	82

Tabuľka 18: Zloženie reakčnej zmesi na typizáciu plazmidov

PCR komponenty	Výsledná koncentrácia
PCR voda (Top-Bio, Česká republika)	
10 x koncentrovaný reakčný pufo (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 pri 25 °C), 500 mM KCl, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl ₂) (Top-Bio, Česká republika)	1 x c(Mg ²⁺) = 1,5 mM
dNTPs (Promega, USA)	200 μM
Primer-forward	1 μM
Primer-reverse	1 μM
<i>Taq</i> DNA Polymeráza Unis (Top-Bio, Česká republika)	1 U
Templátová DNA	

Tabuľka 19: Reakčné podmienky na typizáciu plazmidov

Jednotlivé kroky reakcie	Počet cyklov	Teplota/Čas
Počiatočná denaturácia	1	95 °C/5 min
Denaturácia	30	95 °C/1 min
Hybridizácia primerov		52 °C/30s pre F _{rep} primery 54 °C/30s pre FII primery 60 °C/30 s ostatné
Extenzia		72 °C/1 min
Záverečná extenzia	1	72 °C/10 min

4 VÝSLEDKY

4.1 Analýza enterobaktérií s produkciou širokospektrálnych β -laktamáz v humánnej populácii

4.1.1. Stanovenie prevalencie enterobaktérií produkujúcich širokospektrálne β -laktamázy ESBL a AmpC typu

Nasledujúce kapitoly uvádzajú prevalenciu enterobaktérií produkujúcich enzýmy so širokým spektrom účinku u pacientov hospitalizovaných vo FNOL a v gastrointestinálnom trakte osôb z komunitného prostredia Olomouckého kraja.

4.1.1.1 Výskyt ESBL-pozitívnych izolátov *Klebsiella pneumoniae* u pacientov v intenzívnej starostlivosti

V sledovanom období, t. j. od 1.11.2006 – 30.3.2007 bolo z klinického materiálu pacientov hospitalizovaných na Klinike anesteziológie a resuscitácie FNOL získaných celkovo 67 izolátov *Klebsiella pneumoniae*. U 19 z nich bol preukázaný antibiogram s MIC aspoň jedného z testovaných cefalosporínov III. generácie (cefotaximu, ceftazidimu alebo cefoperazonu) vyššou ako 1 $\mu\text{g/ml}$. Na základe modifikovaného DDST bola produkcia ESBL stanovená u 13 izolátov (19,4 % z celkového počtu).

4.1.1.2 Výskyt ESBL- a AmpC-pozitívnych enterobaktérií v gastrointestinálnom trakte chorých osôb

V priebehu jedného roka (1.5.2007 – 1.5.2008) bolo vyšetrených 546 rektálnych výterov od pacientov hospitalizovaných vo FNOL. Na základe pozitívneho rastu na chromID ESBL selektívnom médiu a následnej identifikácie bolo získaných celkovo 13 izolátov čeľade *Enterobacteriaceae* produkujúcich širokospektrálne β -laktamázy. ESBL fenotyp bol preukázaný pomocou modifikovaného DDST u 8 izolátov enterobaktérií (*Escherichia coli* – 6, *Klebsiella pneumoniae* – 1 a *Enterobacter aerogenes* – 1). Celková prevalencia ESBL-pozitívnych baktérií v gastrointestinálnom trakte hospitalizovaných

pacientov bola 1,5 %. AmpC produkcia bola s využitím AmpC diskového testu stanovená u 5 izolátov enterobaktérií (*Klebsiella pneumoniae* – 2, *Citrobacter freundii* – 2 a *Escherichia coli* – 1). Prevalencia AmpC-pozitívnych baktérií bola u tejto skupiny pacientov stanovená na hodnotu 0,9 %.

4.1.1.3 Výskyt ESBL a AmpC pozitívnych enterobaktérií v gastrointestinálnom trakte zdravých osôb

V priebehu jedného roka (1.5.2007 – 1.5.2008) bolo získaných celkovo 579 rektálnych výterov od zdravých osôb žijúcich v oblasti Olomouckého kraja Českej republiky. Na základe pozitívneho rastu na chromID ESBL selektívnom médiu a následnej identifikácie bola produkcia širokospektrálnych β -laktamáz zistená u 13 enterobaktérií, pričom ESBL fenotyp bol stanovený u 7 izolátov *Escherichia coli* a produkcia AmpC enzýmov u 6 izolátov čeľade *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter cloacae* – 3, *Citrobacter freundii* – 1, *Escherichia coli* – 1 a *Enterobacter aerogenes* – 1). Výsledná prevalencia ESBL pozitívnych baktérií v gastrointestinálnom trakte osôb z komunitného prostredia Olomouckého kraja bola 1,2 %, prevalencia baktérií s produkciou AmpC β -laktamáz 1,0 %.

4.1.1.4 Výskyt AmpC-pozitívnych izolátov *Klebsiella pneumoniae* u pacientov s hematoonkologickým ochorením

Z klinického materiálu pacientov hospitalizovaných na Hemato-onkologickej klinike FNOL bolo v priebehu dvoch mesiacov (5.1. – 5.3.2007) získaných celkovo 35 izolátov *Klebsiella pneumoniae*, pričom hodnota MIC vyššia ako 1 $\mu\text{g/ml}$ aspoň jedného z testovaných cefalosporínov III. generácie bola preukázaná u 15 z nich. Test na detekciu ESBL bol u tejto skupiny negatívny, naopak produkcia AmpC β -laktamáz bola potvrdená u 7 (20,0 % z celkového počtu).

4.1.1.5 Výskyt AmpC-pozitívnych izolátov čeľade *Enterobacteriaceae* u novorodencov

V období 1.4.2008 – 31.8.2009 bolo na novorodeneckom oddelení FNOL zachytených 1069 izolátov enterobaktérií, pričom AmpC diskový test bol pozitívny u 12 (*Enterobacter cloacae* – 2, *Citrobacter youngae* – 1, *Citrobacter freundii* – 1, *Morganella*

morganii – 1, *Klebsiella pneumoniae* – 1, *Escherichia coli* – 6), čo predstavuje 1,1 % z celkového počtu získaných baktérií.

4.1.2 Genetická charakterizácia enterobaktérií produkujúcich širokospektrálne β -laktamázy ESBL a AmpC typu

Genetická analýza bola zameraná na stanovenie prítomnosti génov kódujúcich produkciu širokospektrálnych enzýmov, s následným určením konkrétneho typu β -laktamázy a epidemiologickú typizáciu kmeňov, u ktorých boli tieto enzýmy detegované.

4.1.2.1 ESBL-pozitívne izoláty *Klebsiella pneumoniae* u pacientov v intenzívnej starostlivosti

Z celkového počtu 13 izolátov *Klebsiella pneumoniae*, určených ako ESBL producenti na základe pozitívneho modifikovaného DDST, bola pomocou PCR dokázaná prítomnosť *bla*_{SHV} génu u všetkých. Restričné štiepenie s využitím *NheI* odhalilo mutáciu v pozícii 238 (zmenu GGC za AGC), ako najčastejšie sa vyskytujúcu mutáciu zodpovednú za vznik ESBL fenotypu, u všetkých *bla*_{SHV} pozitívnych vzoriek. Následné priame sekvenovanie potvrdilo výsledky restriktnej analýzy (Obr. 1) a umožnilo určiť konkrétny typ prítomného SHV enzýmu. Výskyt génu kódujúceho TEM typ ESBL nebol pomocou restriktnej analýzy ani priameho sekvenovania potvrdený. Súhrnné výsledky uvádza tabuľka 20. Epidemiologická typizácia zistila za sledované obdobie prítomnosť 11 rôznych kmeňov, pričom boli identifikované dve dvojice izolátov, ktoré predstavovali ten istý kmeň (prvý – izolát 9 a 13, druhý – izolát 5 a 12).

Obrázok 1: Porovnanie nukleotidových sekvencií SHV-2, SHV-2a a SHV-12 s SHV-1 pre aminokyselinovú pozíciu 238 u vybraných kmeňov *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae – izolát č.4

SHV-2	661	ctgccggcggggctggtttatcgccgataagaccggagct	agc	gagcggggtgcgcgcggg	720																
SHV-1	859	ctgccggcggggctggtttatcgccgataagaccggagct	ggc	gagcggggtgcgcgcggg	918																
		L	P	A	G	W	F	I	A	D	K	T	G	A	G	E	R	G	A	R	G

***Klebsiella pneumoniae* - izolát č.5**

```
SHV-2a    721    gatccggttccgtgctgcccggcgggctggtttatcgccgataagaccggagctagcgagcg 780
          |||
SHV-1     846    gatccggttccgtgctgcccggcgggctggtttatcgccgataagaccggagctggcgagcg 905
          |||
          I R S V L P A G W F I A D K T G A G E R
```

***Klebsiella pneumoniae* - izolát č.10**

```
SHV-12    661    ctgccggcgggctggtttatcgccgataagaccggagctagcaagcggggtgcgcgcggg 720
          |||
SHV-1     859    ctgccggcgggctggtttatcgccgataagaccggagctggcgagcggggtgcgcgcggg 918
          |||
          L P A G W F I A D K T G A G E R G A R G
```

SHV-1 - enzým s úzkym spektrom účinku
 SHV-2, SHV-2a, SHV-12 - enzýmy so širokým spektrom účinku

Tabuľka 20: Výsledky PCR, restrikčnej analýzy a priameho sekvenovania u ESBL-
 pozitívnych izolátov *Klebsiella pneumoniae* od pacientov v intenzívnej
 starostlivosti

Číslo izolátu	Bakteriálny druh	<i>bla_{SHV}</i>	Restrikčná analýza	<i>bla_{TEM}</i>	Restrikčná analýza	Typ prítomnej β-laktamázy
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	SHV-2a, TEM-1
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	SHV-2a, TEM-1
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	SHV-12, TEM-1
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	SHV-2, TEM-1
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	SHV-2a, TEM-1
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	SHV-2a, TEM-1
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	-		SHV-2
8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	SHV-2a, TEM-1
9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	SHV-2a, TEM-1
10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	SHV-12, TEM-1
11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	SHV-2a, TEM-1
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	SHV-2a, TEM-1
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	SHV-2a, TEM-1

4.1.2.2 ESBL- a AmpC-pozitívne izoláty čeľade *Enterobacteriaceae* v gastrointestinálnom trakte chorých osôb

Súhrnné výsledky genetickej charakterizácie 8 ESBL- a 5 AmpC-pozitívnych izolátov z gastrointestinálneho trakte pacientov hospitalizovaných vo FNOL sú uvedené v tabuľkách 21 a 22. Použitím PCR a priameho sekvenovania bol u všetkých ESBL-pozitívnych vzoriek zaznamenaný výskyt CTX-M β -laktamáz, konkrétne šlo o CTX-M-15 typ. Popri tom boli u mnohých izolátov detegované aj enzýmy s úzkym spektrom účinku, a síce TEM-1 a OXA-1 β -laktamázy. AmpC enzýmy boli zastúpené DHA a CIT typmi. U ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* bola vykonaná PFGE, z výsledkov ktorej vyplýva, že nebolo zaznamenané klonálne šírenie medzi jednotlivými pacientmi (Obr. 2).

Tabuľka 21: Výsledky PCR, restrikčnej analýzy a priameho sekvenovania u ESBL-pozitívnych enterobaktérií z gastrointestinálneho traktu chorých osôb

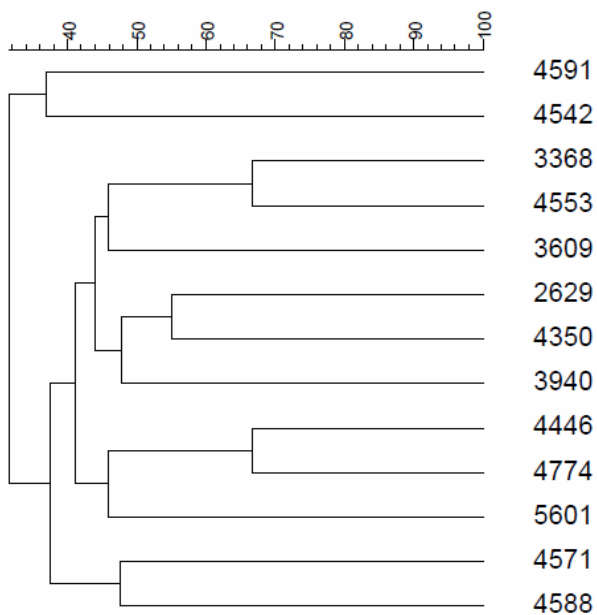
Číslo izolátu	Bakteriálny druh	<i>bla</i> _{SHV}	Restrikčná analýza	<i>bla</i> _{TEM}	Restrikčná analýza	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{OXA-1}	<i>bla</i> _{OXA-2}	<i>bla</i> _{OXA-10}	Typ prítomnej β-laktamázy
3940	<i>Escherichia coli</i>	-		+	-	+	+	-	-	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1
4350	<i>Escherichia coli</i>	-		+	-	+	-	-	-	TEM-1, CTX-M-15
2629	<i>Escherichia coli</i>	-		-		+	-	-	-	CTX-M-15
3368	<i>Escherichia coli</i>	-		-		+	+	-	-	CTX-M-15, OXA-1
5601	<i>Escherichia coli</i>	-		+	-	+	+	-	-	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1
3609	<i>Escherichia coli</i>	-		-		+	+	-	-	CTX-M-15, OXA-1
3301	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	SHV-1, TEM-1, CTX-M-15, OXA-1
5290	<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	SHV-1, TEM-1, CTX-M-15, OXA-1

Tabuľka 22: Výsledky PCR u AmpC-pozitívnych enterobaktérií z gastrointestinálneho traktu chorých osôb

Číslo izolátu	Bakteriálny druh	Typ prítomnej β -laktamázy
2869	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DHA
4535	<i>Escherichia coli</i>	CIT
6346	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DHA
4525	<i>Citrobacter freundii</i>	CIT
3329	<i>Citrobacter freundii</i>	CIT

Obrázok 2: Výsledný dendrogram ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* z gastrointestinálneho traktu chorých a zdravých osôb

Jaccard (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
PFGE



Legenda: horizontálna os – podobnosť kmeňov v percentách
vertikálna os – čísla izolátov

4.1.2.3 ESBL a AmpC-pozitívne izoláty čeľade *Enterobacteriaceae* v gastrointestinálnom trakte zdravých osôb

Celkové výsledky genetickej analýzy enterobaktérií s produkciou širokospektrálnych β -laktamáz sú uvedené v tabuľkách 23 a 24. Na rozdiel od izolátov z nemocničného prostredia, kde bol detegovaný iba CTX-M-15 typ širokospektrálnej β -laktamázy, u komunitných kmeňov bola zaznamenaná aj CTX-M-1 β -laktamáza a enzýmy patriace do CTX-M-9 skupiny. Z AmpC enzýmov sa vyskytol EBC a CIT typ. V prípade izolátu 4462 sa geneticky nepotvrdila prítomnosť AmpC β -laktamáz, hoci fenotypové určenie tomu naznačovalo. PFGE odhalila výskyt jedinečných restriktčných profilov, takže jednotlivé vzorky ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* neboli geneticky príbuzné (Obr. 2).

Tabuľka 23: Výsledky PCR, restriktnej analýzy a priameho sekvenovania u ESBL-pozitívnych enterobaktérií z gastrointestinálneho traktu zdravých osôb

Číslo izolátu	Bakteriálny druh	<i>bla</i> _{SHV}	Restriktčná analýza	<i>bla</i> _{TEM}	Restriktčná analýza	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{OXA-1}	<i>bla</i> _{OXA-2}	<i>bla</i> _{OXA-10}	Typ prítomnej β-laktamázy
4553	<i>Escherichia coli</i>	-		-		+	+	-	-	CTX-M-15, OXA-1
4571	<i>Escherichia coli</i>	-		-		+	-	-	-	CTX-M-9 skupina
4591	<i>Escherichia coli</i>	-		+	-	+	-	-	-	CTX-M-9 skupina, TEM-1
4774	<i>Escherichia coli</i>	-		-		+	-	-	-	CTX-M-1
4588	<i>Escherichia coli</i>	-		-		+	+	-	-	CTX-M-15, OXA-1
4542	<i>Escherichia coli</i>	-		+	-	+	+	-	-	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1
4446	<i>Escherichia coli</i>	-		-		+	-	-	-	CTX-M-15

Tabuľka 24: Výsledky PCR u AmpC-pozitívnych enterobaktérií z gastrointestinálneho traktu zdravých osôb

Číslo izolátu	Bakteriálny druh	Typ prítomnej β -laktamázy
4610	<i>Enterobacter cloacae</i>	EBC
4551	<i>Enterobacter cloacae</i>	EBC
4673	<i>Enterobacter cloacae</i>	EBC
4492	<i>Citrobacter freundii</i>	CIT
4644	<i>Escherichia coli</i>	CIT
4462	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-

4.1.2.4 AmpC-pozitívne izoláty *Klebsiella pneumoniae* od pacientov s hematoonkologickým ochorením

Pomocou multiplex PCR bol u siedmych izolátov, fenotypovo určených ako AmpC producenti, pozorovaný iba jeden amplifikačný produkt veľkosti 405 bp, odpovedajúci DHA-typu plazmidovo-kódovaných enzýmov. S využitím PFGE boli určené 2 klony (2 dvojice izolátov pochádzajúcich vždy od jedného pacienta z rôznych klinických materiálov) a 3 kmene s jedinečným restriktčným profilom.

4.1.2.5 AmpC-pozitívne izoláty čeľade *Enterobacteriaceae* u novorodencov

Z celkového počtu 12 AmpC-pozitívnych izolátov bolo pomocou PFGE identifikovaných 8 rôznych kmeňov (tri izoláty *Escherichia coli* z rôznych klinických materiálov od jedného a dva izoláty *Escherichia coli* od druhého pacienta predstavovali ten istý kmeň). Na detekciu AmpC β -laktamáz bola u týchto 8 kmeňov použitá multiplex PCR, ktorej výsledky sú uvedené v tabuľke 25.

Tabuľka 25: Výsledky PCR u AmpC-pozitívnych enterobaktérií u novorodencov

Číslo izolátu	Bakteriálny druh	Typ prítomnej β-laktamázy
A1	<i>Citrobacter youngae</i>	CIT
A2	<i>Escherichia coli</i>	-
A4	<i>Enterobacter cloacae</i>	EBC
A6	<i>Morganella morgani</i>	DHA
A9	<i>Citrobacter freundii</i>	CIT
A10	<i>Enterobacter cloacae</i>	EBC
A11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EBC
A12	<i>Enterobacter cloacae</i>	EBC

U vzorky A2, u ktorej nedošlo k amplifikácii požadovaného produktu využitím sady primerov, bola za účelom sledovania prítomnosti špecifických mutácií spojených s nadprodukciou AmpC cefalosporináz amplifikovaná oblasť promótoru/atenuátora. Pomocou PCR a následného priameho sekvenovania bola zistená prítomnosť šiestich charakteristických jednonukleotidových mutácií vedúcich k nadprodukcii AmpC enzýmu a to v pozíciách -88, -82, -42, -18, -1, +58 (Obr. 3).

Obrázok 3: Porovnanie získanej nukleotidovej sekvencie kmeňa *Escherichia coli* A2 a nukleotidovej sekvencie promótoru/atenuátora *ampC* génu *Escherichia coli* K12

-88 -82

```

A2      GCGATGCACGATCTG--AATT CACGT CCTGCGGGCAAATGGGTTTTCTACGGTCTGGCT
          |||||                |||      |||||                |||||                |||||
K-12    GCGATGCACGATCTGAAAAT CACGTA CCTGCGGGCAAATGGGTTTTCTACGGTCTGGCT

          -42    -35 box                            -18    -10 box                            -1

A2      GCTATCTTGACAGTTGTCACGCTGATTGGTATCGTTACAATCTAACGATCGCCAATGTA
          |||||                |||||                |||||                |||||
K-12    GCTATCTTGACAGTTGTCACGCTGATTGGTATCGTTACAATCTAACGATCGCCAATGTA
  
```

	+32	+58
A2	AATCCGGCCCGCCTATGGCT	GGCCGTTTTGTATGGAAACCAGACCT
K-12	AATCCGGCCCGCCTATGGCG	GGCCGTTTTGTATGGAAACCAGACCC
A2	CGCTCTGCGCCTTATTAATTACCGCCTCTTGCTCCACTTTGCTGCCC	
K12	CGCTCTGCGCCTTATTAATTACCGCCTCTTGCTCCACATTTGCTGCCC	

Escherichia coli K12 – sekvencia získaná z genetickej databázy GenBank (U 14003.1)

4.2 Analýza enterobaktérií s produkciou širokospektrálnych β -laktamáz v animálnej oblasti

4.2.1 Stanovenie prevalencie enterobaktérií produkujúcich širokospektrálne β -laktamázy ESBL a AmpC typu

Celkovo bolo vyšetrených 154 zmesových vzoriek slepých čriev brojlerov. Na základe pozitívneho rastu na chromID ESBL selektívnom médiu, výsledkov modifikovaného DDST a AmpC diskového testu, bol získaný 1 ESBL- a 2 AmpC-pozitívne izoláty *Escherichia coli*.

Ďalšími vzorkami boli kloakálne výtery moriek z troch rôznych fariem. Z celkového počtu 150 výterov bolo na základe fenotypového určenia stanovených celkovo 6 ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli*.

4.2.2 Genetická charakterizácia enterobaktérií produkujúcich širokospektrálne β -laktamázy

Cieľom analýzy bola charakterizácia ESBL- a AmpC-pozitívnych izolátov za účelom stanovenia prítomnosti *bla* génu, následného určenia konkrétneho typu β -laktamázy a sledovania klonálneho šírenia týchto izolátov vo vybranej oblasti.

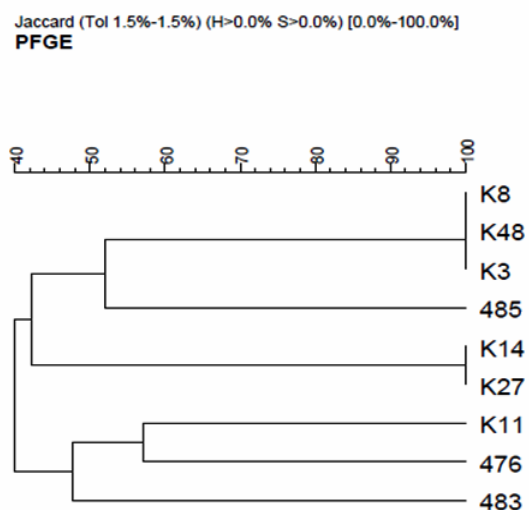
4.2.2.1 Genetická detekcia ESBL

Tabuľka 26 uvádza výsledky genetickej analýzy enterobaktérií produkujúcich širokospektrálne β -laktamázy získané pomocou PCR a priameho sekvenovania. U kmeňov z animálneho prostredia boli najrozšírenejšími typmi ESBL CTX-M-1 a SHV-12 β -laktamázy. CTX-M-14 enzým bol detegovaný iba u jedného izolátu. Na obrázku 4 vidieť dendrogram získaný z výsledkov PFGE izolátov z animálnej oblasti. U ESBL-pozitívnych izolátov bol zaznamenaný výskyt 4 kmeňov (vzorky K3, K8 a K48, izolované z tej istej farmy, predstavovali ten istý kmeň; rovnaká situácia bola aj u vzoriek K14 a K27).

Tabuľka 26: Stanovenie typu prítomnej β -laktamázy u ESBL- a AmpC-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* z animálnej oblasti

Číslo izolátu	Bakteriálny druh	Pôvod	Stanovený fenotyp	Typ prítomnej β -laktamázy
476	<i>Escherichia coli</i>	brojler	AmpC	CMY-2, TEM-1
483	<i>Escherichia coli</i>	brojler	AmpC	CMY-2, TEM-1
485	<i>Escherichia coli</i>	brojler	ESBL	CTX-M-14, TEM-1
K3	<i>Escherichia coli</i>	morka	ESBL	SHV-12
K8	<i>Escherichia coli</i>	morka	ESBL	SHV-12
K11	<i>Escherichia coli</i>	morka	ESBL	CTX-M-1
K14	<i>Escherichia coli</i>	morka	ESBL	CTX-M-1
K27	<i>Escherichia coli</i>	morka	ESBL	CTX-M-1
K48	<i>Escherichia coli</i>	morka	ESBL	SHV-12

Obrázok 4: Výsledný dendrogram ESBL- a AmpC-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* získaných z animálnej oblasti



Legenda: horizontálna os – podobnosť kmeňov v percentách
vertikálna os – čísla izolátov

4.2.2.2 Genetická detekcia AmpC β -laktamáz

Multiplex PCR metóda odhalila výskyt CIT typu β -laktamázy u dvoch vzoriek, následné priame sekvenovanie určilo CMY-2 enzým (Tab. 26). Ako vidieť na obrázku 4, AmpC-pozitívne izoláty (t. j. vzorky 476 a 483) predstavovali kmene s jedinečným restričným profilom.

4.3 Využitie metódy PCR a analýzy krivky topenia DNA pri genetickej charakterizácii ESBL-pozitívnych izolátov

4.3.1 Genetická charakterizácia *bla* génu pomocou multiplex PCR a analýzy krivky topenia u zbierkových kmeňov

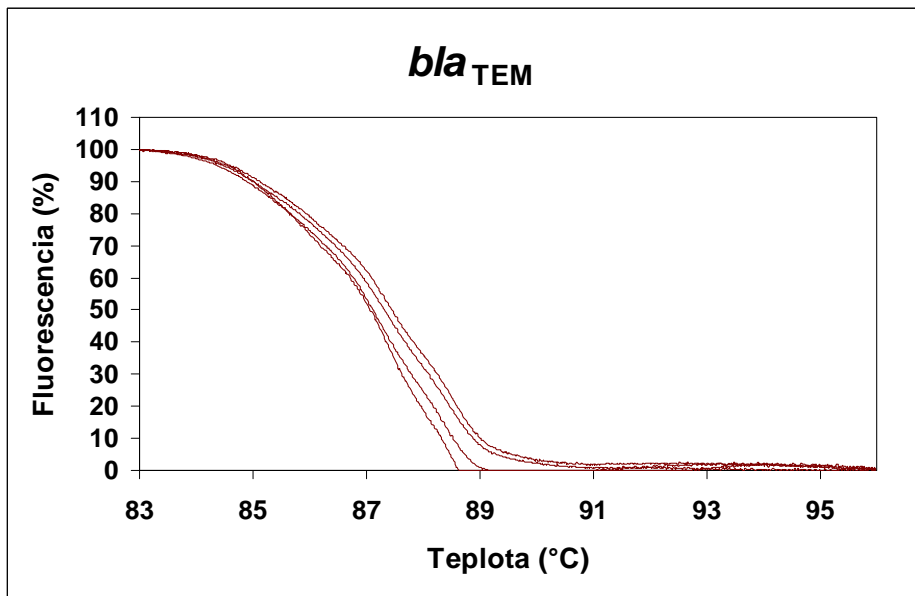
Prvým krokom pri testovaní využitia analýzy krivky topenia na detekciu *bla* génov v jednej reakcii bola optimalizácia metodiky na súbore kmeňov so známym zastúpením β -laktamáz. Každá vzorka bola izolovaná a analyzovaná dvakrát, a to presne podľa postupu uvedeného v kapitole Materiál a metódy. Po separácii PCR produktov v agarózovom gele a následnou vizualizáciou pod UV svetlom bolo možné podľa veľkosti DNA fragmentov identifikovať zastúpenie jednotlivých β -laktamáz (TEM – 857 bp, SHV – 475 bp, CTX-M – 593 bp). U všetkých kontrolných kmeňov došlo použitím multiplex PCR k amplifikácii požadovaného úseku génu/génov. I keď daný kmeň produkoval niekoľko enzýmov súčasne, neboli pozorované žiadne problémy s amplifikáciou, ani s následnou detekciou.

Na obrázkoch 5 až 12 je možné vidieť výsledky analýzy krivky topenia pre jednotlivé genotypy (jednotlivé *bla* gény) a ich kombinácie získané z dvoch pokusov. Existujú dva spôsoby, ktorými sa môžu krivky získané z HRM analýzy líšiť, a to teplotným posunom (posunom v teplote topenia, T_m) a v tvare výslednej krivky. Prvý rozlišovací znak (teplotný posun) je možné aplikovať na vzorky, ktoré obsahujú iba jednu β -laktamázu, a v tej sa vzájomne líšia (Obr. 5 – 8). Teplotný posun medzi jednotlivými krivkami bol pre jednotlivé genotypy (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} a *bla*_{SHV}) dobre viditeľný po normalizácii fluorescenčných dát (TEM ~88 °C, CTX-M-1 skupina ~91 °C, CTX-M-9 skupina ~92.5 °C, SHV ~94.5 °C). Pretože software HR-1 Melt Analysis nie je schopný určiť presnú teplotu topenia, údaje pre jednotlivé T_m boli získané z derivovaných kriviek a to tak, že na osy X, ktorá zodpovedá teplote boli odčítané približné hodnoty pík, ktoré predstavujú T_m . Vďaka variabilite v rámci *bla*_{CTX-M} génu bolo možné pomocou HRM rozlíšiť medzi CTX-M-1 a CTX-M-9 skupinou (Obr. 6 a 7).

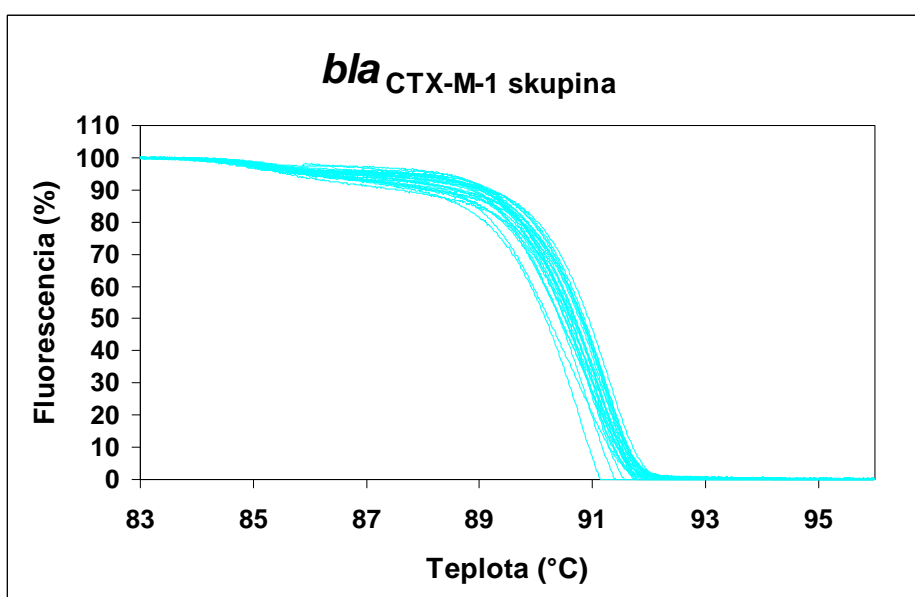
V prípade, že boli amplifikované dva *bla* gény súčasne, bolo možné pozorovať zmeny v tvare príslušnej krivky, a to v dôsledku toho, že vo vzorke sú prítomné dva amplikóny s rozličnou teplotou topenia. V teplotnej oblasti, kde sa topí amplikón s nižšou T_m , je možné pozorovať charakteristický pokles krivky topenia (Obr. 9 – 11). Prítomnosť

troch cieľových miest (troch *bla* génov) výrazným spôsobom zmenila tvar krivky topenia, a to v dôsledku amplifikácie troch úsekov DNA s rôznymi teplotami topenia (Obr. 12).

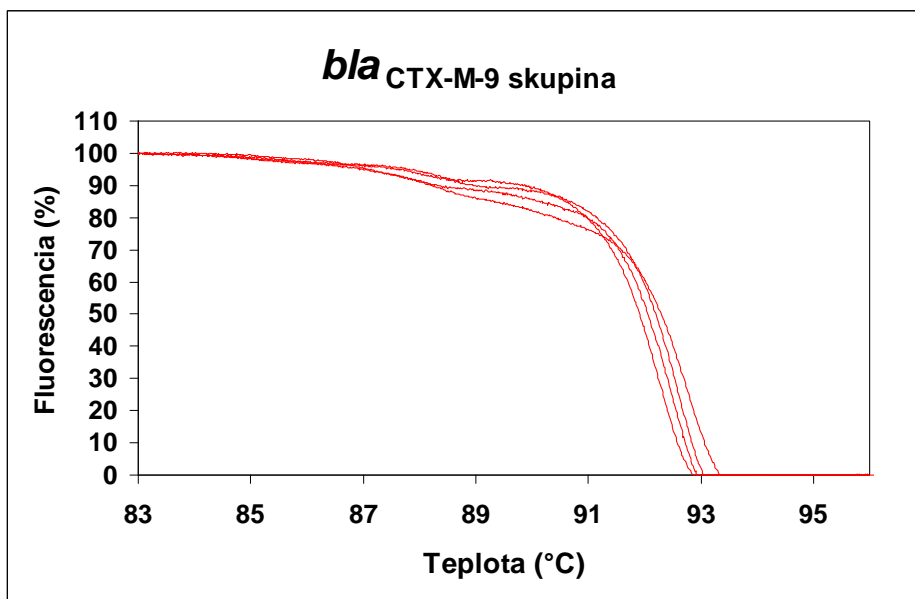
Obrázok 5: Výsledné krivky topenia získané z HRM analýzy pre kmene obsahujúce *bla*_{TEM}



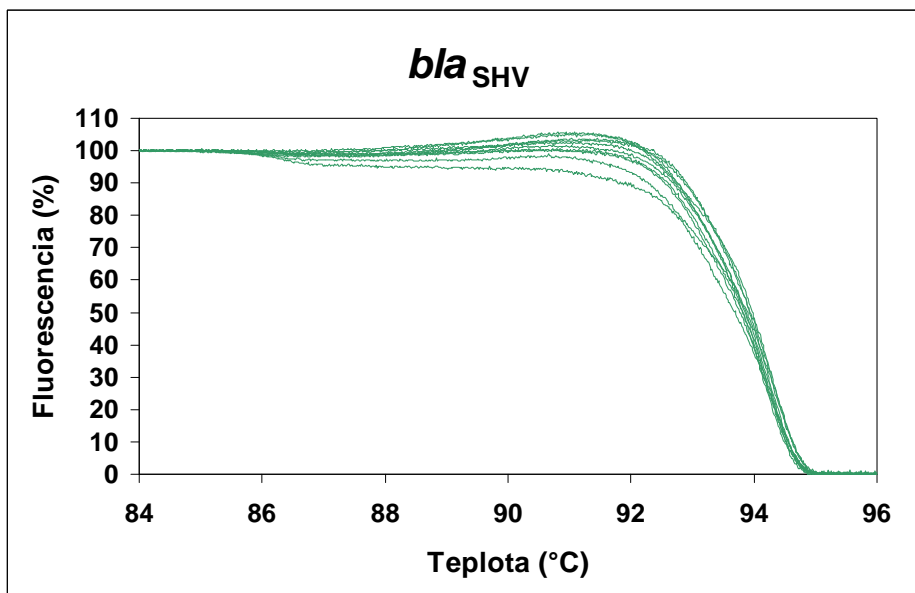
Obrázok 6: Výsledné krivky topenia získané z HRM analýzy pre kmene obsahujúce *bla*_{CTX-M-1} skupinu



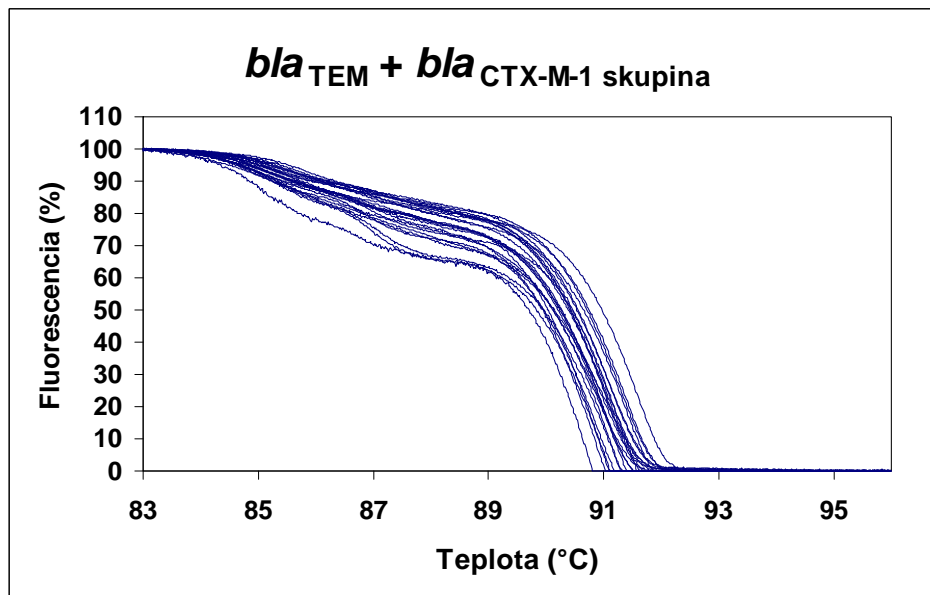
Obrázok 7: Výsledné krivky topenia získané z HRM analýzy pre kmene obsahujúce *bla*_{CTX-M-9} skupinu



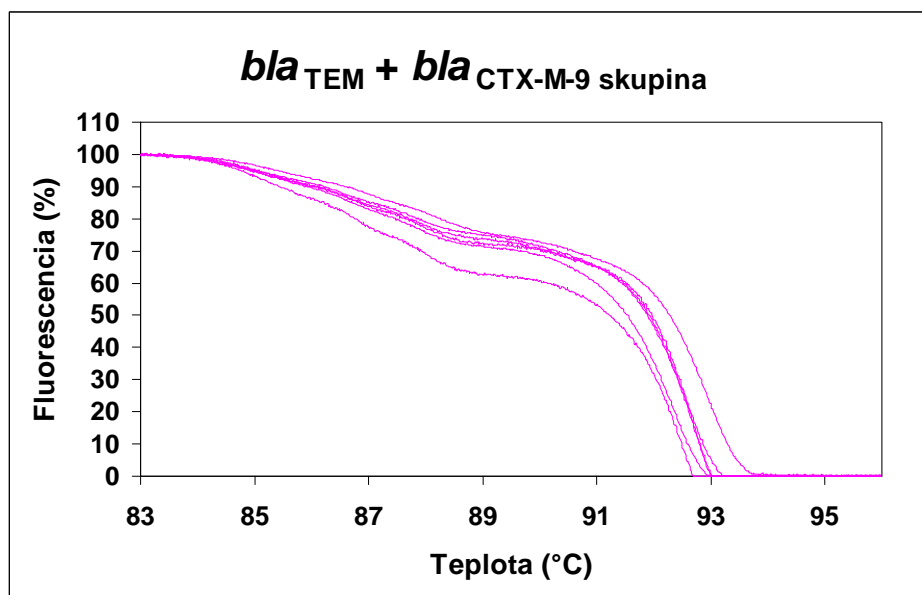
Obrázok 8: Výsledné krivky topenia získané z HRM analýzy pre kmene obsahujúce *bla*_{SHV}



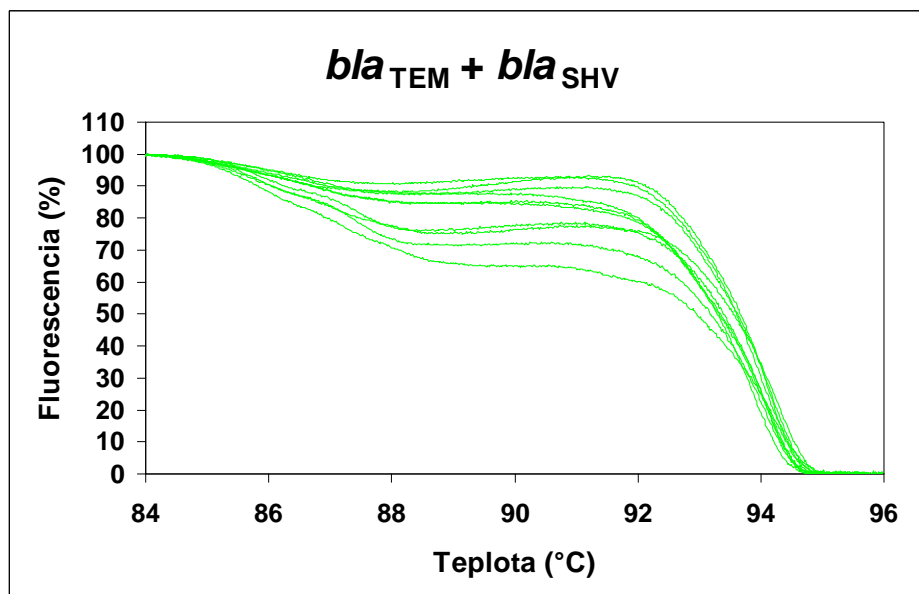
Obrázok 9: Výsledné krivky topenia získané z HRM analýzy pre kmene obsahujúce kombináciu bla_{TEM} a $bla_{CTX-M-1}$ skupinu



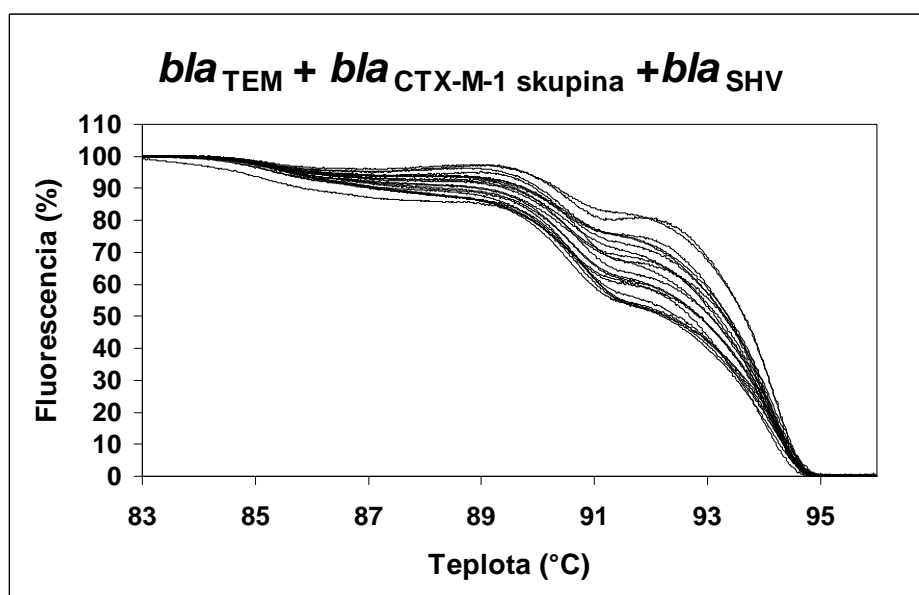
Obrázok 10: Výsledné krivky topenia získané z HRM analýzy pre kmene obsahujúce kombináciu bla_{TEM} a $bla_{CTX-M-9}$ skupinu



Obrázok 11: Výsledné krivky topenia získané z HRM analýzy pre kmene obsahujúce kombináciu bla_{TEM} a bla_{SHV}



Obrázok 12: Výsledné krivky topenia získané z HRM analýzy pre kmene obsahujúce kombináciu bla_{TEM} , bla_{SHV} a $bla_{CTX-M-1}$ skupinu

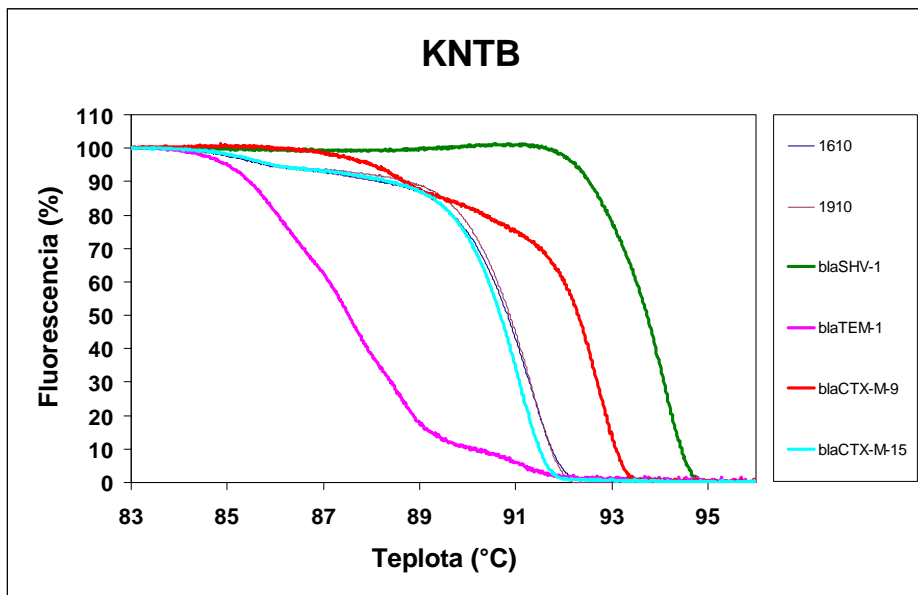


4.3.2 Genetická charakterizácia *bla* génu pomocou multiplex PCR a analýzy krivky topenia u klinických izolátov *Escherichia coli*

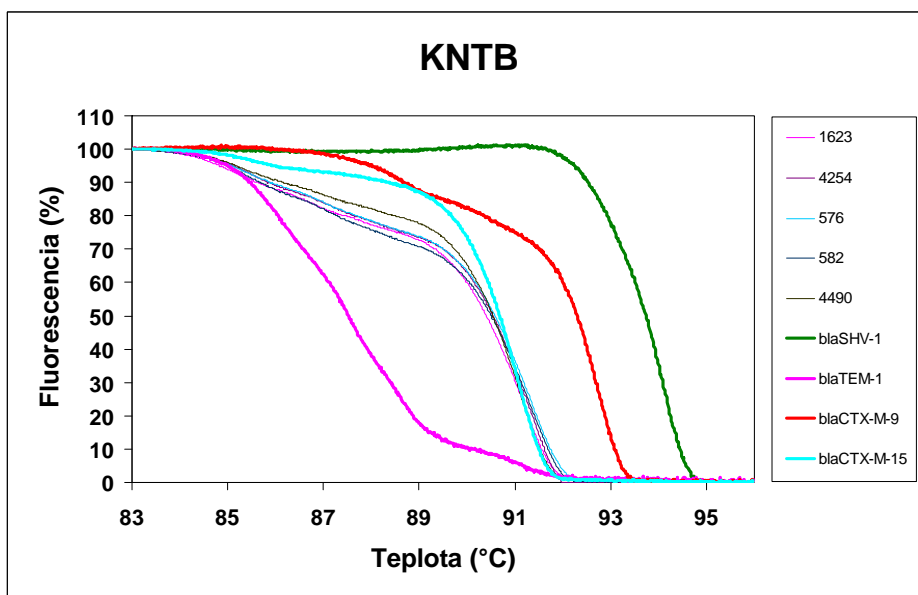
Za sledované obdobie bolo získaných celkovo 72 ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* od pacientov hospitalizovaných na jednotkách intenzívnej starostlivosti troch veľkých českých nemocníc, pričom na KNTB pripadalo 11, na FNO 29 a na FNOL 32 izolátov. Tieto boli podrobené detekcii prítomnosti *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M} génov pomocou multiplex PCR a analýzy krivky topenia. Získané krivky sa vzájomne odlišovali v závislosti od obsahu jednotlivých génov, avšak zodpovedali tým, ktoré boli získané zo zbierkových kmeňov. Normalizované krivky jednotlivých nemocníc sú rozdelené do obrázkov podľa produkcie β-laktamáz a ich kombinácií a porovnané s jednotlivými genotypmi (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M-1-skupina} a *bla*_{CTX-M-9-skupina}) zastúpenými pozitívnymi kontrolami reakcie. Výsledky HRM analýzy dokumentujú obrázky 13 až 25. Opakovaná analýza zodpovedala predchádzajúcim výsledkom (krivky nie sú uvedené). Na ukážku možného vizuálneho porovnania bola vybratá jedna vzorka a jej normalizovaná krivka topenia porovnaná s tými, ktoré boli získané pri HRM analýze kontrolných kmeňov (Obr. 26 – 33).

Konečné výsledky genetickej analýzy ESBL-pozitívnych izolátov od všetkých pacientov hospitalizovaných na jednotkách intenzívnych starostlivostí jednotlivých nemocníc pomocou multiplex PCR, analýzy krivky topenia s vysokým rozlíšením a priameho sekvenovania sú uvedené v tabuľkách 27, 28 a 29. Využitím nového detekčného systému došlo k amplifikácii *bla*_{CTX-M} génu takmer u všetkých izolátov, pričom prevažovalo zastúpenie enzýmov patriacich do CTX-M-1 skupiny. Priame sekvenovanie odhalilo prítomnosť CTX-M-15 typu patriaceho do tejto skupiny. CTX-M-9 skupina bola reprezentovaná CTX-M-27 a CTX-M-9 typmi. V mnohých prípadoch bol zaznamenaný výskyt TEM-1 β-laktamázy, často práve v kombinácii s CTX-M skupinou. Iba u jedného izolátu bol detegovaný TEM typ ESBL a to TEM-12, v ostatných prípadoch išlo o enzým s úzkym spektrom účinku, už spomínaný TEM-1. SHV enzýmy boli zastúpené SHV-1 a SHV-12 β-laktamázami a to u 3 vzoriek. U jedného izolátu pochádzajúceho z FNO nebola geneticky potvrdená produkcia ESBL. Pravdepodobne pôjde o iný mechanizmus rezistencie.

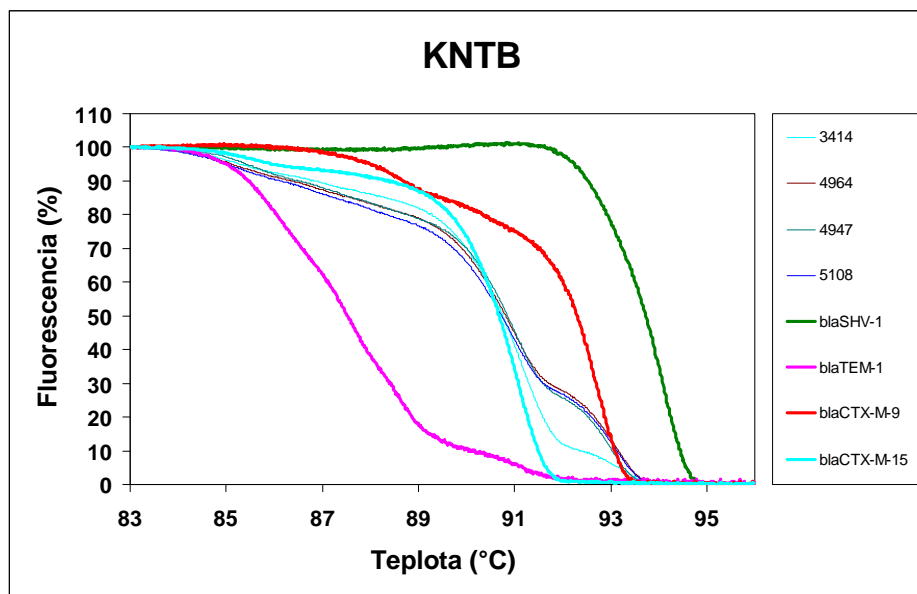
Obrázok 13: Výsledné krivky topenia pre izoláty z KNTB, u ktorých bola stanovená prítomnosť *bla*_{CTX-M-1} skupiny



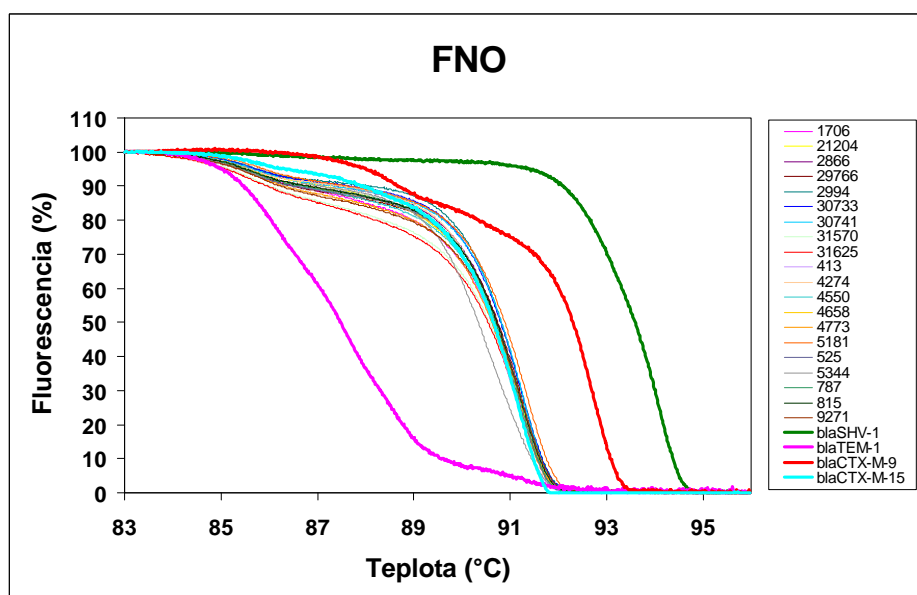
Obrázok 14: Výsledné krivky topenia pre izoláty z KNTB, u ktorých bola stanovená prítomnosť kombinácie *bla*_{TEM} a *bla*_{CTX-M-1} skupiny



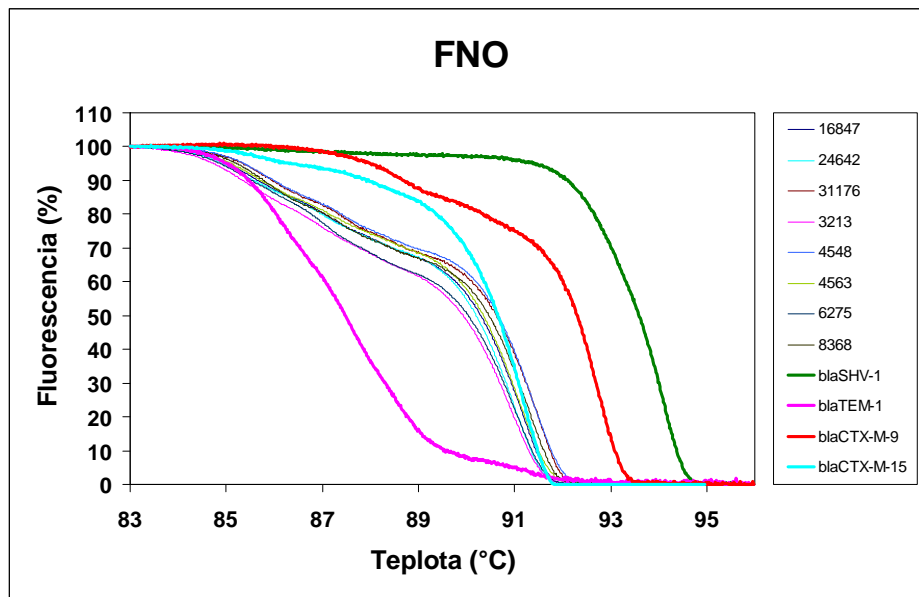
Obrázok 15: Výsledné krivky topenia pre izoláty z KNTB, u ktorých bola stanovená prítomnosť kombinácie *bla*_{TEM} a *bla*_{CTX-M-9} skupiny



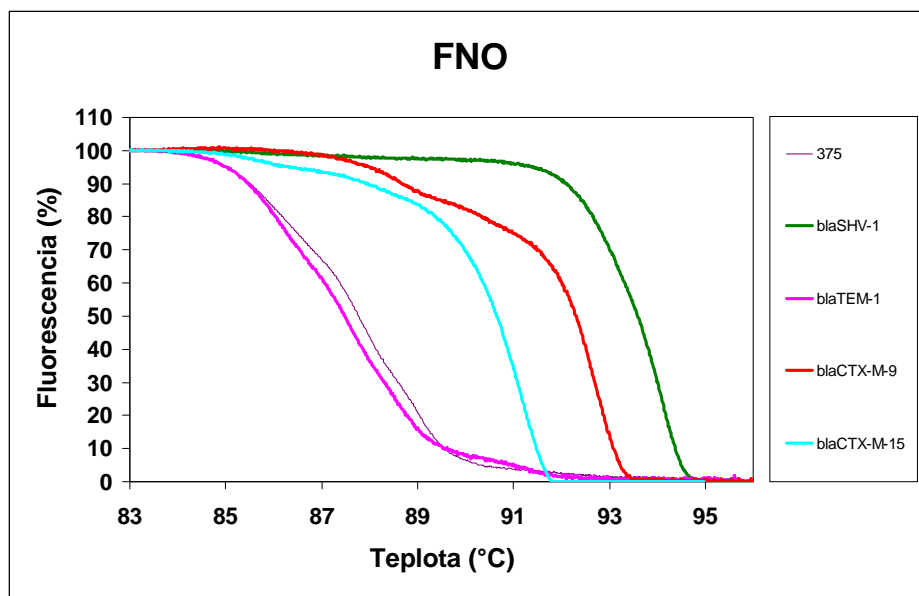
Obrázok 16: Výsledné krivky topenia pre izoláty z FNO, u ktorých bola stanovená prítomnosť *bla*_{CTX-M-1} skupiny



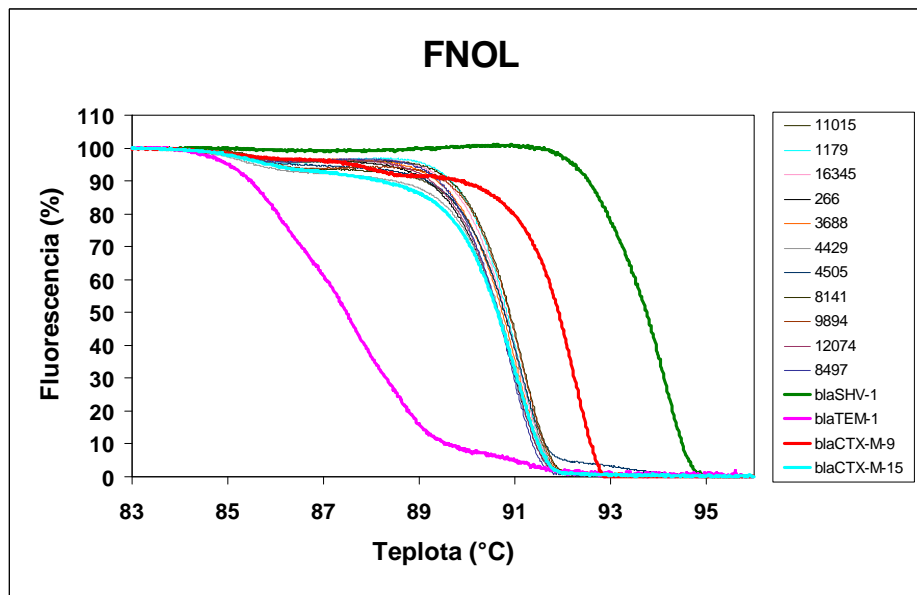
Obrázok 17: Výsledné krivky topenia pre izoláty z FNO, u ktorých bola stanovená prítomnosť kombinácie *bla*_{TEM} a *bla*_{CTX-M-1} skupiny



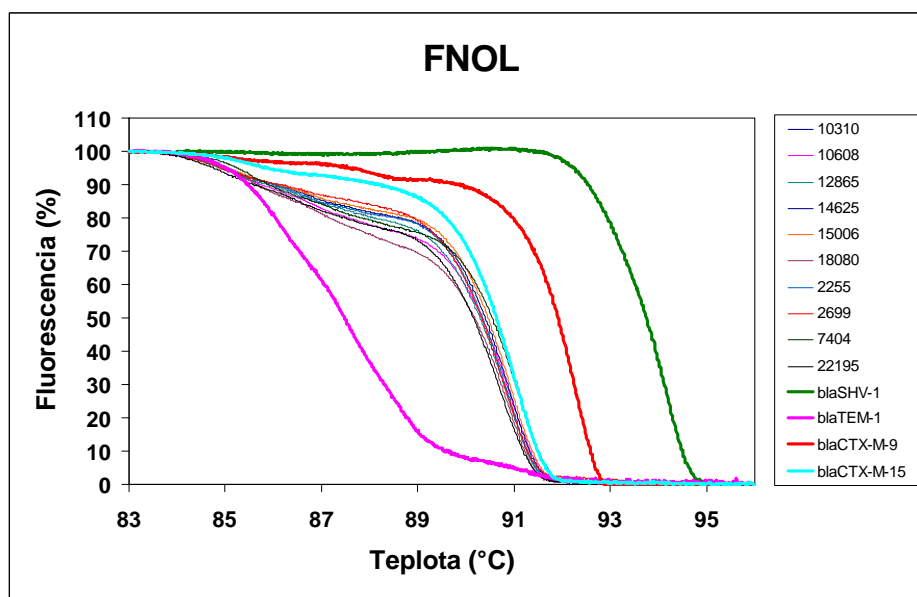
Obrázok 18: Výsledné krivky topenia pre izoláty z FNO, u ktorých bola stanovená prítomnosť *bla*_{TEM}



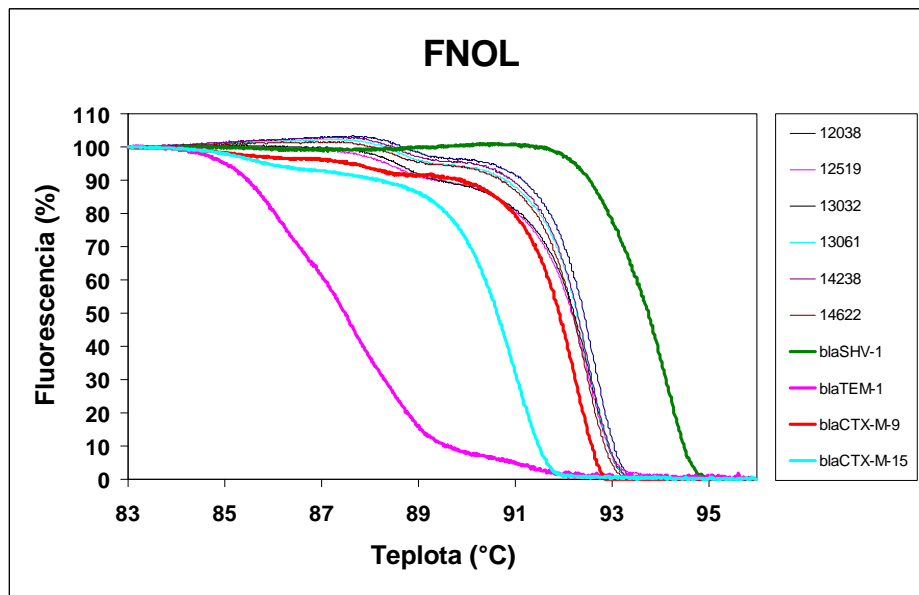
Obrázok 19: Výsledné krivky topenia pre izoláty z FNOL, u ktorých bola stanovená prítomnosť *bla*_{CTX-M-1} skupiny



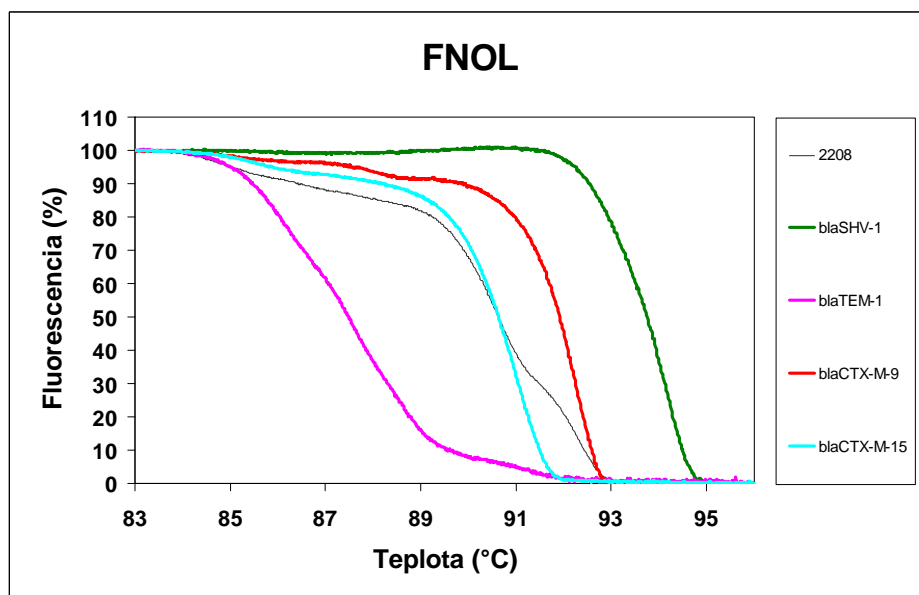
Obrázok 20: Výsledné krivky topenia pre izoláty z FNOL, u ktorých bola stanovená prítomnosť kombinácie *bla*_{TEM} a *bla*_{CTX-M-1} skupiny



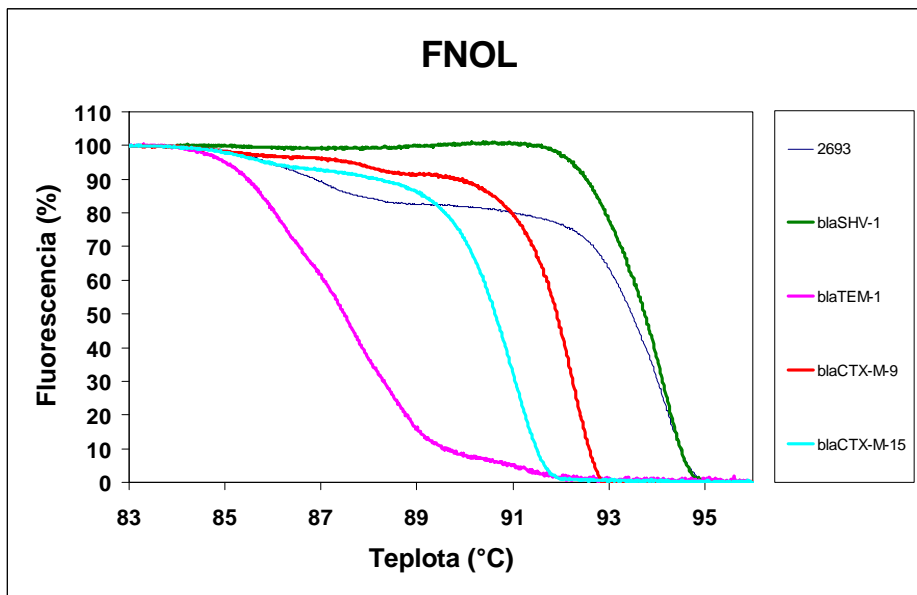
Obrázok 21: Výsledné krivky topenia pre izoláty z FNOL, u ktorých bola stanovená prítomnosť *bla*_{CTX-M-9} skupiny



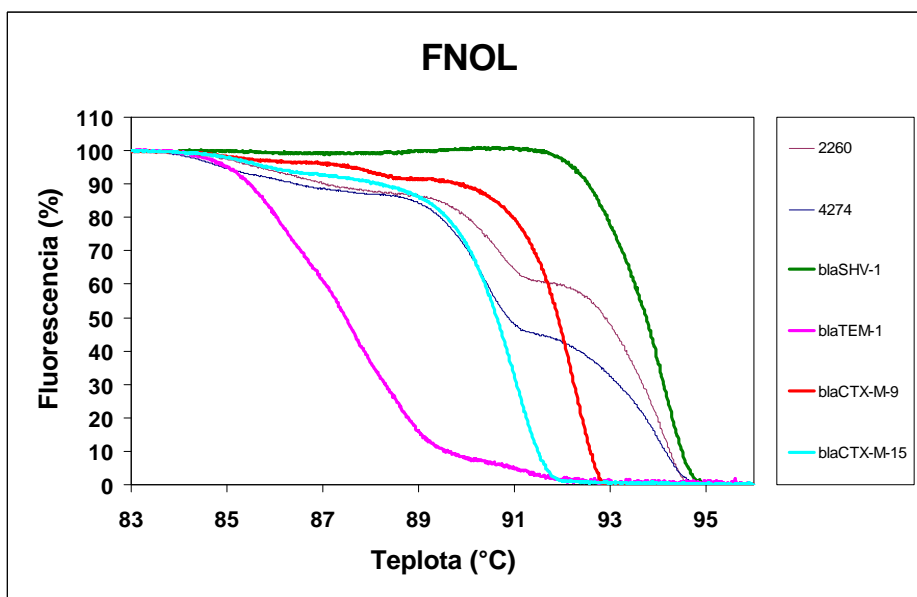
Obrázok 22: Výsledné krivky topenia pre izoláty z FNOL, u ktorých bola stanovená prítomnosť kombinácie *bla*_{TEM} a *bla*_{CTX-M-9} skupiny



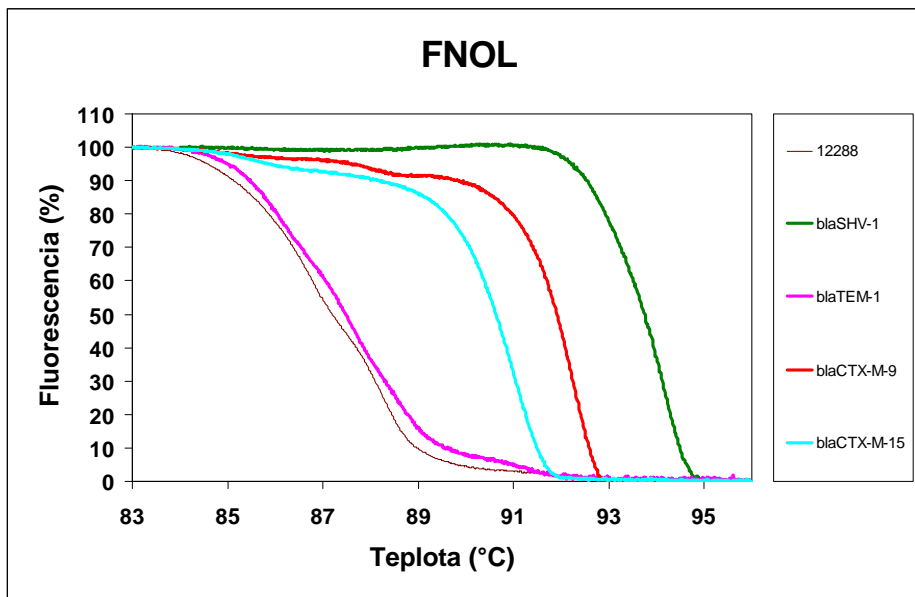
Obrázok 23: Výsledné krivky topenia pre izoláty z FNOL, u ktorých bola stanovená prítomnosť kombinácie *bla*_{TEM} a *bla*_{SHV}



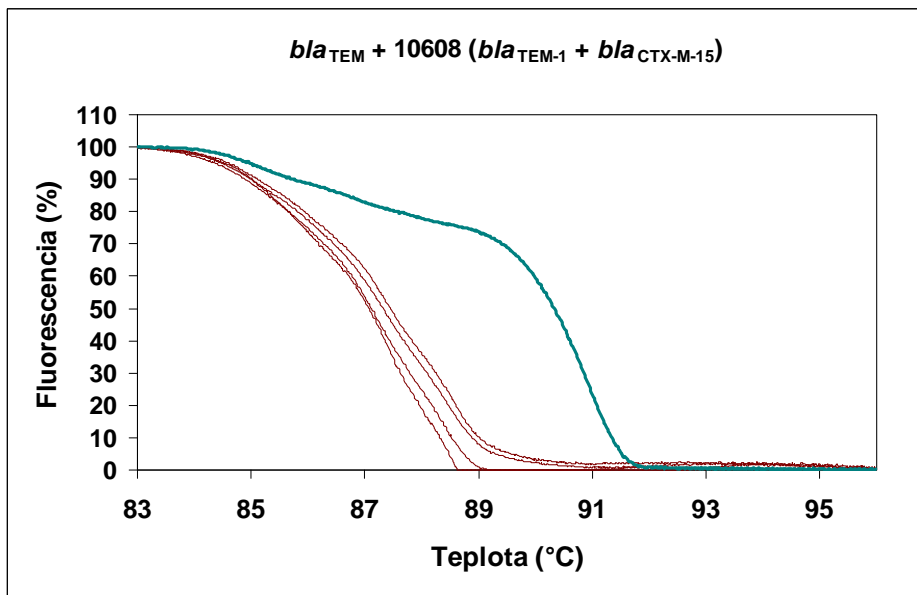
Obrázok 24: Výsledné krivky topenia pre izoláty z FNOL, u ktorých bola stanovená prítomnosť kombinácie *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M-1} skupiny



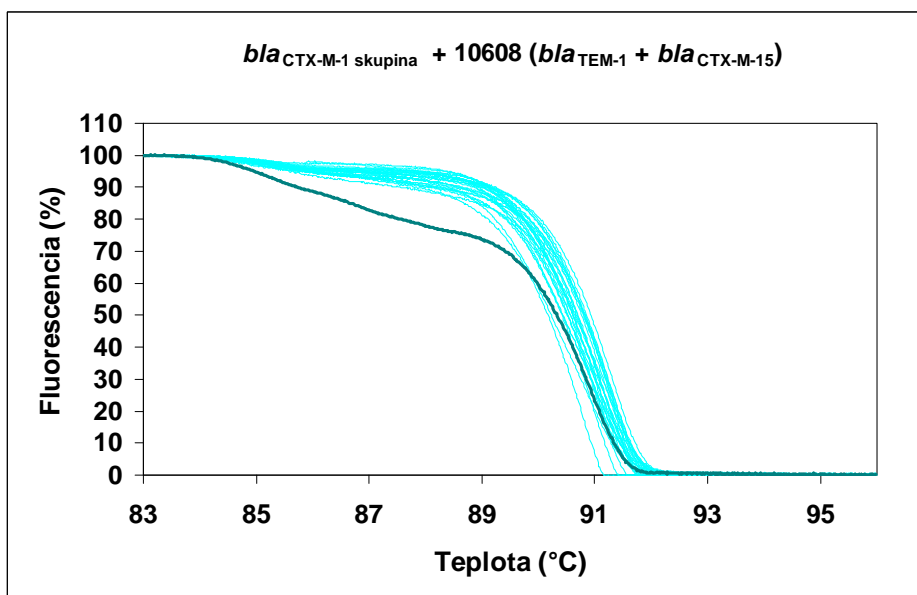
Obrázok 25: Výsledné krivky topenia pre izoláty z FNOL, u ktorých bola stanovená prítomnosť bla_{TEM}



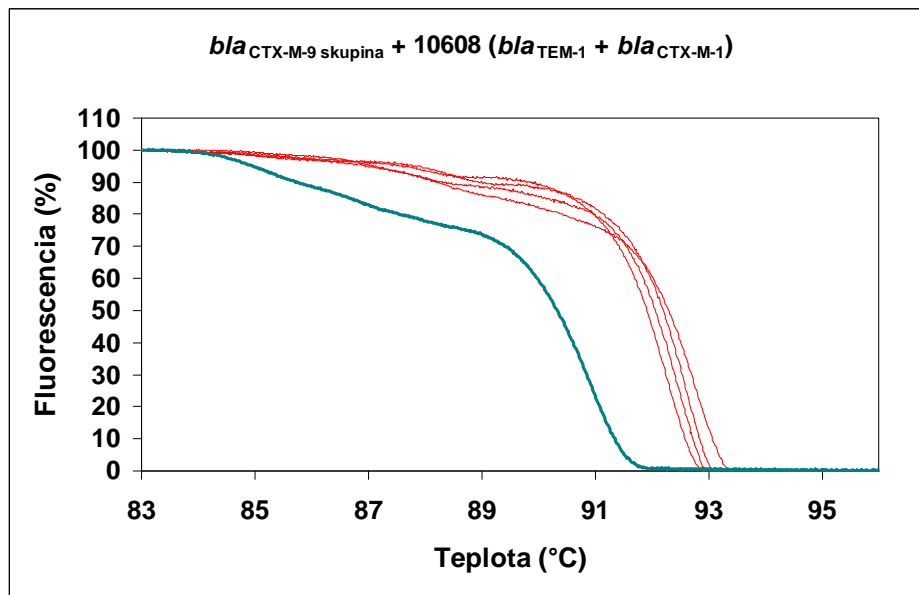
Obrázok 26: Porovnanie krivky topenia vzorky 10608 s kontrolnými kmeňmi obsahujúcimi bla_{TEM}



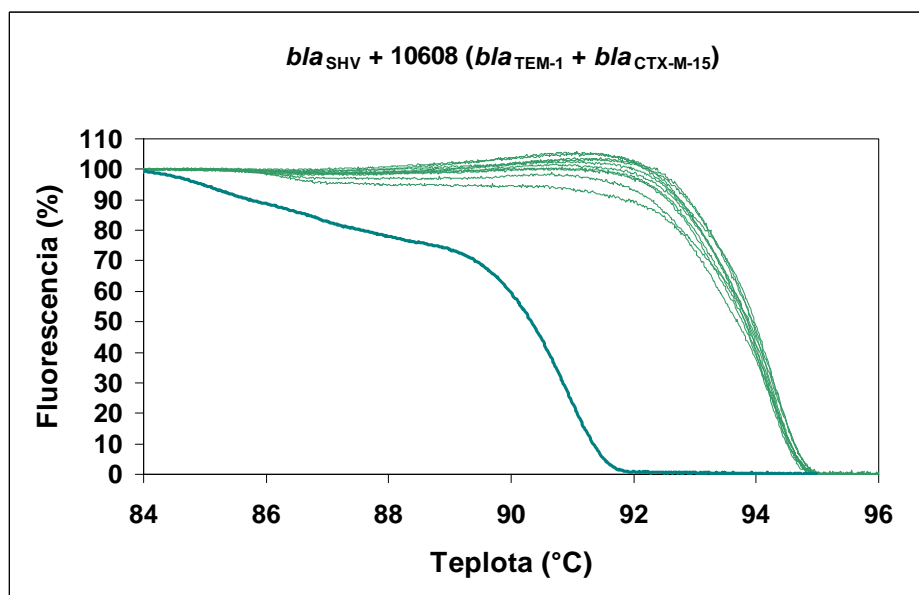
Obrázok 27: Porovnanie krivky topenia vzorky 10608 s kontrolnými kmeňmi obsahujúcimi $bla_{CTX-M-1}$ skupinu



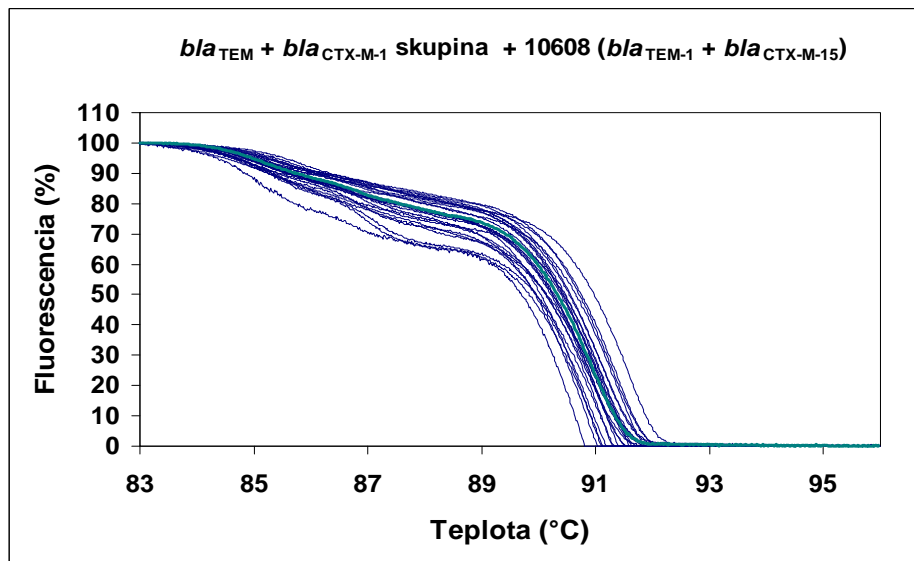
Obrázok 28: Porovnanie krivky topenia vzorky 10608 s kontrolnými kmeňmi obsahujúcimi $bla_{CTX-M-9}$ skupinu



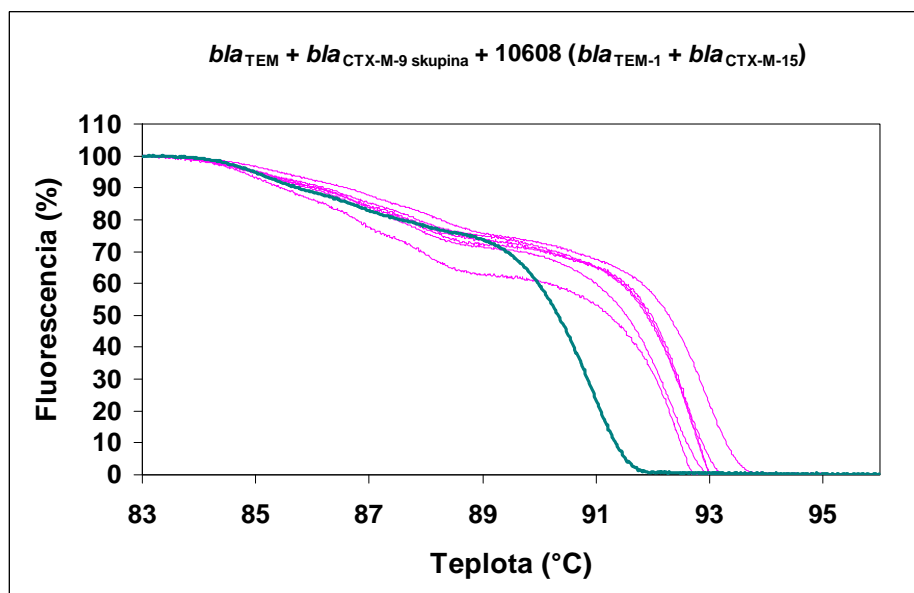
Obrázok 29: Porovnanie krivky topenia vzorky 10608 s kontrolnými kmeňmi obsahujúcimi bla_{SHV}



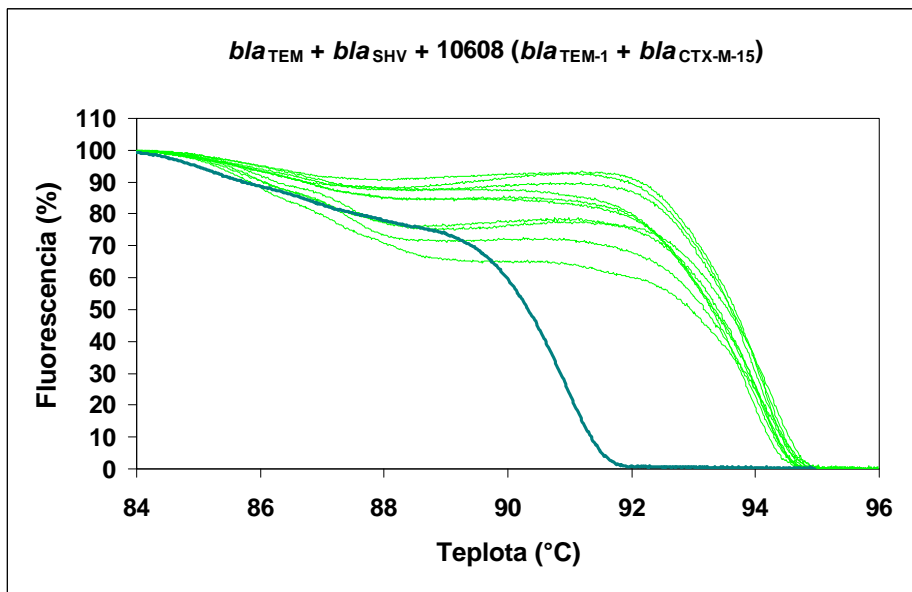
Obrázok 30: Porovnanie krivky topenia vzorky 10608 s kontrolnými kmeňmi obsahujúcimi kombináciu bla_{TEM} a $bla_{CTX-M-1}$ skupinu



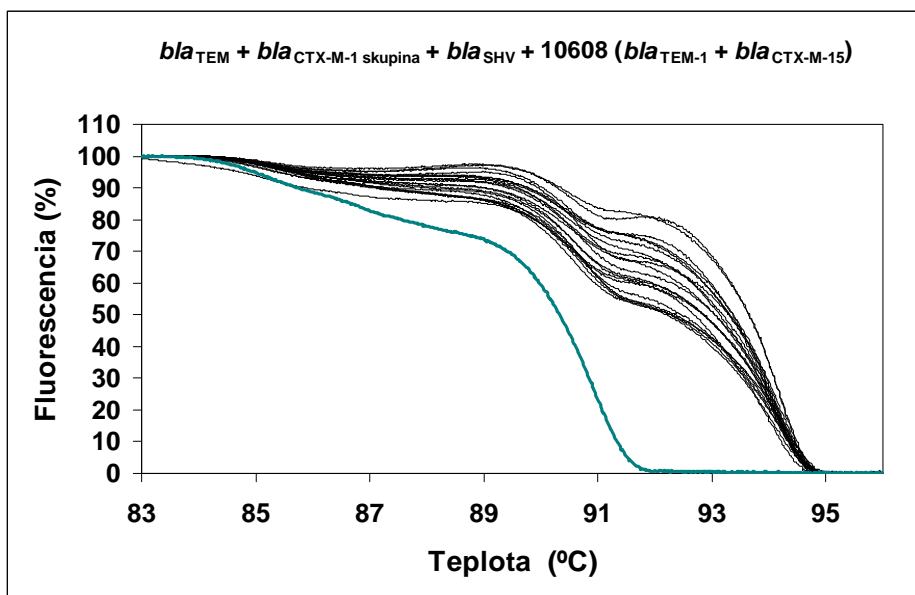
Obrázok 31: Porovnanie krivky topenia vzorky 10608 s kontrolnými kmeňmi obsahujúcimi kombináciu bla_{TEM} a $bla_{CTX-M-9}$ skupinu



Obrázok 32: Porovnanie krivky topenia vzorky 10608 s kontrolnými kmeňmi obsahujúcimi kombináciu bla_{TEM} a bla_{SHV}



Obrázok 33: Porovnanie krivky topenia vzorky 10608 s kontrolnými kmeňmi obsahujúcimi kombináciu bla_{TEM} , bla_{SHV} a $bla_{CTX-M-1}$ skupinu



Tabuľka 27: Výsledky analýzy krivky topenia a priameho sekvenovania u klinických izolátov z JIS v KNTB

Číslo izolátu	Nemocničné oddelenie	β -laktamázy určené z analýzy krivky topenia	β -laktamázy určené z priameho sekvenovania
576	Neonatologické oddelenie	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
1610	Anesteziologicko-resuscitačné oddelenie	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
1623	Interná klinika	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
582	Neonatologické oddelenie	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
4254	Oddelenie intenzívnej starostlivosti operačných oborov	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
4490	Oddelenie intenzívnej starostlivosti operačných oborov	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
3414	Oddelenie intenzívnej starostlivosti operačných oborov	TEM, CTX-M-9 skupina	TEM-1, CTX-M-27
1910	Detské oddelenie	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
4947	Oddelenie intenzívnej starostlivosti operačných oborov	TEM, CTX-M-9 skupina	TEM-1, CTX-M-27
4946	Oddelenie intenzívnej starostlivosti operačných oborov	TEM, CTX-M-9 skupina	TEM-1, CTX-M-27
5108	Oddelenie intenzívnej starostlivosti operačných oborov	TEM, CTX-M-9 skupina	TEM-1, CTX-M-27

Tabuľka 28: Výsledky analýzy krivky topenia a priameho sekvenovania u klinických izolátov z JIS vo FNO

Číslo izolátu	Nemocničné oddelenie	β -laktamázy určené z analýzy krivky topenia	β -laktamázy určené z priameho sekvenovania
413	Chirurgická klinika	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
815	Traumatologické centrum	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
375	Anesteziologicko-resuscitačná klinika	TEM	TEM-1
787	Urologické oddelenie	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
525	Interná klinika	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
4563	Klinika detského lekárstva	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1 CTX-M-15
6275	Urologické oddelenie	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
2994	Interná klinika	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
4550	Interná klinika	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
4658	Interná klinika	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
1706	Anesteziologicko-resuscitačná klinika	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
2866	Traumatologické centrum	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
16847	Neurochirurgická klinika	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
4274	Neurochirurgická klinika	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
4548	Klinika detského lekárstva	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
4773	Traumatologické centrum	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
8368	Klinika detského lekárstva	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
3213	Anesteziologicko-resuscitačná klinika	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
5181	Chirurgická klinika	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
24642	Interná klinika	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
9271	Interná klinika	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
5344	Neurochirurgická klinika	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
29766	Urologické oddelenie	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
30733	Interná klinika	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
30741	Urologické oddelenie	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
31176	Klinika detského lekárstva	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
21204	Interná klinika	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
31570	Interná klinika	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
31625	Traumatologické centrum	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15

Tabuľka 29: Výsledky analýzy krivky topenia a priameho sekvenovania u klinických izolátov z JIS vo FNOL

Číslo izolátu	Nemocničné oddelenie	β -laktamázy určené z analýzy krivky topenia	β -laktamázy určené z priameho sekvenovania
22195	Oddelenie intenzívnej starostlivosti chirurgických oborov	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
266	Klinika pľúcnych chorôb a tuberkulózy	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
1179	Interná klinika	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
2255	Detská klinika	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
2693	Detská klinika	TEM, SHV	TEM-1, SHV-12
2208	Oddelenie intenzívnej starostlivosti chirurgických oborov	TEM, CTX-M-9 skupina	TEM-1, CTX-M-9
2699	Oddelenie intenzívnej starostlivosti chirurgických oborov	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
3688	Oddelenie intenzívnej starostlivosti chirurgických oborov	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
4505	Oddelenie intenzívnej starostlivosti chirurgických oborov	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
4429	Oddelenie intenzívnej starostlivosti chirurgických oborov	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
7404	Interná klinika	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
8141	Oddelenie intenzívnej starostlivosti chirurgických oborov	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
9894	Neurologická klinika	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
8497	Interná klinika	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
10310	Pôrodnicko-gynekologická klinika-novorodenecke odd.	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
12038	Pôrodnicko-gynekologická klinika-novorodenecke odd.	CTX-M-9 skupina	CTX-M-9
12519	Pôrodnicko-gynekologická klinika-novorodenecke odd.	CTX-M-9 skupina	CTX-M-9
10608	Oddelenie intenzívnej starostlivosti chirurgických oborov	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
11015	Interná klinika	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
13032	Pôrodnicko-gynekologická klinika-novorodenecke odd.	CTX-M-9 skupina	CTX-M-9
13061	Pôrodnicko-gynekologická klinika-novorodenecke odd.	CTX-M-9 skupina	CTX-M-9
14238	Pôrodnicko-gynekologická klinika-novorodenecke odd.	CTX-M-9 skupina	CTX-M-9
12074	Interná klinika	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
12288	Interná klinika	TEM	TEM-12
14622	Pôrodnicko-gynekologická klinika-novorodenecke odd.	CTX-M-9 skupina	CTX-M-9
15006	Pôrodnicko-gynekologická klinika-novorodenecke odd.	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
18080	Interná klinika	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
14625	Detská klinika	TEM, CTX-M-1 skupina	TEM-1, CTX-M-15
2260	Klinika anesteziológie, resuscitácie a intenzívnej medicíny	TEM, CTX-M-1 skupina, SHV	TEM-1, CTX-M-15, SHV-1
4274	Klinika anesteziológie, resuscitácie a intenzívnej medicíny	TEM, CTX-M-1 skupina, SHV	TEM-1, CTX-M-15, SHV-1
12865	Klinika anesteziológie, resuscitácie a intenzívnej medicíny	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15
16345	Klinika anesteziológie, resuscitácie a intenzívnej medicíny	CTX-M-1 skupina	CTX-M-15

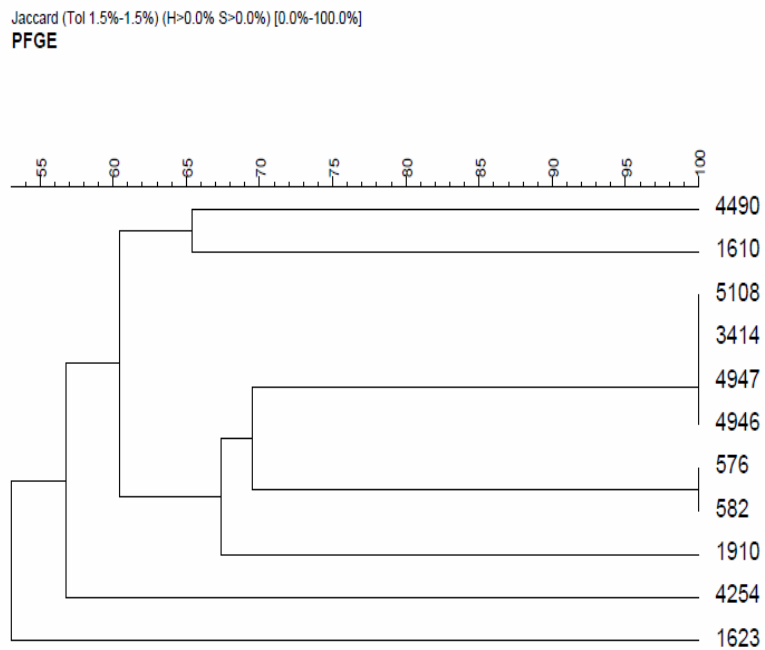
4.4 Epidemiologická analýza ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* a charakterizácia génov kódujúcich ich produkciu

Vzhľadom na veľký počet oddelení jednotiek intenzívnej starostlivosti z KNTB, FNO a FNOL, bola vykonaná epidemiologická charakterizácia získaných izolátov, za účelom sledovania eventuálneho klonálneho šírenia, či už na danom oddelení, alebo v rámci celej nemocnice.

4.4.1 Pulzná gélová elektroforéza klinických izolátov *Escherichia coli*

Heterogenitu skupiny izolátov z jednotlivých nemocníc je dobré vidieť na obrázkoch dendrogramov získaných z výsledkov PFGE metódy (Obr. 34, 35 a 36). Pomocou tejto techniky bolo na jednotkách intenzívnej starostlivosti v KNTB identifikovaných 7 kmeňov. Prvý kmeň (izoláty 576 a 582) produkujúci TEM-1 a CTX-M-15 β -laktamázu bol izolovaný od dvoch pacientov hospitalizovaných na neonatologickej JIS. Druhý (izoláty 3414, 4947, 4946 a 5108), produkujúci TEM-1 a CTX-M-27 β -laktamázu, bol získaný od štyroch rôznych pacientov z chirurgickej JIS. Zvyšných 5 kmeňov sa vyznačovalo jedinečným restričným profilom. Väčšina izolátov z FNO nebola geneticky príbuzná. Bolo však zaznamenané šírenie jedného kmeňa (izoláty 2994, 4550 a 4658) s produkciou CTX-M-15 medzi troma rôznymi pacientami na Oddelení internej medicíny a druhého (izoláty 4563 a 8368) produkujúceho TEM-1 a CTX-M-15 enzýmy medzi dvoma pacientmi na Klinike detského lekárstva. Vo FNOL bolo identifikovaných celkovo 30 rôznych kmeňov, pričom jeden z nich (izoláty 12519, 13061 a 14622) s produkciou CTX-M-9 β -laktamázy bol získaný od troch pacientov z Novorodeneckého oddelenia.

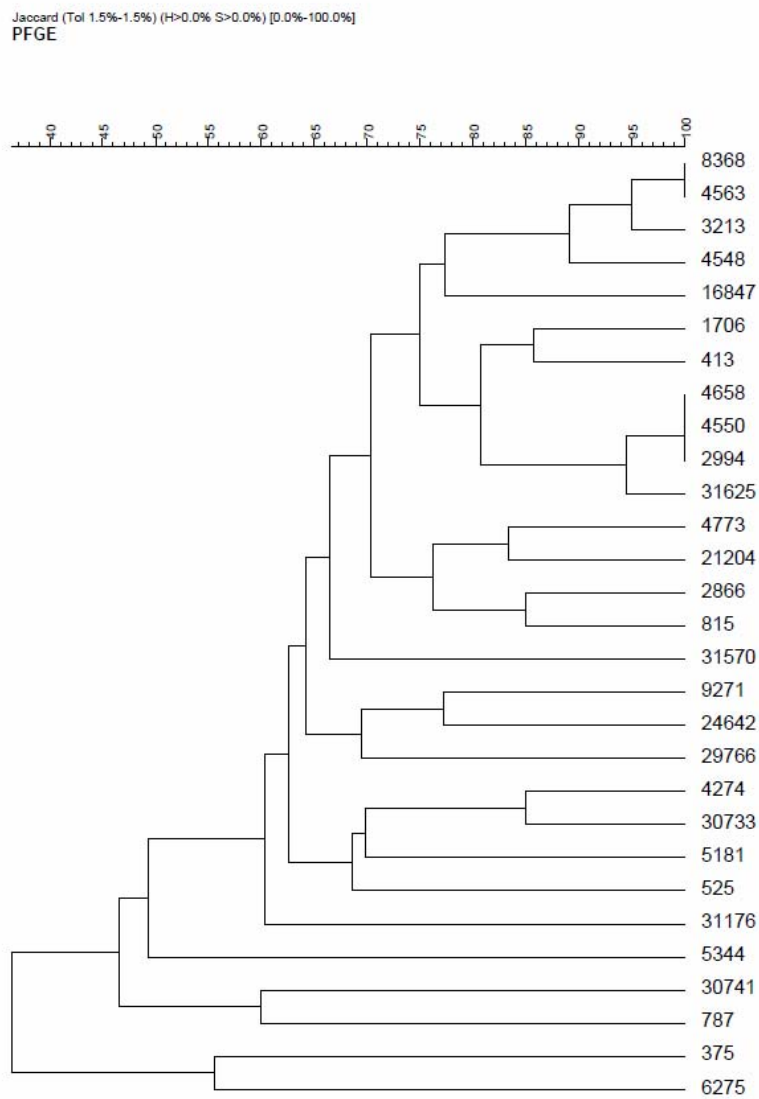
Obrázok 34: Výsledný dendrogram ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* z KNTB



Legenda: horizontálna os – podobnosť kmeňov v percentách

vertikálna os – čísla izolátov

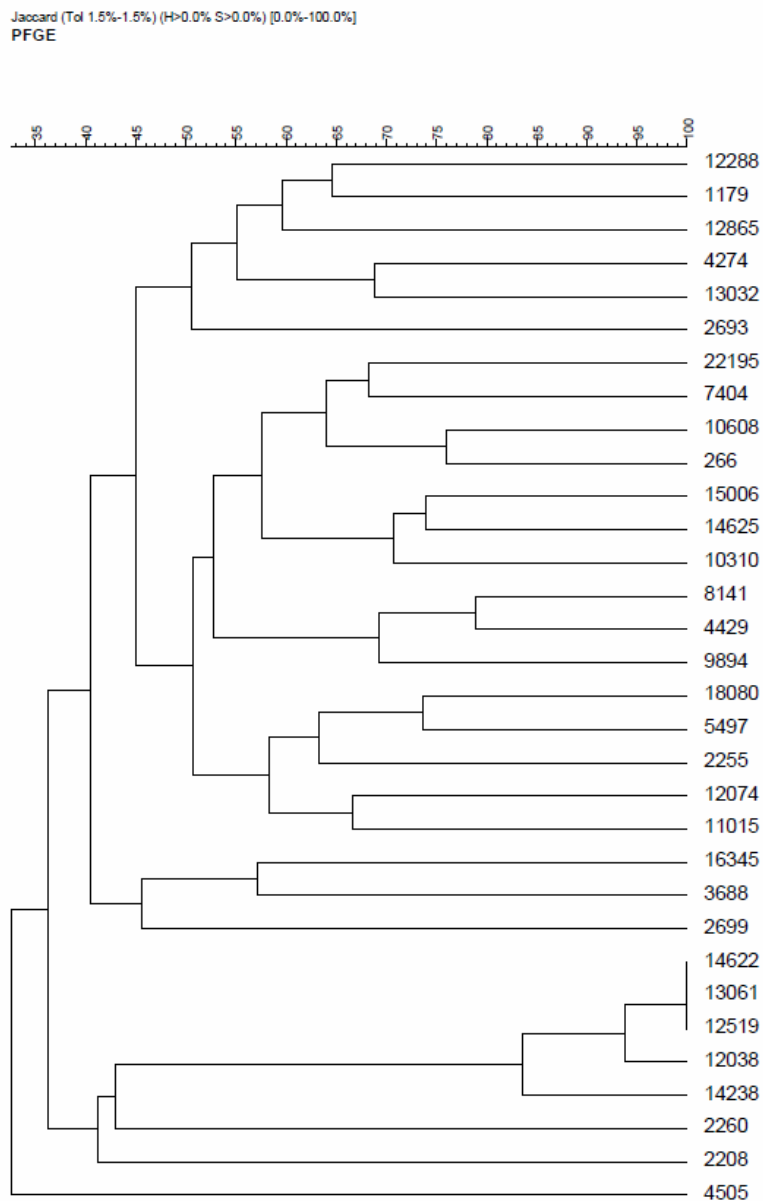
Obrázok 35: Výsledný dendrogram ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* z FNO



Legenda: horizontálna os – podobnosť kmeňov v percentách

vertikálna os – čísla izolátov

Obrázok 36: Výsledný dendrogram ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* z FNOL



Legenda: horizontálna os – podobnosť kmeňov v percentách

vertikálna os – čísla izolátov

4.4.2 Detekcia inzerčných sekvencií

Pomocou PCR sa sledoval výskyt inzerčných sekvencií *ISEcp1* a *IS26*, zodpovedných za mobilizáciu a expresiu *bla*_{CTX-M} v tzv. upstream pozícii od génu kódujúceho CTX-M β -laktamázu (Tab. 30 – 32). Aby sa overili výsledky PCR analýzy, vybrané amplikóny boli osekvenované a porovnané so známymi sekvenciami vo verejne dostupných databázach. Obrázok 37 uvádza príklad schematického znázornenia umiestnenia inzerčných sekvencií získaných pomocou PCR a priameho sekvenovania u kmeňa *Escherichia coli* 4490 produkujúceho CTX-M-15 β -laktamázu. Na obrázku vidieť zhodu medzi osekvenovaným úsekom DNA (4490) a známou sekvenciou pre *IS26* a *ISEcp1* (AM040707). Z porovnania je tak isto zrejmé, že inzerčné sekvencie sa nachádzajú ešte pred počiatkom *bla*_{CTX-M} génu a to v poradí *IS26* a *ISEcp1*.

Tabuľka 30: Detekcia inzerčných sekvencií *IS26* a *ISEcp1* u kmeňov *Escherichia coli* z KNTB

Číslo izolátu	CTX-M typ	IS26	ISEcp1
576	CTX-M-15	-	+
1610	CTX-M-15	+	-
1623	CTX-M-15	-	+
582	CTX-M-15	-	+
4254	CTX-M-15	-	+
4490	CTX-M-15	+	+
3414	CTX-M-27	+	+
1910	CTX-M-15	+	-
4947	CTX-M-27	+	+
4946	CTX-M-27	+	+
5108	CTX-M-27	+	+

Tabuľka 31: Detekcia inzerčných sekvencií IS26 a ISEcp1 u kmeňov *Escherichia coli* z FNO

Číslo izolátu	CTX-M typ	IS26	ISEcp1	Číslo izolátu	CTX-M typ	IS26	ISEcp1
413	CTX-M-15	+	-	4773	CTX-M-15	+	-
815	CTX-M-15	+	-	8368	CTX-M-15	-	+
375	CTX-M-15	+	-	3213	CTX-M-15	-	+
787	CTX-M-15	+	-	5181	CTX-M-15	+	-
525	CTX-M-15	+	-	24642	CTX-M-15	-	+
4563	CTX-M-15	-	+	9271	CTX-M-15	+	-
6275	CTX-M-15	-	+	5344	CTX-M-15	-	+
2994	CTX-M-15	+	-	29766	CTX-M-15	+	-
4550	CTX-M-15	+	-	30733	CTX-M-15	+	-
4658	CTX-M-15	+	-	30741	CTX-M-15	+	-
1706	CTX-M-15	+	-	31176	CTX-M-15	-	+
2866	CTX-M-15	+	-	21204	CTX-M-15	+	-
16847	CTX-M-15	-	+	31570	CTX-M-15	+	-
4274	CTX-M-15	+	-	31625	CTX-M-15	+	-
4548	CTX-M-15	-	+				

Tabuľka 32: Detekcia inzerčných sekvencií IS26 a *ISEcp1* u kmeňov *Escherichia coli* z FNOL

Číslo izolátu	CTX-M typ	IS26	ISEcp1	Číslo izolátu	CTX-M typ	IS26	ISEcp1
22195	CTX-M-15	-	+	12519	CTX-M-9	-	+
266	CTX-M-15	+	-	10608	CTX-M-15	+	-
1179	CTX-M-15	+	-	11015	CTX-M-15	-	+
2255	CTX-M-15	-	+	13032	CTX-M-9	-	-
2693	-	-	-	13061	CTX-M-9	-	-
2208	CTX-M-9	-	+	14238	CTX-M-9	-	+
2699	CTX-M-15	-	+	12074	CTX-M-15	+	-
3688	CTX-M-15	+	-	12288	-	-	-
4505	CTX-M-15	+	-	14622	CTX-M-9	-	+
4429	CTX-M-15	+	-	15006	CTX-M-15	-	+
7404	CTX-M-15	-	+	18080	CTX-M-15	-	+
8141	CTX-M-15	+	-	14625	CTX-M-15	+	-
9894	CTX-M-15	+	-	2260	CTX-M-15	-	+
8497	CTX-M-15	+	-	4274	CTX-M-15	-	+
10310	CTX-M-15	-	+	12865	CTX-M-15	-	+
12038	CTX-M-9	-	+	16345	CTX-M-15	-	+

Obrázok 37: Umiestnenie IS26 a *ISEcp1* u kmeňa *Escherichia coli* 4490 produkujúceho CTX-M-15 β -laktamázu v porovnaní so známou sekvenciou génu *bla*_{CTX-M-15} obsahujúceho tieto genetické elementy

IS26

```

4490          CAGCATCTCCTGCAGCTCACGGTAACTGATGCCGTATTTGCAGTACCAGCGTACGGCCCA
AM040707  42  CAGCATCTCCTGCAGCTCACGGTAACTGATGCCGTATTTGCAGTACCAGCGTACGGCCCA

4490          CAGAATGATGTCACGCTGAAAATGCCGGCCTTTGAATGGGTTTCATGTGCAGCTCCATCAG
AM040707  102 CAGAATGATGTCACGCTGAAAATGCCGGCCTTTGAATGGGTTTCATGTGCAGCTCCATCAG

4490          CAAAAGGGGATGATAAGTTTATCACCACCGACTATTTGCAACAGTGCC
AM040707  162 CAAAAGGGGATGATAAGTTTATCACCACCGACTATTTGCAACAGTGCC  209
    
```

ISEcp1 + CTX-M-15

```

4490          TGAG-AGCASTCT-AATTCTTCGTG-AATAGTGATTTTTGAAGCTAATAAAAAACACACG
AM04070 271  |||| | ||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
          TGAGAAGCAGTCTAAATTCCTTCGTGAAATAGTGATTTTTGAAGCTAATAAAAAACACACG

4490          TGGAAATTTAGGGACTATTCATGTTGTTGTTATTTTCGTATCTTCCAGAATAAGGAATCCCA
AM04070 331  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
          TGGAAATTTAGGGACTATTCATGTTGTTGTTATTTTCGTATCTTCCAGAATAAGGAATCCCA

4490          TGGTTAAAAAATCACTGCGCCAGTTCACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTTGT
AM04070 391  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
          TGGTTAAAAAATCACTGCGCCAGTTCACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTTGT

4490          TAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTGCCGAATTAG
AM04070 451  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
          TAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTGCCGAATTAG

4490          AGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAAA
AM04070 511  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
          AGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAAA

4490          TACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCGG
AM04070 571  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
          TACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCGG

4490          CCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCA
AM04070 631  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
          CCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCA

4490          AAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACGATGT
AM04070 691  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
          AAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACGATGT

4490          CACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAGC
AM04070 751  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
          CACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAGC

4490          TGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCACAGCTGGGAGACG
AM04070 811  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
          TGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCACAGCTGGGAGACG

4490          AAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCGC
AM04070 871  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
          AAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCGC

4490          GTGATAACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAG
AM04070 931  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
          GTGATAACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAG

4490          CATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTG
AM04070 991  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
          CATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTG

4490          CAGCGAGCATTACAGGCTGGACTGCCTGCTTCTGGGTTGTGGGGGATAAA-CCGGCATSC
AM04070 1051 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
          CAGCGAGCATTACAGGCTGGACTGCCTGCTTCTGGGTTGTGGGGGATAAAACCGGCAG-C

```

```

4490          GGTGGCTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTG
          |||
AM04070  1110 GGTGGCTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTG

```

AM040707– sekvencia získaná z genetickej databázy *Genbank*

1...209 /mobilný genetický element = IS26/

210...341 /mobilný genetický element = *ISEcp1*/

390...1256 /*bla*_{CTX-M-15}/

4.4.3 Izolácia plazmidov u vybraných kmeňov z JIS

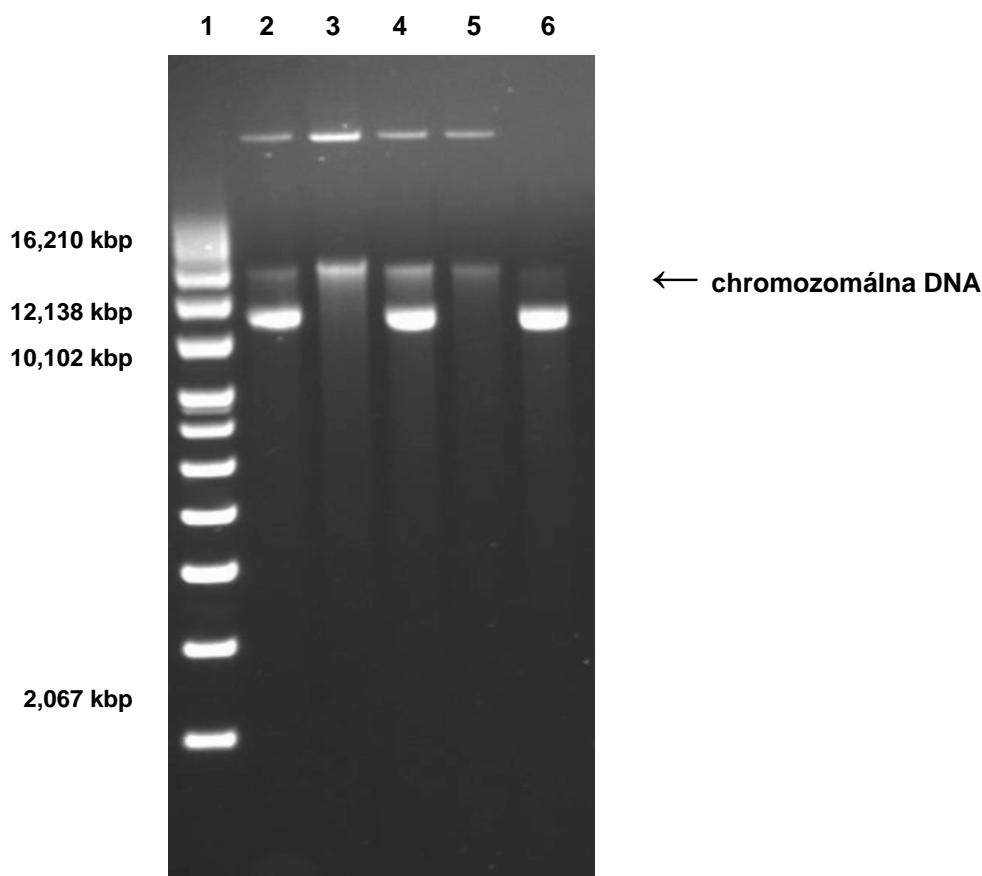
U všetkých klinických izolátov bol pozorovaný výskyt minimálne jedného plazmidu. Porovnaním s fragmentmi markeru DNA ladder supercoiled, bola stanovená orientačná veľkosť v rozmedzí 2,067 a 16,210 kbp, u mnohých izolátov boli pozorované plazmidy s veľkosťou >16,210 kbp, poprípade < 2,067 kbp.

4.4.4 Konjugačné experimenty a charakterizácia vybraných plazmidov

Z celkového počtu 6 vybraných CTX-M-positívnych kmeňov *Escherichia coli* od pacientov z FNOL, boli konjugačné experimenty úspešné v dvoch prípadoch (kmene číslo 12038 a 12519), t. j. na selektívnych pôdach s obsahom cefotaximu a kanamycínu boli pozorované samostatne vyrastené kolónie. Z týchto bola následne vyizolovaná plazmidová DNA za účelom detekcie prítomnosti plazmidu pochádzajúceho jednak z donorovej a jednak z akceptorovej bunky a tým overená úspešnosť konjugácie (Obr. 38). Z obrázku vidieť, že v oboch prípadoch skutočne došlo k prenosu veľkého plazmidu z donorovej bunky (rezistentnej voči cefotaximu) do akceptorovej (citlivej ku cefotaximu), pričom práve *bla*_{CTX-M} gén nachádzajúci sa na prenášanom plazmide umožnil akceptorovej bunke prežiť inhibičnú koncentráciu cefotaximu v selekčných pôdach. Aby sa overilo, že sa spomínaný gén skutočne nachádza v akceptorovej bunke, bola vykonaná PCR reakcia s využitím špecifických primerov zachycujúcich oblasť *bla*_{CTX-M} génu. Zatiaľ čo u akceptorovej bunky (*Escherichia coli* DH5α Kan^R) nebola detegovaná prítomnosť tohto génu, u oboch konjugátov došlo k jeho amplifikácii (produkt veľkosti 593 bp)(Obr. 39).

Súčasne bola u pôvodných donorových kmeňov, t. j. vzoriek *Escherichia coli* 12038, 12519, ich konjugátov a akceptorového kmeňa uskutočnená typizácia plazmidov spočívajúca v zaradení do tzv. inkompatibilných skupín metódou PCR založenou na amplifikácii replikónov. Pomocou tejto metódy sa dokázalo, že u klinických kmeňov a ich konjugátov, plazmidy nesúce *bla*_{CTX-M} gén, patria do inkompatibilnej skupiny F, charakteristickej často prítomnosťou viacerých replikónov súčasne, ako v tomto prípade (konkrétne šlo o detekciu FII a FIB replikónu) (Tab. 33).

Obrázok 38: Výsledný plazmidový profil u jednotlivých konjugátov, donora a akceptora determinantov rezistencie



Legenda: 1 – DNA ladder, supercoiled (2,067 kbp – 16,210 kbp)

2 – konjugát 12038

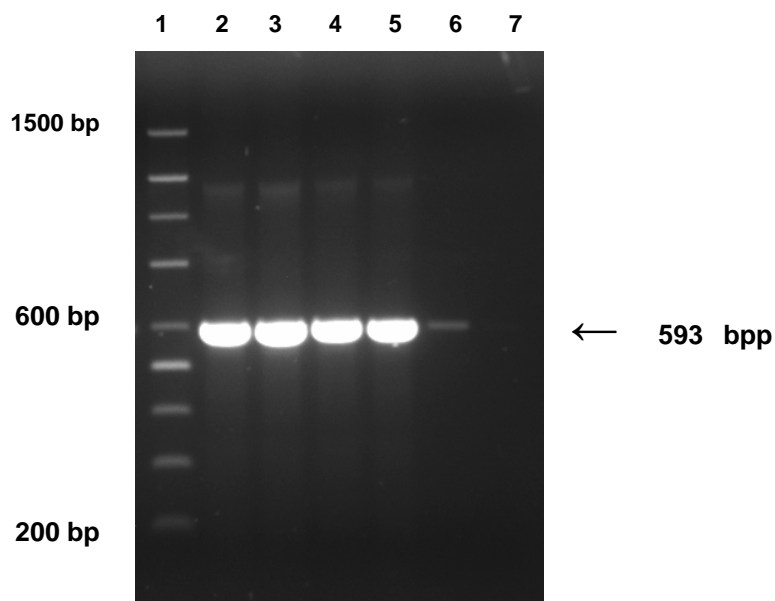
3 – *Escherichia coli* 12038

4 – konjugát 12519

5 – *Escherichia coli* 12519

6 – *Escherichia coli* DH5 α (Kan^R)

Obrázok 39: Výsledok PCR detekcie *bla*_{CTX-M} génu u jednotlivých konjugátov, donora a akceptora determinantov rezistencie



Legenda: 1 – DNA ladder (200 – 1500 bp)
 2 – konjugát 12038
 3 – *Escherichia coli* 12038
 4 – konjugát 12519
 5 – *Escherichia coli* 12519
 6 – *Escherichia coli* DH5 α (Kan^R)
 7 – negatívna kontrola

Tabuľka 33: Výsledky typizácie vybraných plazmidov pomocou PCR založenej na amplifikácii prítomných replikónov

Číslo izolátu	Bakteriálny druh	CTX-M β -laktamáza	Počet plazmidov	Identifikovaný replikón
12038	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-9	1	FII, FB
Konjugát 12038	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-9	1	K, FII, FB
12519	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-9	2	FII, FB
Konjugát 12519	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-9	2	K, FII, FB
DH5 α (Kan ^R)	<i>Escherichia coli</i>	-	1	K

5 DISKUSIA

5.1 Analýza enterobaktérií s produkciou širokospektrálnych β -laktamáz v humánnej populácii

Objavenie prvého antibiotika, penicilínu, prinieslo svetu klamlivú predstavu, že problém bakteriálnych infekcií bude nadobro vyriešený. Už v roku 1947 však boli zachytené prvé kmene, odolávajúce účinku tejto antimikrobiálnej látky^{2,3}. To viedlo ľudstvo k pátraniu po nových prípravkoch, ktoré by boli účinné v boji proti bakteriálnym pôvodcom závažných ochorení.

Avšak ani to neostalo bez odozvy a mikrobiálny svet si postupne vyvíjal ďalšie mechanizmy, ktoré by ho pred účinkom nových antibiotík ochránili. Ide predovšetkým o modifikáciu cieľovej štruktúry, zhoršený prienik antibiotika daný zmenou permeability bunkovej steny, aktívne vylučovanie antibiotika z bakteriálnej bunky a produkcia enzýmov rozkladajúcich alebo modifikujúcich molekulu antibiotika.

5.1.1 Prevalencia a charakterizácia β -laktamáz typu ESBL

Produkcia bakteriálnych β -laktamáz predstavuje najvýznamnejší mechanizmus rezistencie gramnegatívnych baktérií voči β -laktamovým antibiotikám. V roku 1983 bola v Nemecku objavená prvá β -laktamáza SHV-2, schopná hydrolyzovať cefotaxim a ceftazidim, tzv. širokospektrálne cefalosporíny. Od SHV-1, enzýmu s úzkym spektrom účinku, sa líšila iba jednou aminokyselinovou zámenou v pozícii 238⁶². Gén kódujúci produkciu tohto širokospektrálneho enzýmu bolo možné preniesť konjugačnými experimentami z bunky rezistentnej do bunky citlivej na tieto antimikrobiálne látky.

Od spomínaného roku sa vedecká verejnosť začala zaoberať novým problémom, tzv. ESBL fenoménom. Počet identifikovaných a popísaných β -laktamáz typu ESBL od ich objavenia až dodnes enormne vzrástol. Prvými boli TEM a SHV typy, ktoré sú v súčasnosti zastúpené vyše 160 a 100 variantmi²³. Od roku 1989 k nim pribudla nová skupina, CTX-M β -laktamázy, ktorých názov bol odvodený od schopnosti prednostne štiepiť cefotaxim než ceftazidim²⁴. OXA skupina širokospektrálnych β -laktamáz sa vyskytuje hlavne u izolátov *Pseudomonas aeruginosa*²⁸.

Výskyt ESBL-pozitívnych baktérií sa vo svete líši v závislosti od jednotlivých krajín a nemocničných zariadení. Najohrozenejšou skupinou, čo sa týka možnosti infekcie alebo kolonizácie týmito rezistentnými baktériami, sú predovšetkým pacienti na jednotkách intenzívnej starostlivosti. Ďalšími rizikovými pracoviskami môžu byť chirurgické, neonatologické, či hematologické oddelenia. Dôležitú úlohu vo všetkých prípadoch zohrávajú faktory ako dlhodobý pobyt v nemocnici, najmä na jednotkách intenzívnych starostlivostí, prítomnosť centrálnych venózných a močových katetrov, prebiehajúca hemodialýza, nízka pôrodná hmotnosť a prechádzajúca expozícia rôznymi antibiotikami (aminoglykozidmi, chinolónmi, cefalosporínmi III. generácie atď.)²¹.

Počiatočná štúdia v rámci dizertačnej práce bola venovaná genetickej analýze ESBL-pozitívnych izolátov *Klebsiella pneumoniae* od pacientov v intenzívnej starostlivosti. Z výsledkov vyplýva, že prevalencia sledovaného species dosiahla na Klinike anesteziológie a resuscitácie FNOL hodnotu 19 %. Multicentrická štúdia, vykonaná v rokoch 1997 – 1998 na 24 jednotkách intenzívnej starostlivosti v Európe, preukázala 25% výskyt ESBL-pozitívnych kmeňov *Klebsiella pneumoniae*⁸³. Ďalšia veľká štúdia (1999), realizovaná na viac ako 100 európskych jednotkách intenzívnej starostlivosti, dokumentovala veľké geografické rozdiely vo výskyte produkcie ESBL u kmeňov *Klebsiella pneumoniae*, od 3 % vo Švédsku po 34 % v Portugalsku⁸⁴. V štúdií Koláře et al. z roku 2005 bola zaznamenaná 39% priemerná prevalencia ESBL-pozitívnych kmeňov toho istého species na jednotkách intenzívnej starostlivosti v 16 zdravotníckych zariadeniach Českej republiky⁸⁵.

Paterson et al. vo svojej multicentrickej štúdii, zahrňujúcej 12 nemocníc v siedmich krajinách sveta uvádza, že dominujúcimi širokospektrálnymi β -laktamázami v prípade *Klebsiella pneumoniae* sú SHV typy, ktoré boli dokázané u 67 % izolátov s fenotypovým dôkazom produkcie ESBL. V tejto štúdii tvorili TEM typy iba 16 %⁸⁶. Steward et al. vo svojej charakterizácii izolátov rovnakého species, pochádzajúcich z 19 laboratórií v USA, dokázal prítomnosť génov *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} alebo obidvoch u 138 zo 139 izolátov⁷⁹. Najčastejšie identifikovaným typom ESBL u našich izolátov bola SHV-2a β -laktamáza, v dvoch prípadoch bol detegovaný SHV-12 typ, ktorý patrí k jedným z najrozšírenejších z SHV rodiny u kmeňov *Klebsiella pneumoniae*²³. TEM typ ESBL nebol geneticky zaznamenaný.

Výsledky PFGE potvrdili prítomnosť 11 (z celkového počtu 13 izolátov) rôznych ESBL-pozitívnych kmeňov *Klebsiella pneumoniae* u pacientov v intenzívnej starostlivosti v sledovanom období. Ide sa teda o výskyt veľkého počtu kmeňov s jedinečným restričným

profilom, čo signalizuje dobrú úroveň hygienicko-epidemiologických režimov na danej klinike.

Ako už bolo spomenuté, jedným z najvýznamnejších rizikových faktorov pre infekciu alebo kolonizáciu ESBL-pozitívnymi kmeňmi je dlhodobý pobyt pacientov v nemocničných zariadeniach. V posledných rokoch však narastá množstvo záchytovej týchto baktérií aj od zdravých osôb z komunitnej oblasti, ako to dokumentujú práce autorov Munday et al., Woodford et al. a Hopkins et al. z Veľkej Británie, poprípade práce španielskych autorov Valverde et al. a Canton et al.^{26, 27, 87, 88, 23}.

Pri sledovaní prevalence ESBL-pozitívnych enterobaktérií v gastrointestinálnom trakte pacientov hospitalizovaných vo FNOL a zdravých osôb z Olomouckého kraja bolo zistené, že táto je pre obidve oblasti porovnateľná a pohybuje sa v nízkych číslach (1,5 % pre nemocničnú a 1,2 % pre komunitnú oblasť), čo je v súlade s prácou autorov Munday et al., ktorí zdokumentovali 1,1% prevalenciu ESBL-pozitívnych enterobaktérií získaných zo vzoriek stolice pre obidve sledované oblasti²⁶. Ďalšie dáta na porovnanie pochádzajú zo Španielska a poukazujú na dramatický nárast týchto rezistentných baktérií vo vzorkách stolice od roku 1991 až do 2003 medzi hospitalizovanými pacientmi (< 1 % a 12 %) a osobami z komunitného prostredia (< 1 % a 5 %), pričom prevalencia dosiahla hodnotu takmer 4 % u zdravých dobrovoľníkov v roku 2003^{88, 23}.

Najčastejšie zachytenými enterobaktérií z gastrointestinálneho traktu chorých a zdravých osôb v našej práci boli kmene *Escherichia coli* produkujúce CTX-M typ ESBL, pričom dominujúcou bola CTX-M-15 β -laktamáza. Šírenie tohto typu medzi izolátmi získanými od pacientov hospitalizovaných v rôznych francúzskych nemocniciach popisuje hneď niekoľko autorov^{89, 90, 91, 81}. Podľa štúdie realizovanej v štokholmskej nemocnici a jej zdravotníckych zariadeniach, *bla*_{CTX-M} gén bol najčastejšie detegovaným u ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli*, pričom CTX-M-15 enzým bol dominantným typom⁹². Dáta získané od autorov Woodford et al., Hopkins et al. a Munday et al. naznačujú, že CTX-M-15 je najčastejšie identifikovanou nemocničnou a súčasne komunitnou širokospektrálnou β -laktamázou vo Veľkej Británii^{26, 27, 87}. Okrem enzýmov patriacich do CTX-M-1 boli v našom prípade zachytené aj tie, ktoré sú zaradované do CTX-M-9 skupiny, popísané hlavne v prácach zo Španielska. Bolo však publikovaných aj niekoľko štúdií z Portugalska, Francúzska a Veľkej Británie, venujúcich sa analýze týchto typov β -laktamáz²³.

Dôležitým zistením našej štúdie tiež bolo, že jednotlivé izoláty neboli geneticky príbuzné a teda nebolo zaznamenané klonálne šírenie ESBL-pozitívnych kmeňov v gastrointestinálnom trakte osôb z nemocničného a komunitného prostredia.

Je možno povedať, že rezistencia enterobaktérií voči β -laktámovým antibiotikám, podmienená produkciou širokospektrálnych β -laktamáz ESBL, predstavuje významný problém súčasnej medicíny^{17, 18, 28, 61}. Hlavným dôvodom je možnosť zlyhania liečby penicilínmi a cefalosporínmi, vrátane prípravkov so širokým spektrom účinku, v prípade infekcií vyvolaných baktériami s produkciou uvedených enzýmov. Táto skutočnosť vedie nielen k ďalším infekčným komplikáciám a predĺženiu doby hospitalizácie, ale predstavuje i ohrozenie na živote. Preto je nutná včasná a hlavne správna detekcia prítomného mechanizmu rezistencie a následné nasadenie adekvátnej antibiotickej liečby.

5.1.2 Prevalencia a charakterizácia β -laktamáz typu AmpC

Ďalšou skupinou enzýmov, ktorých produkcia významným spôsobom prispieva k rezistencii baktérií voči β -laktámovým antibiotikám, sú β -laktamázy typu AmpC. Prvým objaveným bol enzým, identifikovaný v roku 1940 u kmeňa *Escherichia coli*, hoci označenie AmpC pre neho ešte v tej dobe nebolo použité^{31, 93}. Postupom času dochádza k záchytu ďalších kmeňov s produkciou týchto enzýmov, čím sa ich počet neustále zvyšuje.

Ide jednak o skupinu baktérií vyznačujúcich sa prirodzeným výskytom *ampC* génu na chromozómoch, ako je to u mnohých zástupcov enterobaktérií, zahrňujúcich *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Providencia stuartii*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Buttiauxella* spp., *Ewingella americana* ako aj ďalších zástupcov gramnegatívnych baktérií typu *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Ochrobacterum anthropi*.

Produkcia AmpC enzýmov je v týchto prípadoch inducibilná účinkom niektorých β -laktámových antibiotik, a za normálnych okolností, t. j. bez prítomnosti induktora, nepredstavuje vážny klinický problém. Ten však nastáva, ak dochádza k ich nadprodukcii, a to v dôsledku mutácií v *ampC*, *ampD*, *ampR* a *ampG* génoch^{30, 31}. Ako príklad možno uviesť prácu autorov Kaye et al., ktorí zistili, že až u 19 % pacientov liečených širokospektrálnymi cefalosporínmi došlo počas terapie k vytvoreniu rezistencie kmeňov *Enterobacter* spp. voči týmto prípravkom, hoci boli kmene pôvodne identifikované ako citlivé

⁹⁴. Podobná štúdia zameraná na sledovanie vzniku rezistencie počas terapie infekcií vyvolaných kmeňmi *Enterobacter* spp. *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* a *Morganella morganii* bola realizovaná autormi Choi et al. Vznik rezistencie voči širokospektrálnym cefalosporínom bol pozorovaný oveľa častejšie u *Enterobacter* spp. (8,3 %, 10 zo 121 izolátov), než u *Citrobacter freundii* (2,6 %, 1/39), *Serratia marcescens* (0 %, 0/37) alebo *Morganella morganii* (0 %, 0/21 izolátov). Kmeň s takto nadobudnutou rezistenciou spôsobil v jednom prípade dokonca smrť pacienta ⁹⁵.

Na strane druhej strane stoja bakteriálne kmene produkujúce tzv. transferabilné AmpC β -laktamázy, vyznačujúce sa prítomnosťou *ampC* génu na plazmidoch. Hlavnými producentami sú *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. a *Escherichia coli* (hoci tento druh nesie aj chromozomálny *ampC* gén) ^{30, 31}. Prvý záchyt sa datuje do roku 1989, keď Bauernfeind et al. popísali kmeň *Klebsiella pneumoniae* izolovaný z oblasti Južnej Kórei, schopný preniesť rezistenciu voči cefoxitínu a cefotetanu, ako aj voči penicilínom, oxyimino-cefalosporínom a monobaktámom na kmeň *Escherichia coli*, ktorý pôvodne nebol citlivý na spomínané antibiotiká. Enzým bol nazvaný CMY-1 a bol oveľa citlivejší na sulbaktam než na kyselinu klavulanovú a tazobaktam (inhibitory bakteriálnych β -laktamáz), čo naznačovalo, že sa môže jednať o AmpC typ ⁹⁶. Avšak skutočné potvrdenie, že sa tieto β -laktamázy vyskytujú na plazmidoch a že sú schopné prenosu priniesol až Papanicolau et al. Autor so svojimi kolegami v štúdiu publikovanej v tom istom roku popísali tzv. MIR-1 enzým, ktorého gén bol kódovaný na plazmide a vykazoval 90% identitu s chromozomálnym *ampC* génom druhu *Enterobacter cloacae* ⁹⁷. Následne boli tieto plazmidovo-kódované β -laktamázy zachytené po celom svete a začali komplikovať prácu klinických mikrobiológov pri správnej detekcii prítomných β -laktamáz.

Rizikovými faktormi u infekcií krvného riečiska vyvolanými AmpC pozitívnymi baktériami sú podobne, ako u kmeňov produkujúcich β -laktamázy typu ESBL, dlhodobý pobyt pacientov v nemocničných zariadeniach, predovšetkým na jednotkách intenzívnej starostlivosti, predchádzajúca liečba antibiotikami, hlavne širokospektrálnymi cefalosporínmi, katetrizácia pacientov a v neposlednom rade tiež rôzne druhy závažných ochorení typu hematoonkologických, poprípade transplantácie ³¹.

Jedným z cieľov našej práce bolo porovnanie prevalencie AmpC-pozitívnych enterobaktérií v gastrointestinálnom trakte chorých a zdravých osôb, t. j. pacientov hospitalizovaných na rôznych oddeleniach FNOL a zdravých osôb z komunitnej oblasti Olomouckého kraja. Výsledky poukazujú na porovnateľný, avšak veľmi nízky záchyt týchto

baktérií z rektálnych výterov, pohybujúci sa okolo 1 % v oboch prípadoch. U kmeňov *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli* ide o výskyt plazmidovo-kódovaných AmpC enzýmov (DHA a CIT typ), zatiaľ čo u druhov *Enterobacter cloacae* a *Citrobacter freundii* sa predpokladá, že *ampC* gén sa bude vyskytovať na chromozóme. Presné určenie prítomnej β -laktamázy by sa stanovilo pomocou priameho sekvenovania. Výsledky prevalencie AmpC-pozitívnych baktérií v gastrointestinálnom trakte zdravých osôb Olomouckého kraja boli publikované autormi Čekanová et al., ktorí uvádzajú, že v tomto prípade ide skutočne o prvý záchyt kmeňa *Escherichia coli* z komunitnej oblasti celej Českej republiky⁹⁸ s produkciou AmpC β -laktamáz, ktorých gén je kódovaný na plazmide.

Ďalšia časť práce bola venovaná sledovaniu výskytu AmpC-pozitívnych kmeňov *Klebsiella pneumoniae* u pacientov s hematoonkologickým ochorením. Z výsledkov dizertačnej práce vyplýva, že v priebehu 3 mesiacov bolo na Hemato-onkologickej klinike získaných celkovo 7 AmpC pozitívnych kmeňov *Klebsiella pneumoniae*, pričom výsledok bol potvrdený fenotypovými aj genetickými metódami. Pomocou multiplex PCR sa potvrdil výskyt DHA typu. Následné priame sekvenovanie by určilo, či sa jedná o DHA-1, DHA-2 alebo DHA-3 enzým, ako tomu bolo v práci autorov Empel et al., ktorí v prostredí Českej republiky zachytili u izolátov rovnakého druhu DHA-1 β -laktamázu⁹⁹. V štúdií od autorov Pai et al. bolo za štvorročné obdobie zozbieraných celkovo 28 AmpC-pozitívnych izolátov *Klebsiella pneumoniae*, ktoré boli pôvodcami infekcií krvného riečiska. U polovice z nich bola využitím genetických metód stanovená DHA-1 β -laktamáza, u druhej enzým patriaci do CMY-1 skupiny¹⁰⁰.

Infekcie vyvolané kmeňmi *Klebsiella pneumoniae* predstavujú pre pacientov s hematoonkologickým ochorením vážne nebezpečie¹⁰¹. Toto riziko vzrastá v prípade, že sa jedná o kmene produkujúce AmpC typ β -laktamáz. Z tohoto dôvodu je potrebné analyzovať ich výskyt a rezistenciu k antimikrobiálnym prípravkom. Na základe získaných údajov je možné realizovať adekvátnu antibiotickú politiku, ktorá má pre úspešné zvládnutie infekcie veľký význam.

Sledovanie výskytu AmpC β -laktamáz u enterobaktérií na novorodeneckom oddelení bolo ďalším cieľom v rámci dizertačnej práce. Z klinického materiálu bolo získaných 12 AmpC pozitívnych izolátov enterobaktérií. U kmeňa *Klebsiella pneumoniae* sa potvrdila prítomnosť plazmidovo-kódovanej β -laktamázy EBC typu (ACT-1 alebo MIR-1 enzým). Ten istý typ bol detegovaný aj v prípade kmeňov *Enterobacter cloacae*, hoci tu pôjde

o AmpC cefalosporinázu prirodzene sa vyskytujúcu u daného druhu a kódovanú na chromozóme. Rovnaká situácia bude aj u predstaviteľov rodu *Citrobacter*, kde bol zaznamenaný CIT typ.

Z bakteriálneho druhu *Escherichia coli* bolo získaných 5 izolátov. Tieto však predstavovali jeden kmeň, získaný z rôznych klinických materiálov od dvoch novorodencov. Vzhľadom na to, že u daného kmeňa sa nepotvrdila produkcia plazmidovo-kódovaných AmpC β -laktamáz, sledovala sa možnosť nadprodukcie chromozomálnych AmpC enzýmov. Bolo popísaných hneď niekoľko mutácií v oblasti promótoru/atenuátora *ampC* génu zodpovedných za nadprodukciiu cefalosporináz AmpC typu kódovaných na chromozóme. Ako najvýznamnejšie boli identifikované tie, ktoré sa vyskytujú v pozíciách -88, -82, -42, -18, -1 a +58. Záměna cytozínu (C) za tymín (T) v pozícii -42 vytvára perfektný TTGACA box v tzv. upstream pozícii od bežného -35 boxu, čím sa zvyšuje sila promótoru a rýchlosť transkripcie. Obdobne aj mutácia v pozícii -18 vytvára nový -10 box, ktorý zvyšuje aktivitu enzýmu 8 – 18 krát^{102, 103}. Podľa autorov Yu et al. záměna v pozícii +32 je jednou zo štyroch, ktoré znižujú stabilitu vlásenkovej štruktúry atenuátora a tým dramaticky zvyšujú expresiu *ampC* génu⁵⁷. Pomocou PCR a priameho sekvenovania sa v prípade nášho kmeňa skutočne potvrdili jednonukleotidové záměny v špecifických pozíciách, vedúce k nadprodukcii AmpC enzýmov. Ide o prvý genetický popis mutácií v *ampC* géne v prostredí Českej republiky.

Belgický autori Bogaerts et al. vo svojej práci zistili, že z celkového počtu 83 AmpC-pozitívnych klinických izolátov *Escherichia coli* bola zvýšená expresia *ampC* génu kódovaného na chromozóme zaznamenaná v 72 prípadoch, pričom u všetkých boli detegované záměny v pozíciách -42 a -18. U 14 izolátov sa tieto mutácie vyskytli spoločne so záměnami v pozíciách +17 až +37, ktoré podľa autorov môžu prispieť k zvýšeniu sily promótoru znížením stability vlásenkovej štruktúry atenuátora. U zvyšných 11 izolátov *Escherichia coli*, u ktorých sa nepotvrdila nadprodukcia enzýmu bola detegovaná prítomnosť plazmidovo-kódovaných AmpC β -laktamáz¹⁰⁴.

Expresia *ampC* génu je u *Escherichia coli* konštitutívna, aj keď za normálnych podmienok sú β -laktamázy produkované vo veľmi malom množstve. Nadprodukcia týchto enzýmov však môže vyvolať rezistenciu k penicilínom, cefalosporínom I. a II. generácie, cefamycínom a znížiť účinok oxyimino-cefalosporínov. Hyperproducenti sú tiež rezistentní na kombináciu penicilínov a inhibítorov β -laktamáz a v prípade straty špecifických porínov vonkajšej membrány tiež rezistentní voči karbapenémom, čím sa možnosti nasadenia vhodnej terapie značne redukovujú¹⁰³.

5.2 Analýza enterobaktérií s produkciou širokospektrálnych β -laktamáz v animálnej oblasti

Použitie antibiotík na liečbu bakteriálnych infekcií nezostalo obmedzené len pre humánnu populáciu, ale rozšírilo sa aj do animálnej oblasti, kde v dnešnej dobe slúži na účely terapeutické, profylaktické a metafylaktické. Najčastejšie používanými sú tetracyklíny, hneď za nimi nasledujú β -laktamové antibiotika. Na treťom mieste sú sulfonamidy, eventuálne v kombinácii s trimetoprimom ¹⁰⁵.

5.2.1 Problematika β -laktamáz typu ESBL

Zo širokospektrálnych cefalosporínov, cefoperazon, cefquinom, ceftiofur a cefuroxim boli schválené na použitie v animálnej oblasti, konkrétne slúžia na liečbu ochorení ako metritída a mastitída u kráv, respiračných ochorení u prežúvavcov, koní a ošípaných alebo septikémie vyvolanej kmeňmi *Escherichia coli* u teliat ¹⁰⁶. Cefotaxim a cefaletin sú liekmi prvej voľby u cystitídy a kožných poranení u mačiek a psov ¹⁰⁷.

Nebolo vôbec prekvapujúce, keď sa aj v tejto oblasti objavili bakteriálne kmene, odolávajúce účinkom širokospektrálnych cefalosporínov. Prvá zmienka o identifikácii kmeňa produkujúceho ESBL bola zaznamenaná v roku 1988 v Japonsku. Išlo o baktériu *Escherichia coli* produkujúcu FEC-1 β -laktamázu, izolovanú od laboratórneho psa ¹⁰⁸. Od tohto roku bol pozorovaný nárast v záchyte ESBL pozitívnych enterobaktérií u divokých, domácich a dokonca aj zvierat žijúcich na farmách, obzvlášť sa to týkalo druhov *Escherichia coli* a *Salmonella* spp., kde bola zaznamenaná produkcia CTX-M enzýmov. Rozmanitosť v čase objavenia sa a v zastúpení týchto rezistentných baktérií medzi jednotlivými krajinami je pravdepodobne daná spotrebou cefalosporínov a detekčnými metódami v tej danej krajine, poprípade súvisí s cestovaním a medzinárodným obchodom. V porovnaní s humánnou populáciou je však tento záchyt nízky ^{24, 107, 109}. To ale nemusí znamenať, že je daný problém zanedbateľný, skôr sa danej problematike nevenuje toľko pozornosti, než ako je tomu v humánnej populácii.

Výsledky tejto dizertačnej práce poukazujú na záchyt siedmich ESBL pozitívnych izolátov *Escherichia coli* zo zmesových vzoriek slepých čriev brojlerov a kloakálnych výterov moriek, odobraných z rôznych fariem na Morave. Prítomnosť ESBL-pozitívnych enterobaktérií u hydiny bola zaznamenaná aj v práci od autorov Smet et al., ktorí

identifikovali 133 ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* zo 489 kloakálnych výterov odobraných na 5 belgických hydínových farmách. Medzi ESBL boli dominujúcimi typmi β -laktamázy patriace do CTX-M-1 skupiny, hlavne CTX-M-1 enzým¹¹⁰. Ďalšia štúdia, venovaná sledovaniu výskytu ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* na hydínových, prasacích a zajačích farmách v Španielsku, bola vykonaná autormi Blanc et al. U vzoriek z hydiny, zachytili a identifikovali ESBL fenotyp u 51 izolátov, pričom najčastejšie šlo o CTX-M-14 a CTX-M-9 enzým¹¹¹. Z hľadiska typového výskytu, naše výsledky korešponujú s vyššie uvedenými štúdiami, vzhľadom na záchyt CTX-M-1 a CTX-M-14 enzýmov. Nami potvrdený SHV-12 enzým nebol v práci autorov Smet et al. popísaný, v druhej uvedenej štúdii sa vyskytol iba v malom množstve (5 izolátov)^{110,111}.

Pomocou metódy PFGE bolo detegované klonálne šírenie jedného identického ESBL-pozitívneho kmeňa *Escherichia coli* medzi troma morkami v rámci jednej farmy.

5.2.2 Problematika β -laktamáz typu AmpC

Ďalšou skupinou širokospektrálnych β -laktamáz zachytených z animálnej oblasti sú tzv. plazmidovo-kódované AmpC enzýmy. Ich výskyt možno pozorovať hlavne u kmeňov *Escherichia coli* a *Salmonella* spp. Veľké množstvo týchto rezistentných kmeňov bolo zaznamenaných v USA. Jednalo sa o izoláty získané z rôznych druhov zvierat, mačiek, kráv, kureníc, psov, koní, ošípaných a moriek^{112, 113}. Vo všetkých prípadoch šlo o detekciu CMY-2 enzýmu. Autori Winokur et al. dokonca zaznamenali prenos plazmidu nesúceho *bla*_{CMY-2} gén medzi izolátmi *Escherichia coli* a *Salmonella* spp. medzi zvieratom a človekom¹¹⁴. Ďalšia práca autorov Fey et al. zachytila šírenie rovnakého kmeňa *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium produkujúceho CMY-2 β -laktamázu medzi teľaťom, ktoré ochorelo na salmonelózu a dvanásťročným synom farmára¹¹⁵. Predpokladá sa, že nárast enterobaktérií s produkciou tohto typu enzýmu v USA súvisel najmä s používaním antibiotika ceftiofuru a následné šírenie rezistentných kmeňov zase s horizontálnym transferom génov rezistencie¹⁰⁷.

Naše výsledky poukazujú na záchyt 2 AmpC pozitívnych kmeňov *Escherichia coli* zo zmesových vzoriek slepých čriev brojlerov a kloakálnych výterov moriek, u ktorých bol pomocou priameho sekvenovania stanovený CMY-2 typ. V práci belgických autorov Smet et al. bol AmpC fenotyp detegovaný u 35 izolátov, pričom bol zaznamenaný iba CMY-2 enzým¹⁰⁷. Podobné výsledky dosiahli aj vyššie uvedení autori Blanc et al., ktorí produkciu AmpC β -laktamáz zachytili u 13 izolátov, u ktorých bola zaznamenaná iba CMY-2 β -laktamáza¹¹¹.

Je možné konštatovať, že problematika baktérií s produkciou širokospektrálnych β -laktamáz nie je obmedzená len na humánnu populáciu, ale je možné ju pozorovať aj v animálnej oblasti. Tento problém sa však netýka len okolitých štátov, ale ako vidieť zasiahol už aj Českú republiku^{116, 117}. Rezistentné baktérie zvierat sa cez potravinový reťazec môžu dostať až do tráviaceho traktu ľudí a dočasne ho kolonizovať, s možným prenosom génov rezistencie na predstaviteľov normálnej mikroflóry¹⁰⁷. Otázkou teda ostáva možné riziko možného prenosu génov rezistencie z veterinárnej oblasti na človeka.

Preto je dôležité dodržiavať tzv. koncept „One health“ vytvárajúci jednotný a spoločný prístup pri riešení problematiky rezistencie voči antimikrobiálnym látkam a tým zlepšenia celosvetovej zdravotnej situácie pre ľudí a zvieratá súčasne¹¹⁸.

5.3 Využitie metódy PCR a analýzy krivky topenia pri genetickej charakterizácii ESBL-pozitívnych izolátov

Na detekciu ESBL-pozitívnych izolátov sa v bežnej klinickej praxi používajú metódy založené na určení fenotypového prejavu, teda stanovenia produkcie širokospektrálnych enzýmov. Najznámejšími su DDST, E-test a CLSI metóda, založené na synergickom účinku cefalosporínu III. generácie a inhibítora β -laktamáz³². Na poli ESBL detekcie sú v dnešnej dobe tieto testy uprednostňované, jednak z hľadiska ekonomického ale aj z hľadiska samotného prevedenia techník. Na druhej strane však môžu v rade prípadov zlyhať a príslušné baktérie sú následne falošne interpretované ako citlivé, čo môže viesť k nesprávnemu nasadeniu liečby a konečne k zvýšeniu mortality a morbiditu u pacientov⁶¹.

Preto bolo navrhnutých množstvo genetických metód, ktoré v rade prípadov môžu pomôcť v presnejšej detekcii prítomného mechanizmu rezistencie alebo urýchliť čas analýzy, zohrávajúci významnú úlohu najmä u pacientov so závažným ochorením. Prvými genetickými metódami použitými na detekciu ESBL boli techniky využívajúce hybridizačné DNA sondy^{37, 38, 39}. Neskôr sa začalo s amplifikáciou cieľového *bla* génu, s následnou charakterizáciou získaných amplicónov metódou SSCP^{42, 43}, RFLP^{43, 44}, priamym sekvenovaním alebo s použitím LCR⁴⁵ na sledovanie aminokyselinových substitúcií zodpovedných za rozšírenie spektra účinku.

K najnovším postupom patrí využitie techniky PCR v reálnom čase, eventuálne v kombinácii s analýzou krivky topenia. Na detekciu mutácií v troch aminokyselinových pozíciách *bla*_{SHV} génu (179, 238 a 240) bola autormi Randegger a Hächler vyvinutá veľmi

citlivá a špecifická metóda využívajúca fluorescenčne značené hybridizačné sondy a analýzu krivky topenia⁴⁸. Výsledkom štúdie autorov Chia et al. bol systém multiplex PCR určený na identifikáciu génov kódujúcich SHV a CTX-M β -laktamázy, ktorý súčasne umožňoval rozlíšenie medzi SHV typom s úzkym a so širokým spektrom účinku, a to pomocou analýzy krivky topenia⁴⁹. Birkett et al. navrhli metódu založenú na multiplex PCR v reálnom čase s použitím sond typu Taq Man na detekciu a genotypizáciu enterobaktérií produkujúcich CTX-M β -laktamázy⁵⁰. Vo všetkých uvedených prácach však museli byť navrhnuté špecifické sondy, či už typu Taq Man alebo FRET, ktoré sa síce vyznačujú veľkou špecificitou, ale na druhej strane aj pomerne vysokou cenou. Analýza krivky topenia, ale s využitím fluorescenčných interkalačných farbičiek, slúžila v práci autorov Pimkin a Edelstein na rozlíšenie jednotlivých CTX-M skupín enzýmov¹¹⁹. Štúdia bola však zameraná len na detekciu jednej skupiny β -laktamáz.

Jedným z výsledkov dizertačnej práce bolo navrhnutie novej techniky využívajúcej multiplex PCR a analýzu krivky topenia s vysokým rozlíšením, ktorá umožnila amplifikáciu troch *bla* génov (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}) v jednej reakcii a následnú identifikáciu prítomných β -laktamáz. Jednou z jej výhod bolo, že bola schopná v jednej reakcii spracovať pomerne veľké množstvo klinických izolátov produkujúcich súčasne TEM, SHV alebo CTX-M typ β -laktamázy, pričom výsledky boli dostupné v relatívne krátkom čase (približne za 4 hodiny od izolácie DNA). Druhou výhodou bolo, že vďaka použitiu CTX-M univerzálnych primerov bolo možné rozlíšiť medzi jednotlivými skupinami, a to aj bez použitia restriktívnej analýzy či priameho sekvenovania. A konečne, hoci boli u klinických izolátov detegované viaceré *bla* gény súčasne, nevyskytli sa problémy s amplifikáciou, separáciou pomocou gélovej elektroforézy, či analýzou krivky topenia. Preto sa zdá, že táto metóda sa môže stať vhodným nástrojom na detekciu prítomnosti *bla* génov a ich následnú charakterizáciu. Na druhej strane má však metóda aj niekoľko nevýhod. Jednou z nich je, že neumožňuje rozlíšiť medzi génom kódujúcim β -laktamázu s úzkym a so širokým spektrom účinku. Z tohoto dôvodu je nevyhnutné použitie metódy priameho sekvenovania, v prípade, že potrebujeme zistiť konkrétny typ prítomného enzýmu. Ďalšou limitáciou metódy môže byť určitý nedostatok zbierkových kmeňov produkujúcich určité typy enzýmov, ktoré buď v Českej republike neboli detegované alebo neboli izolované. Na druhej strane sa však nepredpokladá, že výsledky analýzy u týchto kmeňov by sa výrazným spôsobom líšili od predchádzajúcich, patriacich do tej istej enzýmovej skupiny. Iná situácia by však mohla nastať u kmeňov produkujúcich β -laktamázy, ktoré sa zaraďujú do CTX-M-2, CTX-M-8

alebo CTX-M-25 skupín. Výskyt týchto enzýmov je však v Európe veľmi zriedkavý²³ a v prostredí Českej republiky zatiaľ nebol zaznamenaný. Úlohou do budúcnosti preto ostáva rozšírenie zbierkových kmeňov.

Nová metóda bola následne použitá na monitorovanie prevalence ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* získaných z jednotiek intenzívnych starostlivostí troch veľkých českých nemocníc. Použitím novej metódy a priameho sekvenovania bolo zistené, že najrozšírenejším typom ESBL u klinických izolátov bol CTX-M-15 enzým. V práci Zhanel et al. bolo v priebehu rokov 2005 – 2006 zozbieraných celkovo 496 izolátov *Escherichia coli* z 19 jednotiek intenzívnej starostlivosti z rôznych častí Kanady. Produkcia ESBL bola zaznamenaná u 3,7 % izolátov, u všetkých bol detegovaný CTX-M-15 typ¹²⁰. Kmene s produkciou tohto typu sú pomerne rozšírené aj v rôznych európskych nemocniciach, vo Veľkej Británii^{26, 27}, vo Švédsku⁹² i Francúzsku¹²¹. Ďalšia štúdia zameraná na sledovanie prevalence ESBL-produkujúcich enterobaktérií na jednotkách intenzívnej starostlivosti, bola realizovaná v Thajsku. Autori Wu et al. zistili, že dominantnými typmi ESBL u izolátov *Escherichia coli* boli CTX-M-3, CTX-M-14 a SHV-12 β -laktamázy¹²².

Možno konštatovať, že vzhľadom na neustále narastajúci trend vo výskyte ESBL-pozitívnych enterobaktérií na nemocničných oddeleniach, je požadovaná rýchla a hlavne presná metóda na ich identifikáciu. Popri klasických fenotypových metódach by svoje miesto v budúcnosti mohli nájsť aj metódy genetické, vyznačujúce sa vysokou citlivosťou a špecifitou a tým pomôcť na poli detekcie ESBL-pozitívnych kmeňov. Jednou z možností by mohlo byť využitie multiplex PCR s následnou analýzou krivky topenia.

5.4 Epidemiologická analýza ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* a charakterizácia génov kódujúcich ich produkciu

Od objavenia prvej širokospektrálnej β -laktamázy v Nemecku uplynulo už 27 rokov⁶². Za toto obdobie došlo nielen k výraznému nárastu, čo sa do počtu jednotlivých typov týka, ale aj k značnej zmene z hľadiska epidemiológie kmeňov produkujúcich tieto enzýmy. Zatiaľ čo v deväťdesiatych rokoch minulého storočia prevládal výskyt kmeňov *Klebsiella pneumoniae* s produkciou SHV a TEM β -laktamáz, pričom tieto kmene boli najčastejšie izolované od nemocničných pacientov a ich prevalencia súvisela so šírením epidemických klonov, v posledných rokoch sa situácia dramaticky zmenila. Hlavnými producentmi ESBL sa

stali kmene *Escherichia coli* izolované čoraz častejšie od pacientov z komunitnej oblasti a vyznačujúce sa produkciou CTX-M β -laktamáz. Epidemiológia týchto kmeňov súvisí skôr s výskytom a prenosom mobilných genetických elementov, než s klonálnym šírením^{23, 29, 123}.

5.4.1 Epidemiologická typizácia kmeňov produkujúcich širokospektrálne enzýmy

Najčastejšie používanou technikou na sledovanie genetickej identity získaných kmeňov je metóda pulznej gélovej elektroforézy, založená na restriktívnej analýze genómovej DNA, s následnou separáciou v periodicky menenej orientácii elektrického poľa.

Táto bola tiež použitá v predloženej dizertačnej práci na epidemiologickú typizáciu izolátov z JIS troch veľkých českých nemocníc (KNTB, FNO a FNOL). Z našich výsledkov vyplýva, že z celkového počtu 11 izolátov *Escherichia coli* z KNTB v Zlíne bolo identifikovaných 7 kmeňov, to znamená, že bolo pozorované šírenie rovnakého kmeňa u viacerých pacientov, ako tomu bolo jednak na neonatologickej a jednak na JIS operačných oborov. Väčšina izolátov z FNO nebola geneticky príbuzná, avšak bol zaznamenaný jeden kmeň od troch rôznych pacientov na Oddelení internej medicíny a druhý od dvoch detí na Klinike detského lekárstva. Ani vo FNOL sa nezaznamenalo výrazné šírenie identických kmeňov na jednotlivých oddeleniach, bol zaznamenaný iba jeden kmeň získaný od troch novorodencov. Ani v jednom zdravotníckom zariadení nebol pozorovaný prenos ESBL-pozitívneho kmeňa medzi jednotlivými oddeleniami.

Autori Wu et al. použili na epidemiologickú typizáciu ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli*, získaných z jednotiek intenzívnej starostlivosti v nemocnici v Thajsku, metódu IRS-PCR. Z celkového počtu 39 izolátov bolo identifikovaných 27 rôznych genotypov, pričom najrozšírenejší genotyp bol získaný od 8 pacientov z troch JIS¹²². Metódu PFGE využili vo svojej štúdií autori Fang et al. na sledovanie molekulárnej epidemiológie ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* zozbieraných v priebehu rokov 2001 až 2006 v jednej štokholmskej nemocnici a v pridružených zdravotníckych zariadeniach. Z celkového počtu 87 izolátov, bola u 80 potvrdená prítomnosť *bla*_{CTX-M} génu a bolo identifikovaných 11 klonov a 29 kmeňov s jedinečným restriktívnym profilom. Genotyp s označením 1, ktorý bol najrozšírenejší (zahŕňal až 11 izolátov), je podľa autorov v danej oblasti detegovaný už niekoľko rokov⁹².

5.4.2 Charakterizácia mobilných genetických elementov – inzerčných sekvencií

V mobilizácii a následnej expresii *bla*_{CTX-M} génu môže byť zahrnutých hneď niekoľko mobilných genetických elementov, nachádzajúcich sa v tesnej blízkosti spomínaného génu^{81, 124}. Ide predovšetkým o inzerčné sekvencie, a to hlavne typu *ISEcpI*, ktorá bola prvýkrát popísaná v tzv. upstream pozícii *bla*_{CMY-4} u klinického izolátu *Escherichia coli* z Veľkej Británie¹²⁵. Tento mobilný genetický element bol následne identifikovaný u väčšiny *bla*_{CTX-M} génov a predpokladá sa, že umožnil mobilizáciu génu kódujúceho chromozomálnu β -laktamázu u *Kluyvera* sp., akéhosi predchodcu *bla*_{CTX-M} génu¹²³. Ďalšou významnou inzerčnou sekvenciou je IS26 popisovaná v okolí *bla*_{CTX-M} autormi Saladin et al.¹²⁶. U *bla*_{CTX-M-2} a *bla*_{CTX-M-9} sa tiež často vyskytuje mobilný genetický element *ISCR1*¹²³.

Ďalším cieľom v rámci dizertačnej práce bolo stanovenie prítomnosti dvoch typov inzerčných sekvencií, a to *ISEcpI* a IS26 u klinických izolátov *Escherichia coli* od pacientov v intenzívnej starostlivosti. U väčšiny kmeňov produkujúcich CTX-M-15 β -laktamázu bol detegovaný buď jeden alebo druhý element. V štúdií francúzskych autorov Eckert et al., zameranej na sledovanie šírenia CTX-M β -laktamáz medzi enterobaktériami získanými z parížskych nemocníc bol u 13 izolátov (z celkového počtu 16) zachytený výskyt *ISEcpI*, zatiaľ čo IS26 iba u jedného z nich⁸¹. Autory Lartigue et al. vo svojej štúdií identifikovali *ISEcpI* u 13 izolátov *Escherichia coli*, pochádzajúcich väčšinou z Francúzska a produkujúcich CTX-M-15 enzým, zatiaľ čo IS26 nebola detegovaná ani u jedného z nich¹²⁷. Zaujímavý bol v našej štúdií kmeň produkujúci CTX-M-27 β -laktamázu, šíriaci sa medzi rôznymi pacientami na Oddelení intenzívnej starostlivosti operačných oborov KNTB, u ktorého boli detegované oba genetické elementy súčasne. U kmeňov *Escherichia coli*, u ktorých bol stanovený CTX-M-9 typ sa buď v detegovanej upstream pozícii nachádzala inzerčná sekvencia *ISEcpI* alebo nebol zaznamenaný žiaden element. U týchto kmeňov možno v tejto pozícii očakávať prítomnosť iného mobilného genetického elementu, napr. *ISCR1*. Táto sa však nestanovovala.

5.4.3 Charakterizácia mobilných genetických elementov – plazmidov

Ďalšími sledovanými mobilnými genetickými elementami boli plazmidy. V tomto prípade však šlo len o akúsi prvotnú charakterizáciu vybraných kmeňov, nie o presný popis plazmidového profilu všetkých kmeňov od pacientov v intenzívnej starostlivosti. Preto sa neuvádza presná veľkosť ani počet týchto mobilných elementov u jednotlivých kmeňov, čo

však bude cieľom ďalších experimentov. Obecne sa uvádza, že gény kódujúce produkciu CTX-M enzýmov sa bežne vyskytujú na plazmidoch, ktorých veľkosť sa pohybuje od 7 do 160 kb^{126, 127, 128}.

Snahou však bolo u skupiny vybraných kmeňov overiť možnosť prenosu plazmidu nesúceho *bla*_{CTX-M}, ktorý umožňuje odolať inhibičnému účinku cefalosporínu III. generácie (konkrétne cefotaximu). Autori Eckert et al boli pri svojich konjugačných experimentoch úspešný u 9 z celkového počtu 19 CTX-M pozitívnych enterobaktérií, t. j. schopnosť odolať inhibičnej koncentrácii cefotaximu bola prenesená u 9 izolátov čeľade *Enterobacteriaceae* produkujúcich CTX-M enzýmy na kmeň citlivý na cefotaxim⁸¹. V našom prípade došlo k úspešnej konjugácii u dvoch kmeňov (z celkového počtu 6) *Escherichia coli*. Následná izolácia plazmidovej DNA a stanovenie prítomnosti *bla*_{CTX-M} génu u konjugátov potvrdilo výsledky experimentu.

Posledným krokom v charakterizácii bola typizácia prenášaných plazmidov a zaradenie do tzv. inkompatibilných skupín. Hoci šírenie *bla*_{CTX-M-9} génu je vo väčšine prípadov viazané na plazmidy patriace do IncH2 skupiny¹³¹, v našom prípade, podobne ako v ďalších štúdiách^{124, 132, 133} bola stanovená IncF skupina, konkrétne šlo o súčasný výskyt FII a FIB replikónu). Získané výsledky však môžu byť ovplyvnené malým počtom sledovaných kmeňov.

Zvýšený celosvetový nárast ESBL-produkujúcich izolátov súvisí jednak s prenosom génov rezistencie na špecifických mobilných elementoch a jednak so šírením epidemických klonov. V prvom prípade zohráva dôležitú úlohu správna antibiotická preskribcia, pretože nekontrolované a nadmerné užívanie cefalosporínov III. generácie, ako aj iných antibiotík, predstavuje neustály selekčný tlak prostredia. Gény kódujúce produkciu ESBL sa často vyskytujú na plazmidoch súčasne s génmi zodpovedajúcimi za rezistenciu voči aminoglykozidom, fluorchinolónom alebo sulfonamidom, čím sa u pacientov objavujú tzv. multirezistentné kmene a terapia pacientov s infekciami vyvolanými takýmito baktériami sa stáva náročnou¹⁹. V druhom prípade zohrávajú dôležitú úlohu správne hygienické a infekčné opatrenia, ktorých dodržiavanie môže zabrániť šíreniu epidemických klonov medzi jednotlivými pacientmi, či už v rámci jedného oddelenia, alebo v rámci celého nemocničného zariadenia.

6 ZÁVERY

Na základe výsledkov postgraduálneho štúdia zameraného na výskyt širokospektrálnych β -laktamáz u izolátov čeľade *Enterobacteriaceae* a ich genetickú analýzu, možno formulovať nasledujúce závery:

1. Bol preukázaný výskyt ESBL a AmpC β -laktamáz u enterobaktérií izolovaných z klinického materiálu vybraných súborov chorých a zdravých osôb. Výsledky sú zhrnuté do nasledujúcich bodov.
 - a) Prevalencia ESBL-pozitívnych kmeňov *Klebsiella pneumoniae* u pacientov v intenzívnej starostlivosti dosiahla za obdobie 5 mesiacov hodnotu 19 %.
 - b) Bol zaznamenaný výskyt 7 kmeňov *Klebsiella pneumoniae* s produkciou AmpC širokospektrálnych β -laktamáz u pacientov s hematónkologickým ochorením.
 - c) Celková prevalencia ESBL-pozitívnych baktérií v gastrointestinálnom trakte hospitalizovaných pacientov dosiahla hodnotu 1,5 %, u osôb z komunitnej oblasti Olomouckého kraja 1,2 %.
 - d) Prevalencia AmpC producentov získaných izoláciou z rektálnych výterov dosiahla hodnotu 0,9 % u chorých a 1 % u zdravých osôb.
 - e) Dominujúcimi ESBL u druhu *Klebsiella pneumoniae* boli SHV, hlavne SHV-2a typ. U enterobaktérií pochádzajúcich z gastrointestinálneho traktu bola vo väčšine prípadov detegovaná CTX-M-15 β -laktamáza.
 - f) Multiplex PCR odhalila výskyt EBC, CIT a DHA typu AmpC β -laktamáz medzi kmeňmi izolovanými z rektálnych výterov chorých a zdravých osôb.
2. Pomocou PCR a priameho sekvenovania sa v prípade kmeňa *Escherichia coli* izolovaného z Novorodeneckého oddelenia Fakultnej nemocnice Olomouc skutočne potvrdili jednonukleotidové zámery v špecifických pozíciách, vedúce k nadprodukcii AmpC enzýmov. Ide o prvý genetický popis mutácii v *ampC* géne v prostredí Českej republiky. Súčasne boli na danom oddelení zachytené kmene *Klebsiella pneumoniae* a *Enterobacter cloacae* s produkciou EBC a kmene rodu *Citrobacter* produkujúce CIT typ AmpC cefalosporináz.
3. Bola preukázaná prítomnosť ESBL- a AmpC-pozitívnych enterobaktérií v zmesových vzorkách slepých čriev brojlerov a kloakálnych výteroch moriek,

odobraných z rôznych fariem v Českej republike. Z ESBL boli zaznamenané CTX-M-1, CTX-M-14 a SHV-12 β -laktamázy, u AmpC β -laktamáz bol dominujúcim CMY-2 typ. Ide o prioritné výsledky v tejto oblasti v rámci Českej republiky.

4. Bola navrhnutá technika využívajúca multiplex PCR a analýzu krivky topenia s vysokým rozlíšením, ktorá umožnila amplifikáciu troch *bla* génov (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M}) v jednej reakcii a následnú identifikáciu prítomných β -laktamáz.
5. Nová metóda bola použitá na sledovanie prevalencie ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* získaných z jednotiek intenzívnej starostlivosti troch veľkých českých nemocníc (Krajskej nemocnice Tomáša Baťu v Zlíne, Fakultnej nemocnice v Ostrave a Fakultnej nemocnice v Olomouci). Využitím tejto genetickej techniky spolu s priamym sekvenovaním bolo zistené, že najrozšírenejším typom ESBL u klinických izolátov bol CTX-M-15 enzým. Bola taktiež potvrdená možnosť využitia metódy na predbežnú identifikáciu prítomných β -laktamáz.
6. Na jednotkách intenzívnej starostlivosti Krajskej nemocnice Tomáša Baťu v Zlíne, vo Fakultnej nemocnici v Ostrave a Fakultnej nemocnici v Olomouci bolo zaznamenané šírenie sledovaných rezistentných baktérií medzi rôznymi pacientmi v rámci jedného oddelenia. Ani v jednom zdravotníckom zariadení však nebol pozorovaný prenos ESBL-pozitívneho kmeňa medzi jednotlivými oddeleniami.
7. Bola dokázaná prítomnosť inzerčných sekvencií *ISEcp1* a *IS26* zodpovedných za mobilizáciu a expresiu *bla*_{CTX-M} génu u klinických izolátov *Escherichia coli* z jednotiek intenzívnej starostlivosti troch českých nemocníc. Konjugačné experimenty potvrdili možnosť prenosu *bla*_{CTX-M} z bunky rezistentnej voči cefotaximu, do bunky citlivej na toto antibiotikum.

7 SÚHRN

Jedným zo závažných celosvetových problémov v oblasti zdravotníctva je narastajúca rezistencia baktérií voči antimikrobiálnym prípravkom. Hlavným dôvodom je možnosť zlyhania liečby u pacientov, ktorých ochorenie bolo vyvolané spomínanými rezistentnými kmeňmi. Táto skutočnosť môže viesť nielen k ďalším infekčným komplikáciám a predĺženiu doby hospitalizácie, ale mnohokrát predstavuje ohrozenie priamo na živote pacienta. Včasná a hlavne správna detekcia prítomného infekčného agens, spolu so stanovením citlivosti respektíve rezistencie voči antimikrobiálnym prípravkom, zohrávajú dôležitú úlohu pri nasadení adekvátnej antibiotickej liečby.

Schopnosť bakteriálnej populácie odolávať účinku inhibičnej koncentrácie danej skupiny antibiotík môže byť buď prirodzená (primárna) alebo získaná (sekundárna), pričom druhý typ predstavuje z terapeutického hľadiska oveľa významnejší problém. Dôvodom sú mobilné genetické elementy, ako napríklad plazmidy a transpozóny, schopné prenášať gény rezistencie z jedného DNA systému na druhý a z bunky rezistentnej do citlivej.

Produkcia β -laktamáz predstavuje u gramnegatívnych baktérií najvýznamnejší mechanizmus rezistencie voči β -laktámovým antibiotikám. Vážnym klinickým problémom sa stali tzv. širokospektrálne β -laktamázy ESBL a AmpC typu a to hlavne kvôli možnému zlyhaniu liečby pri použití oxyimino-cefalosporínov ako terapeutickým prípravkov.

Jedným z cieľov práce bola analýza enterobaktérií s produkciou širokospektrálnych β -laktamáz v humánnej oblasti, so zameraním na genetickú charakterizáciu prítomných enzýmov.

V priebehu 5 mesiacov sa sledovala prevalencia ESBL-pozitívnych kmeňov *Klebsiella pneumoniae* na Klinike anesteziológie a resuscitácie Fakultnej nemocnice v Olomouci. Za dané obdobie dosiahla hodnotu 19 %, pričom zaznamenané boli iba SHV typu ESBL, konkrétne šlo o SHV-2, SHV-2a a SHV-12 enzýmy. Pomocou PFGE sa potvrdila prítomnosť 11 (z celkového počtu 13) rôznych ESBL-pozitívnych kmeňov.

Z výsledkov štúdie realizovanej na Hemato-onkologickej klinike Fakultnej nemocnice v Olomouci za trojmesačné obdobie vyplýva, že bolo zachytených 7 AmpC pozitívnych kmeňov *Klebsiella pneumoniae* s produkciou DHA-typu cefalosporináz, pričom výsledok bol potvrdený fenotypovými aj genetickými metódami.

Sledovaná prevalencia ESBL-pozitívnych enterobaktérií v gastrointestinálnom trakte hospitalizovaných pacientov a osôb z komunitného prostredia Olomouckého kraja dosiahla za

obdobie 1 roka hodnotu 1,5 a 1,2 %. Najčastejšie izolovanými boli kmene *Escherichia coli* s produkciou CTX-M-15 β -laktamázy, u ktorých však nebola zistená genetická príbuznosť, šlo teda o kmene s jedinečným restriktčným profilom.

Výsledky tiež poukazujú na záchyt AmpC-pozitívnych enterobaktérií z rektálnych výterov chorých a zdravých osôb, pričom ich prevalencia dosiahla podobne ako v predchádzajúcom prípade nízke hodnoty, a to 0,9 a 1 %. U kmeňov *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli* šlo o výskyt plazmidovo-kódovaných enzýmov (DHA a CIT typu), zatiaľ čo u druhov *Enterobacter cloacae* a *Citrobacter freundii* sa predpokladá, že *ampC* gén bude prítomný na chromozóme.

Z klinického materiálu pacientov hospitalizovaných na Novorodeneckom oddelení Fakultnej nemocnice v Olomouci bolo v priebehu 5 mesiacov zachytených celkovo 8 kmeňov enterobaktérií s produkciou AmpC typu širokospektrálnych β -laktamáz (CIT, EBC a DHA typ). S využitím PCR a priameho sekvenovania boli u kmeňa *Escherichia coli* potvrdené jednonukleotidové mutácie v pozíciách -88, -82, -42, -18, -1 a +58, vedúce k nadprodukcii AmpC enzýmov u daného druhu.

Ďalším cieľom práce bolo stanovenie výskytu enterobaktérií produkujúcich širokospektrálne β -laktamázy v animálnej oblasti, konkrétne šlo o zmesové vzorky slepých čriev brojlerov a kloakálne výtery moriek, odobrané z rôznych fariem v Českej republike. Celkovo boli zaznamenané 4 ESBL-pozitívne kmene *Escherichia coli* s produkciou SHV-12, CTX-M-1 alebo CTX-M-14 enzýmu a 2 kmene rovnakého species, u ktorých sa potvrdil výskyt *bla*_{CMY-2} génu kódujúceho produkciu CMY-2 β -laktamázy.

Jedným z výsledkov predloženej práce bolo navrhnutie metodiky využívajúcej multiplex PCR a analýzu krivky topenia DNA s vysokým rozlíšením, ktorá umožnila amplifikáciu troch génov (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M}) kódujúcich produkciu bakteriálnych β -laktamáz v jednej reakcii a ich následnú identifikáciu. Jej výhoda spočíva v spracovaní pomerne veľkého množstva klinických izolátov súčasne, pričom zároveň umožňuje rozlíšiť medzi jednotlivými skupinami CTX-M enzýmov bez použitia ďalšej techniky. Jednou z nevýhod je, že neumožňuje rozlíšiť medzi prítomným enzýmom s úzkym a so širokým spektrom účinku (pre TEM a SHV typy). Malé nedostatky je tiež vidieť v nedostatočnom množstve kmeňov s produkciou všetkých typov β -laktamáz, keďže metóda bola prednostne zameraná na kmene s produkciou CTX-M enzýmov. Tieto nedostatky by sa však dali ďalšími analýzami v budúcnosti odstrániť.

Nová technika bola následne použitá na genetickú charakterizáciu ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* z jednotiek intenzívnej starostlivosti troch veľkých českých

nemocníc (Krajskej nemocnice Tomáša Baťu v Zlíne, Fakultnej nemocnice v Ostrave a Fakultnej nemocnice v Olomouci) za obdobie jedného roka. Z analýzy vyplynulo, že najčastejšie detegovaným typom bola CTX-M-15 β -laktamáza, často spolu TEM-1, enzýmom s úzkym spektrom účinku. CTX-M-9 skupina bola reprezentovaná CTX-M-27 a CTX-M-9 β -laktamázami. V jednom prípade bol zaznamenaný TEM typ ESBL, TEM-12 a to u kmeňa z Internej kliniky Fakultnej nemocnice v Olomouci. Prítomnosť *bla_{SHV}* génu bola potvrdená len u niekoľkých vzoriek, výsledkom čoho bola produkcia SHV-1 alebo SHV-12 enzýmu.

Bolo zaznamenané klonálne šírenie ESBL-pozitívnych kmeňov *Escherichia coli* na jednotkách intenzívnej starostlivosti Krajskej nemocnice Tomáša Baťu v Zlíne, vo Fakultnej nemocnici v Ostrave a vo Fakultnej nemocnici v Olomouci. Ani v jednom zdravotníckom zariadení však nebol pozorovaný prenos rezistentných baktérií medzi jednotlivými oddeleniami.

S využitím PCR sa potvrdil výskyt mobilných genetických elementov, inzerčných sekvencií *ISEcp1* a *IS26* v tzv. upstream pozícii *bla_{CTX-M}* génu u klinických izolátov získaných z jednotiek intenzívnej starostlivosti troch českých nemocníc. Tieto elementy sa mnohokrát nachádzajú v tesnej blízkosti spomínaného génu a sú zodpovedné za jeho mobilizáciu a expresiu.

Pomocou konjugačných experimentov bol úspešne prenesený gén kódujúci produkciu CTX-M-9 β -laktamázy z 2 klinických izolátov *Escherichia coli* od pacientov z jednotky intenzívnej starostlivosti Fakultnej nemocnice v Olomouci do kmeňa *Escherichia coli* citlivého na cefotaxim (cefalosporín so širokým spektrom účinku). Následná typizácia prenášaných plazmidov zaznamenala výskyt FIB a FII replikónu. Stanovenie výskytu a počtu plazmidov u jednotlivých klinických izolátov bolo skôr orientačné a bude cieľom ďalších experimentov.

8 SUMMARY

One of the most serious global health care issues is increasing bacterial resistance to antimicrobial agents. The major reason is possible treatment failure in case these resistant bacteria are etiological agents of serious infections. This can lead to further infectious complications, prolonged hospital stay or even the patient's death. Early and especially correct detection of the present infectious agents along with determination of antimicrobial susceptibility or resistance is crucial for adequate antimicrobial therapy.

The ability of bacterial population to withstand the inhibition concentration of a group of antibiotics may be either intrinsic (primary) or acquired (secondary). However, from a therapeutic point of view, acquired resistance is much more important and significant because of the possible spread of resistant genes through a sensitive microbial population. The reason is that these genes may be collected on a variety of gene transfer systems, such as bacterial conjugative plasmids, transposable elements that move the genes responsible for antibiotic resistance from one DNA system to another and from a resistant bacterial cell to a sensitive one.

In Gram-negative bacteria, beta-lactamase production represents the most important mechanism of resistance to beta-lactam antibiotics. Broad-spectrum beta-lactamases (ESBL and AmpC types) have become a serious clinical problem resulting from possible treatment failure when oxyimino-cephalosporins are used.

One of the aims of this work was the analysis of enterobacteria with the production of extended-spectrum beta-lactamases in humans, focusing on genetic characterization of present enzymes. Over a 5-month period, the prevalence of ESBL-positive strains of *Klebsiella pneumoniae* was studied at the Department of Anesthesiology and Resuscitation of the University Hospital in Olomouc and it was found to be 19.4%. Only SHV-types of ESBLs were detected (SHV- 2, SHV-2a and SHV-12). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) confirmed the presence of 11 (from a total number of 13) different ESBL-positive strains.

The results of a study carried out at the Department of Hemato-Oncology of the University Hospital Olomouc revealed the acquisition of 7 AmpC-positive strains of *Klebsiella pneumoniae* producing the DHA-type of cephalosporinases. Both phenotypic and genetic methods were used for confirmation of the results.

Over a period of one year, the prevalence of ESBL-positive enterobacteria in the gastrointestinal tracts of persons from both hospital and community settings of the Olomouc

region was found to be 1.5% and 1.2%, respectively. The majority of all isolates were *Escherichia coli* strains producing CTX-M-15 beta-lactamase. The PFGE analysis revealed the presence of strains with unique restriction profiles, no genetic relatedness was identified.

The study also determined the prevalence of AmpC-positive enterobacteria isolated from rectal swabs of patients and healthy subjects. As in the previous case, the prevalence rates were low, only reaching 0.9% and 1%, respectively. Plasmid-mediated enzymes (DHA and CIT types) were identified in *Klebsiella pneumoniae* strains, whereas in *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*, we suggest that the *ampC* gene would be chromosomally encoded.

Over a period of 5 months, a total of 8 strains of enterobacteria producing AmpC extended-spectrum beta-lactamases (CIT, EBC and DHA types) were found in clinical samples collected from children hospitalized at the Department of Neonatology of the University Hospital Olomouc. Using PCR techniques and direct sequencing, point mutations at positions -88, -82, -42, -18 and +58 were detected in *Escherichia coli* strain causing high-level AmpC production.

The other aim of the work was to assess the prevalence of enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases in animals, in composite samples of broiler caecum contents and turkey cloacal swabs collected at approved poultry slaughterhouses in the Czech Republic. The prevalence of 4 ESBL-positive *Escherichia coli* strains with the production of SHV-12 or CTX-M-14 enzymes and 2 strains of the same species with *bla*_{CMY-2} gene encoding CMY-2 beta-lactamase was noted.

One of our outcomes was the development of a rapid detection system consisting of multiplex PCR and high-resolution melting curve analysis to amplify and identify three genes (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M}) encoding the production of bacterial beta-lactamases in a single reaction. The advantage of this method is that it may be used to screen a large number of clinical isolates at the same time. This technique allows differentiation between single CTX-M clusters without the need for other methods. One limitation is that the method is unable to distinguish between ESBL and non-ESBL enzymes (for TEM and SHV types). The other limitation is a lack of some enzyme types because the technique was predominantly focused on strains producing CTX-M beta-lactamases. However, we suppose that these limitations could be removed by additional analyses in the future.

After its development, the new detection system was used for genetic characterization of ESBL-positive *Escherichia coli* isolates from ICUs of three Czech hospitals collected within a one-year period. CTX-M-15 beta-lactamase was identified as the most prevalent

type, often along with TEM-1, an enzyme with narrow spectrum activity. The CTX-M-9 group was represented by CTX-M-27 and CTX-M-9 enzymes. One strain from the Department of Internal Medicine harbored TEM-type ESBL (TEM-12). The presence of the *bla*_{SHV} gene was confirmed only in several samples, resulting in production of the SHV-1 or SHV-12 enzyme.

The clonal spread of ESBL-positive *Escherichia coli* strains was noticed at the ICUs of the Regional Baťa Hospital in Zlín, Institute of Public Health in Ostrava and University Hospital in Olomouc. No transfer of resistant bacteria among different departments in the same hospital was noted.

Using PCR method, mobile genetic elements, insertion sequences *ISEcp1* and *IS26* were detected upstream of the *bla*_{CTX-M} gene in clinical isolates from ICUs. These elements are often found in the vicinity of the above mentioned gene and are involved in its mobilization and expression.

The *bla*_{CTX-M-9} gene was successfully transferred from 2 clinical isolates of *Escherichia coli* from a patient hospitalized at the ICU of the University hospital in Olomouc to a *Escherichia coli* host susceptible to cefotaxime (cephalosporin with extended-spectrum activity). Replicon typing of transferring plasmids detected the presence of the FIB and FII replicons. The determination of the presence and total number of plasmids in single clinical isolates was only informative and will be analyzed in one of the future experiments.

9 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. Todar K. Todar's online textbook of bacteriology [online]. 2008 [citované 3. júna 2010]. Dostupné z: <http://textbookofbacteriology.net>.
2. Levy S.B. The antibiotic paradox: how the misuse of antibiotics destroys their curative powers. 2nd ed. Cambridge, MA: Perseus Publishing, 2002.
3. Shnayerson M., Plotkin M.J. The killers within. Boston, MA: Little, Brown and Co, 2002.
4. Kolář M., Látal T., Čermák P. Klinicko-mikrobiologické podklady racionální antibiotické léčby. Trios, Praha, 2002.
5. Woodford N., Ellington M.J. The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:5-18.
6. Bennett P.M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 2008;153 Suppl 1:S347-357.
7. Mariam D.H. Effect of *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1289-1294.
8. Lambert P.A. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:1471-1485.
9. Walsh C. Antibiotics: action, origins, resistance. Washington, DC: ASM Press, 2003.
10. Jayaraman R. Antibiotic resistance: an overview of mechanisms and a paradigm shift. *Curr Sci India* 2009;96:1475-1484.
11. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003;67:593-656.
12. Delcour A.H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta* 2009;1794:808-818.
13. Anathan S., Subha A. Cefoxitin resistance mediated by a loss of porin in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Indian J Med Microbiol* 2005; 23:20-23.
14. Weber S., Pfaller M.A., Herwaldt L.A. Role of molecular epidemiology in infection control. *Infect Dis Clin North Am* 1997;11:257-278.
15. Majiduddin F.K., Materon I.C., Palzkill T.G. Molecular analysis of β -lactamase structure and function. *Int J Med Microbiol* 2002;292:127-137.

16. Massova I., Mobashery S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1-17.
17. Bush K., Jacoby G.A. Medeiros A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-1233.
18. Ambler R.P. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980;289:321-331.
19. Paterson D.L., Bonomo R.A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:657-686.
20. Giamarellou H. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria that produce extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect* 2005;11:1-16.
21. Al-Jasser A.M. Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs): A global problem. *Kuwait Med J* 2006;38:171-185.
22. Taşlı H., Bahar I.H. Molecular characterization of TEM and SHV derived extended-spectrum β -lactamases in hospital-based *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2005;58:162-167.
23. Canton R., Novais A., Valverde A., et al. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:144-153.
24. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1-14.
25. Bauernfeind A., Grimm H., Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 1990;18:294-298.
26. Munday C.J., Whitehead G.M., Todd N.J., Campbell M., Hawkey P.M. Predominance and genetic diversity of community- and hospital-acquired CTX-M extended-spectrum β -lactamases in York, UK. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:628-633.
27. Woodford N., Ward M.E., Kaufmann M.E. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended spectrum β -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:735-743.
28. Bradford P.A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:933-951.

29. Winokur P.L., Cantón R., Casellas J.M., Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis* 2001;32:94-103.
30. Poole K. Resistance to β -lactam antibiotics. *CMLS* 2004;61:2200-2223.
31. Jacoby G.A. AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009;22:161-182.
32. Kolář M. Klinický význam širokospektrých β -laktamáz a zkušnosti s jejich identifikací v mikrobiologické praxi. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* 2007;13:195-205.
33. Cockerill F.R. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:199-212.
34. Fluit A.C., Visser M.R., Schmitz F.J. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:836-871.
35. Sundsfjord A., Simonsen G.S., Haldorsen B.C, et al. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. *APMIS* 2004;112:815-837.
36. Milatovic D., Braveny I. Development of resistance during antibiotic therapy. *Eur J Clin Microbiol* 1987;6:234-244.
37. Huovinen S., Huovinen P., Jacoby G.A. Detection of plasmid-mediated β -lactamases with DNA probes. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:175-179.
38. Tham T.N., Mabilat C., Courvalin P., Guesdon J.L. Biotinylated oligonucleotide probes for the detection and the characterization of TEM-type extended broad spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol Lett* 1990;69:109-116.
39. Arlet G., Philippon A. Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable β -lactamases (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiol Lett* 1991;68:19-25.
40. Fujita K., Silver J. Single-strand conformational polymorphism. *Genome Res* 1994; 4:S137-S140.
41. Rapley R, editor. *The nucleic acid protocols. Handbook*. New Jersey: Humana Press Inc, 2000.
42. M'Zali F.H., Heritage J., Gascoyne-Binzi D.M., Snelling A.M., Hawkey P.M. PCR single strand conformational polymorphism can be used to detect the gene encoding SHV-7 extended-spectrum β -lactamase and to identify different SHV genes within the same strain. *J Antimicrob Chemother* 1998;41:123-125.

43. Chanawong A., M'Zali F.H., Heritage J., Lulitanond A., Hawkey P.M. Characterisation of extended-spectrum β -lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *FEMS Microbiol Lett* 2000;184:85-89.
44. Arlet G., Brami G., Décrè D., et al. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM β -lactamases. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 134:203-208.
45. Kim J., Hoan-Jong L. Rapid discriminatory detection of genes coding for SHV β -lactamases by ligase chain reaction. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1860-1864.
46. Beginners guide to high resolution melt (HRM) analysis [online]. 2009 [citované 15. júna 2010]. Dostupné z: <http://www.gene-quantification.de/hrm-beginners-guide.pdf>.
47. HRM-High Resolution Melt (1) [online]. 2009 [citované 15. júna 2010]. Dostupné z: <http://www.gene-quantification.de/hrm.html#introduction>.
48. Randegger C.C., Hächler H. Real-time PCR and melting curve analysis for reliable and rapid detection of SHV extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1730-1736.
49. Chia J.H., Chu C., Su L.H., et al. Development of multiplex PCR and SHV melting-curve mutation detection system for detection of some SHV and CTX-M β -lactamases of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2005;43:4486-4491.
50. Birkett C.I., Ludlam H.A., Woodford N., et al. Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *J Med Microbiol* 2007;56:52-55.
51. Timothy J.A. DNA microarrays in medical practice. *BMJ* 2001;323:611-615.
52. Grimm V., Ezaki S., Susa M., et al. Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM β -lactamases that confer resistance. *J Clin Microbiol* 2004;42:3766-3774.
53. Woodford N., Sundsfjord A. Molecular detection of antibiotic resistance: when and where? *J Antimicrob Chemother* 2005;56:259-261.
54. Tuomanen E., Lindquist S., Sande S., et al. Coordinate regulation of β -lactamases induction and peptidoglycal composition by the *amp* operon. *Science* 1991;251:201-204.

55. Kuga A., Okamoto R., Inoue M. *ampR* gene mutations that greatly increase class C β -lactamase activity in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:561-567.
56. Corvec S., Prodhomme A., Giraudeau C., et al. Most *Escherichia coli* strains overproducing chromosomal AmpC β -lactamase belong to phylogenetic group A. *J Antimicrob Chemother* 2007;872-876.
57. Yu W., Bing L., Zhenhua L. AmpC promoter and attenuator mutations affect function of three *Escherichia coli* strains. *Curr Microbiol* 2009;59:244-247.
58. Willard K.E., Moody J.A., Peterson L.R. A general *ampC* active site oligonucleotide probe for Gram-negative rods. *Mol Cell Probes* 1991;5:97-102.
59. Pérez-Pérez F.J., Hanson N. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:2153-2162.
60. Zhu L.X., Zhang Z.W., Liang D, et al. Multiplex asymmetric PCR-based oligonucleotide microarray for detection of drug resistance genes containing single mutations in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3707-3713.
61. Livermore D.M., Paterson D.L. Pocket guide to extended spectrum β -lactamases in resistance. Spain: Current Medicine Group Ltd; 2006.
62. Knothe H., Shah P., Krcmery V., Antal M., Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983;11:315-317.
63. Hanson N.D. AmpC β -lactamases: what we need to know for the future? *J Antimicrob Chemother* 2003;52:2-4.
64. Carattoli A., Bertini A., Villa L., et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005;63:219-228.
65. Schmitt J., Jacobs E., Schmidt H. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* from patients of two hospitals in Saxony, Germany. *J Med Microbiol* 2007;56:241-249.
66. Jacoby G.A., Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:164-169.
67. Miranda G., Castro N., Leños B., et al. Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing SHV-5 extended spectrum β -lactamase in a Mexican pediatric hospital. *J Clin Microbiol* 2004;42:30-35.

68. Lévesque C., Piché L., Larose C., Roy P.H. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:185-191.
69. Machado E., Cantón R., Baquero F. Integron content of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1823-1829.
70. Jones L.A., McIver C.J., Kim M.J., Rawlinson W.D., White P.A. The *aadB* gene cassette is associated with *bla_{SHV}* genes in *Klebsiella pneumoniae* species producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:794-797.
71. Eckert C., Gautier V., Arlet G. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla_{CTX-M}* genes. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:14-23.
72. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18:426-439.
73. Foxman B., Riley L. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am J Epidemiol* 2001;153:1135-1141.
74. Weber S., Pfaller M.A., Herwaldt L.A. Role of molecular epidemiology in infection control. *Infect Dis Clin North Am* 1997;11:257-278.
75. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2007;M100-S16
76. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. EUCAST discussion document E. Dis. 5.1. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:1-7.
77. Yagi T., Wachino J., Kurokawa H., et al. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2005;43:2551-2558.
78. Pagani L., Dell'Amico E., Migliavacca R., et al. Multiple CTX-M type extended-spectrum β -lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in northern Italy. *J Clin Microbiol* 2003;41:4264-4269.

79. Steward C.D., Rasheed J.K., Hubert S.K., et al. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum β -lactamase detection methods. *J Clin Microbiol* 2001;39:2864-2872.
80. Shi Z.Y., Liu P.Y.F., Lau Y.J., Lin Y.H., Hu B.S. Epidemiological typing of isolates from an outbreak of infection with multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* by repetitive extragenic palindromic unit b1-primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1996;34:2784-2790.
81. Eckert C., Gautier V., Saldin-Allard M., et al. Dissemination of CTX-M-type β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1249-1255.
82. Osborn A.M., Tatley M.S., Steyn L.M., Pickup R.W., Saunders J.R. Mosaic plasmids and mosaic replicons: evolutionary lessons from the analysis of genetic diversity in IncFII-related replicons. *Microbiology* 2000;146:2267-2275.
83. Babini G.S., Livermore D.M. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:183-189.
84. Hanberger H., Garcia-Rodriguez J.A., Gobernado M., et al. Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. French and Portuguese ICU Study Groups. *JAMA* 1999;281:67-71.
85. Kolář M., Látal T., Čermák P., et al. Prevalence ESBL-pozitivních kmenů *Klebsiella pneumoniae* v České republice a jejich molekulárně-biologická analýza. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* 2005;11:92-99.
86. Paterson D.L., Hujer K.M., Hujer A.M., et al. Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type β lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3354-3360.
87. Hopkins K.L., Batchelor M.J., Liebana E., Deheer-Graham A.P., Threlfalle E.J. Characterisation of CTX-M and AmpC genes in human isolates of *Escherichia coli* identified between 1995 and 2003 in England and Wales. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28:180-192.
88. Valverde A., Coque T.M., Sanchez-Moreno M.P., et al. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing

- Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. J Clin Microbiol 2004;4769-4775.
89. Kassis-Chikhani N.S., Vimont S., Asselat K., et al. CTX-M β -lactamase-producing *Escherichia coli* in long-term care facilities, France. Emerg Infect Dis 2004;10:1697-1698.
90. Lartigue M.F., Fortineau N., Nordmann P. Spread of novel expanded-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in a university hospital in the Paris area, France. Clin Microbiol Infect 2005;11:1588-1591.
91. Leflon-Guibout V.C., Jurand C., Banacorsi S., et al. Emergence and spread of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:3736-3742.
92. Fang H., Atakem F., Hedin G., Dornbusch K. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. J Clin Microbiol 2008;46:707-712.
93. Abraham E.P., Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. Rev Infect Dis 1988;10:677-678.
94. Kaye K.S., Cosgrove S., Harris A., Eliopoulos G.M., Carmeli Y. Risk factors for emergence of resistance to broad-spectrum cephalosporins among *Enterobacter* spp. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2628-2630.
95. Choi S.H., Lee J.E., Park S.J., et al. Emergence of antibiotic resistance during therapy for infections caused by *Enterobacteriaceae* producing AmpC β -lactamase: implications for antibiotic use. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:995-1000.
96. Bauernfeind A., Chong Y., Schweighart S. Extended broad spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. Infection 1989;17:316-321.
97. Papanicolau G.A., Medeiros A.A., Jacoby G.A. Novel plasmid-mediated β -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy β -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1990;34:2200-2209.
98. Čekanová L., Kolář M., Chromá M., et al. Prevalence of ESBL-positive bacteria in the community in the Czech Republic. Med Sci Monit 2009;15:BR202-BR206.

99. Empel J., Hrabák J., Kozińska A., et al. DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Teaching Hospital in the Czech Republic. *Microb Drug Resist* 2010 Jul 12 [Epub ahead of print].
100. Pai H., Kang C.I., Byeon J.H., et al. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3720-3728.
101. Gaillot O., Clement C., Simonet M., Philippon A. Novel transferable β -lactam resistance with cephalosporinase characteristics in *Salmonella enteritidis*. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:85-87.
102. Caroff N., Espaze E., Gautreau D., Richet H., Reynaud A. Analysis of the effects of -42 and -32 *ampC* promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:783-788.
103. Fernández-Cuenca F., Pascual A., Martínez-Martínez L. Hyperproduction of AmpC β -lactamase in clinical isolate of *Escherichia coli* associated with a 30 bp deletion in the attenuator region of *ampC*. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:251-252.
104. Bogaerts P., Rodriguez-Villalobos H., Laurent C., et al. Emergence of extended-spectrum AmpC-expressing *Escherichia coli* isolates in Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:1073-1075.
105. Schwarz S. GERMAP 2008. Resistance monitoring in Germany. Antibiotic use and occurrence of resistance in veterinary medicine. (prednáška) Helsinki: ESCMID, 15-19. mája 2009.
106. Batchelor M., Threlfall E.J., Liebana E. Cephalosporin resistance among animal-associated Enterobacteria: a current perspective. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2005;3:403-417.
107. Carattoli A. Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase producers. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:117-123.
108. Matsumoto Y., Ikeda F., Kamimura T., Yokota Y., Mine Y. Novel plasmid-mediated β -lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:1243-1246.
109. Miriagou V., Tassios P.T., Legakis N.J., Tzouvelekis L.S. Expanded-spectrum cephalosporin resistance in nontyphoid *Salmonella*. *Int J Antimicrob Agents* 2004;23:547-555.

110. Smet A., Martel A., Persoon D., et al. Diversity of extended-spectrum β -lactamases and class C β -lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;4:1238-1243.
111. Blanc V., Mesa R. Saco M., et al. ESBL- and plasmidic class C β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from poultry, pig, and rabbit farms. *Vet Microbiol* 2006;118:299-304.
112. Gray J.T., Hungerford L.L., Fedorka-Cray P.J, Headrick M.L. Extended-spectrum-cephalosporin resistance in *Salomonella enterica* isolates of animal origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3179-3181.
113. Winokur P.L., Brueggemann A., DeSalvo D.L., et al. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2777-2783.
114. Winokur P.L., Vonstein D.L., Hoffman L.J., Uhlenhopp E.K., Doern G.V. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC β -lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and human. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2716-2722.
115. Fey P.D., Safranek T.J., Rupp M.E., et al. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. *N Engl J Med* 2000;342:1242-1249.
116. Bardoň J., Kolář M., Chromá M. Izolace kmenů *Escherichia coli* s produkcí širokospektrých β -laktamáz. *Veterinářství* 2009;3:152-155.
117. Kolář M., Bardoň J., Chromá M., et al. ESBL and AmpC β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in poultry in the Czech Republic. *VET MED* 2010;55:119-124.
118. Winding W. „One World – One Health“. *Healthy Animals = Healthy People*. (prednáška) Helsinki: ESCMID, 15-19. mája 2009.
119. Pimkin M., Edelstein M. Improved PCR detection and subtyping of CTX-M β -lactamase-encoding genes. Poster prezentovaný na: 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2004 May 1-4; Prague, Czech Republic.
120. Zhanel G.G., DeCorby M., Nichol K.A., et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in intensive care units in Canada: Results of the Canadian National Intensive care unit (CAN-ICU) study (2005-2006). *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2008;19:243-249.

121. Lavollay M., Mamlouk K., Frank T., et al. Clonal dissemination of a CTX-M-15 β -lactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris area, Tunis and Bangui. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2433-2438.
122. Wu T.L., Chia J.H., Su L.H., et al. Dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in intensive care units of a medical center in Taiwan. *Microb Drug Resist* 2006;12:203-209.
123. Cantón R., Coque T. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:466-475.
124. Diestra K., Juan C., Curiao T, et al. Characterization of plasmids encoding *bla*_{ESBL} and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2008;63:60-66.
125. Stapleton P.D., Abstr. 39th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 1457, 1999
126. Saladin M., Cao V.T.B., Lambert T., et al. Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett* 2002;209:161-168.
127. Lartigue M.F., Poirel L., Nordmann P. Diversity of genetic environment of *bla*_{CTX-M} genes. *FEMS Microbiol Lett* 2004;234:201-207.
128. Cao V., Lambert T., Courlin P. CoIE1-like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum β -lactamase CTX-M-17. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1212-1217.
129. Kariuku S., Corkill J.E., Revathi G., Musoke R., Hart C.A. Molecular characterization of a novel plasmid-encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2141-2143.
130. Pai H., Choi E.H., Lee H.J., Hong J.Y., Jacoby G.A. Identification of CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *J Clin Microbiol* 2001;39:3747-3749.
131. Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:2227-2238.
132. García-Fernández A., Chiaretto G., Bertini A., et al. Acquisition and diffusion of *bla*_{CTX-M-9} gene by R478-IncHI2 derivative plasmids. *FEMS Microbiol Lett* 2007;271:71-77.

133. Marcadé G., Deschamps C., Boyd A., et al. Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. J Antimicrob Chemother 2009;63:67-71.

10 PUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY

10.1 Publikácie v časopisoch s impakt faktorom

1. Kolář M., Sauer P., Faber E., Kohoutová J., Štosová T., Sedláčková M., Chromá M., Koukalová D., Indrák K. Prevalence and spread of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* strains in patients with hematological malignancies. *New Microbiol* 2009; 32:67-76. (IF 0,956)
2. Čekanová L., Kolář M., Chromá M., Sauer P., Sedláčková M., Koukalová D. Prevalence of ESBL-positive bacteria in the community in the Czech Republic. *Med Sci Monit* 2009; 15:202-206. (IF 1,607)
3. Kolář M., Bardoň J., Chromá M., Hricová K., Štosová T., Sauer P., Koukalová D. ESBL and AmpC β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in poultry in the Czech Republic. *VET MED* 2010;55:119-124. (IF 0,659)

10.2 Publikácie v recenzovaných časopisoch bez impakt faktoru

1. Chromá M., Kolář M., Sauer P., Marek O., Koukalová D. Molekulárno-biologická analýza ESBL-pozitívnych izolátov *Klebsiella pneumoniae* od pacientov v intenzívnej starostlivosti. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* 2007;13:206-211.
2. Chromá M., Kolář M., Sauer P., Faber E., Štosová T., Koukalová D., Indrák K. Výskyt AmpC-pozitívnych kmeňov *Klebsiella pneumoniae* u pacientov s hematologickým ochorením. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* 2008;14:173-177.
3. Bardoň J., Kolář M., Chromá M. Izolace kmenů *Escherichia coli* s produkci širokospektrých beta-laktamáz u drůbeže na Moravě. *Veterinářství* 2009;3:152-155.
4. Kolář M., Hanulík V., Chromá M. Effect of tigecycline on selected multiresistant bacteria. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* 2009;15:4-6.
5. Chromá M., Kolář M. Genetic methods for detection of antibiotic resistance, focus on extended-spectrum β -lactamases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, in press.

10.3 Prednášky a postery s abstraktom

1. Chromá M., Sauer P. Možnosti molekulárno-biologických metód v diagnostike ESBL pozitívnych enterobaktérií. Seminár SLM ČLS JEP. Praha, 2007.
2. Chromá M., Sauer P., Kolář M. Molekulárno-biologická typizácia širokospektrých β -laktamáz AmpA. XVI. Konferencie mladých mikrobiológů TOMÁŠKOVY DNY. Brno, 2007.
3. Chromá M., Sauer P., Kolář M. Výskyt jednotlivých typov ESBL vo FN Olomouc. XV. Moravsko - slovenské mikrobiologické dny. Ostravice, 2007.
4. Chromá M., Sauer P., Kolář M. Molekulárno-biologická analýza ESBL-pozitívnych enterobaktérií vo FN Olomouc. XII. Konferencie mladých mikrobiológů TOMÁŠKOVY DNY. Brno, 2008.
5. Chromá M., Sauer P., Štosová T., Kolář M. Molekulárno-biologická analýza vybraných gramnegatívnych baktérií a jej praktické využitie. XII. Česko-slovenský kongres o infekčných nemocech. Ústí nad Labem, 2008.
6. Chromá M., Kolář M., Sauer P., Faber E., Štosová T., Koukalová D. Molekulárna charakterizácia izolátov enterobaktérií s produkciou transferabilných AmpC β -laktamáz. Moravsko-slovenské mikrobiologické dni. Tatranská Lomnica, 2008.
7. Chromá M., Sauer P., Kolář M. Výskyt kmeňov *Klebsiella pneumoniae* s produkciou ESBL a AmpC vo Fakultnej nemocnici Olomouc. Konferencie vedeckých prací studentů DSP. Olomouc, 2008.
8. Chromá M., Kolář M. Význam molekulárno-biologických metód pre epidemiológiu bakteriálnej rezistencie. Celostátní sjezd mikrobiologie a epidemiologie 2008. Olomouc, 2008.
9. Chromá M., Kolář M., Čekanová L., Štosová T., Sauer P. Characterization of CTX-M-positive isolates of *Enterobacteriaceae* using real-time PCR and melting curve analysis. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Helsinki, 2009.
10. Janečková M., Janeček M., Chromá M., Pospíšilová K., Štosová T., Kolář M. Charakteristika ESBL-a AmpC- pozitívnych enterobaktérií z pohľadu fenotypu a genotypu. 13. pracovní setkání „ Antibiotická politika“: Gynekologické infekce, některé aspekty antibiotické léčby v intenzivní péči. Soláň, 2009.

11. Pospíšilová 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.
12. Chromá M., Kolář M., Hricová K., Čekanová L., Sauer P., Koukalová D. Molekulárno-biologická charakterizácia ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli*. Kongres klinické mikrobiologie a infekčních nemocí (2.ročník) / XVII. Moravsko-slovenské mikrobiologické dny. Olomouc, 2009.
13. Kolář M., Kantor L., Chromá M., Hricová K. Nozokomiální infekce z pohledu mikrobiologa a klinika. XXV. Neonatologické dny. Luhačovice, 2009.
14. Husičková V., Chromá M., Hricová K., Sauer P. Genetická detekce rezistence u bakteriálních původců sepsí. 14. pracovní setkání „Antibiotická politika“ : ATB léčba v intenzivní medicíně. Soláň, 2010.
15. Htoutu-Sedláková M., Hanulík V., Chromá M., Kolář M., Schaumann A., Rodloff A.C. The potential of phenotypic methods for detection of ESBL and AmpC broad-spectrum β -lactamases. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Vienna, 2010.
16. 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. 25. výročný kongres ČSSM 2010. Stará Lesná, 2010.

11 ZOZNAM TABULIEK, OBRÁZKOV, GRAFOV A POUŽITÝCH SKRATIEK

11.1 Zoznam tabuliek

- Tabuľka 1:** Použité oligonukleotidové primery na detekciu *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} a *bla*_{OXA} génov
- Tabuľka 2:** Zloženie reakčnej zmesi na detekciu *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} a *bla*_{OXA} génov
- Tabuľka 3:** Reakčné podmienky na detekciu *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} a *bla*_{OXA} génov
- Tabuľka 4:** Použité oligonukleotidové primery na detekciu plazmidovo-kódovaných AmpC β-laktamáz
- Tabuľka 5:** Zloženie reakčnej zmesi na detekciu plazmidovo-kódovaných AmpC β-laktamáz
- Tabuľka 6:** Reakčné podmienky na detekciu plazmidovo-kódovaných AmpC β-laktamáz
- Tabuľka 7:** Použité oligonukleotidové primery na detekciu *ampC* génu
- Tabuľka 8:** Zloženie reakčnej zmesi na detekciu *ampC* génu
- Tabuľka 9:** Reakčné podmienky na detekciu *ampC* génu
- Tabuľka 10:** Zoznam zbierkových kontrolných kmeňov so známym obsahom β-laktamáz
- Tabuľka 11:** Použité oligonukleotidové primery na detekciu *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M} génov pomocou multiplex PCR
- Tabuľka 12:** Zloženie reakčnej zmesi na detekciu *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M} génov pomocou multiplex PCR
- Tabuľka 13:** Reakčné podmienky na detekciu *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M} génov pomocou multiplex PCR
- Tabuľka 14:** Použité oligonukleotidové primery na detekciu inzerčných sekvencií
- Tabuľka 15:** Zloženie reakčnej zmesi na detekciu inzerčných sekvencií
- Tabuľka 16:** Reakčné podmienky na detekciu inzerčných sekvencií
- Tabuľka 17:** Použité oligonukleotidové primery na typizáciu plazmidov
- Tabuľka 18:** Zloženie reakčnej zmesi na typizáciu plazmidov
- Tabuľka 19:** Reakčné podmienky na typizáciu plazmidov

- Tabuľka 20:** Výsledky PCR, restriktívnej analýzy a priameho sekvenovania u ESBL-pozitívnych izolátov *Klebsiella pneumoniae* od pacientov v intenzívnej starostlivosti
- Tabuľka 21:** Výsledky PCR, restriktívnej analýzy a priameho sekvenovania u ESBL-pozitívnych enterobaktérií z gastrointestinálneho traktu chorých osôb
- Tabuľka 22:** Výsledky PCR u AmpC-pozitívnych enterobaktérií z gastrointestinálneho traktu chorých osôb
- Tabuľka 23:** Výsledky PCR, restriktívnej analýzy a priameho sekvenovania u ESBL-pozitívnych enterobaktérií z gastrointestinálneho traktu zdravých osôb
- Tabuľka 24:** Výsledky PCR u AmpC-pozitívnych enterobaktérií z gastrointestinálneho traktu zdravých osôb
- Tabuľka 25:** Výsledky PCR u AmpC-pozitívnych enterobaktérií u novorodencov
- Tabuľka 26:** Stanovenie typu prítomnej β -laktamázy u ESBL- a AmpC-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* z animálnej oblasti
- Tabuľka 27:** Výsledky analýzy krivky topenia a priameho sekvenovania u klinických izolátov z JIS v KNTB
- Tabuľka 28:** Výsledky analýzy krivky topenia a priameho sekvenovania u klinických izolátov z JIS vo FNO
- Tabuľka 29:** Výsledky analýzy krivky topenia a priameho sekvenovania u klinických izolátov z JIS vo FNOL
- Tabuľka 30:** Detekcia inzerčných sekvencií IS26 a *ISEcp1* u kmeňov *Escherichia coli* z KNTB
- Tabuľka 31:** Detekcia inzerčných sekvencií IS26 a *ISEcp1* u kmeňov *Escherichia coli* z FNO
- Tabuľka 32:** Detekcia inzerčných sekvencií IS26 a *ISEcp1* u kmeňov *Escherichia coli* z FNOL
- Tabuľka 33:** Výsledky typizácie vybraných plazmidov pomocou PCR založenej na amplifikácii prítomných replikónov

11.2 Zoznam obrázkov

- Obrázok 1:** Porovnanie nukleotidových sekvencií SHV-2, SHV-2a a SHV-12 s SHV-1 pre aminokyselinovú pozíciu 238 u vybraných kmeňov *Klebsiella pneumoniae*
- Obrázok 2:** Výsledný dendrogram ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* z gastrointestinálneho traktu chorých a zdravých osôb
- Obrázok 3:** Porovnanie získanej nukleotidovej sekvencie kmeňa *Escherichia coli* A2 a nukleotidovej sekvencie promótoru/atenuátora *ampC* génu *Escherichia coli* K12
- Obrázok 4:** Výsledný dendrogram ESBL- a AmpC-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* získaných z animálnej oblasti
- Obrázok 5:** Výsledné krivky topenia získané z HRM analýzy pre kmene obsahujúce *bla*_{TEM}
- Obrázok 6:** Výsledné krivky topenia získané z HRM analýzy pre kmene obsahujúce *bla*_{CTX-M-1} skupinu
- Obrázok 7:** Výsledné krivky topenia získané z HRM analýzy pre kmene obsahujúce *bla*_{CTX-M-9} skupinu
- Obrázok 8:** Výsledné krivky topenia získané z HRM analýzy pre kmene obsahujúce *bla*_{SHV}
- Obrázok 9:** Výsledné krivky topenia získané z HRM analýzy pre kmene obsahujúce kombináciu *bla*_{TEM} a *bla*_{CTX-M-1} skupinu
- Obrázok 10:** Výsledné krivky topenia získané z HRM analýzy pre kmene obsahujúce kombináciu *bla*_{TEM} a *bla*_{CTX-M-9} skupinu
- Obrázok 11:** Výsledné krivky topenia získané z HRM analýzy pre kmene obsahujúce kombináciu *bla*_{TEM} a *bla*_{SHV}
- Obrázok 12:** Výsledné krivky topenia získané z HRM analýzy pre kmene obsahujúce kombináciu *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M-1} skupinu
- Obrázok 13:** Výsledné krivky topenia pre izoláty z KNTB, u ktorých bola stanovená prítomnosť *bla*_{CTX-M-1} skupiny
- Obrázok 14:** Výsledné krivky topenia pre izoláty z KNTB, u ktorých bola stanovená prítomnosť kombinácie *bla*_{TEM} a *bla*_{CTX-M-1} skupiny
- Obrázok 15:** Výsledné krivky topenia pre izoláty z KNTB, u ktorých bola stanovená prítomnosť kombinácie *bla*_{TEM} a *bla*_{CTX-M-9} skupiny
- Obrázok 16:** Výsledné krivky topenia pre izoláty z FNO, u ktorých bola stanovená prítomnosť *bla*_{CTX-M-1} skupiny

- Obrázok 17:** Výsledné krivky topenia pre izoláty z FNO, u ktorých bola stanovená prítomnosť kombinácie *bla*_{TEM} a *bla*_{CTX-M-1} skupiny
- Obrázok 18:** Výsledné krivky topenia pre izoláty z FNO, u ktorých bola stanovená prítomnosť *bla*_{TEM}
- Obrázok 19:** Výsledné krivky topenia pre izoláty z FNOL, u ktorých bola stanovená prítomnosť *bla*_{CTX-M-1} skupiny
- Obrázok 20:** Výsledné krivky topenia pre izoláty z FNOL, u ktorých bola stanovená prítomnosť kombinácie *bla*_{TEM} a *bla*_{CTX-M-1} skupiny
- Obrázok 21:** Výsledné krivky topenia pre izoláty z FNOL, u ktorých bola stanovená prítomnosť *bla*_{CTX-M-9} skupiny
- Obrázok 22:** Výsledné krivky topenia pre izoláty z FNOL, u ktorých bola stanovená prítomnosť kombinácie *bla*_{TEM} a *bla*_{CTX-M-9} skupiny
- Obrázok 23:** Výsledné krivky topenia pre izoláty z FNOL, u ktorých bola stanovená prítomnosť kombinácie *bla*_{TEM} a *bla*_{SHV}
- Obrázok 24:** Výsledné krivky topenia pre izoláty z FNOL, u ktorých bola stanovená prítomnosť kombinácie *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M-1} skupiny
- Obrázok 25:** Výsledné krivky topenia pre izoláty z FNOL, u ktorých bola stanovená prítomnosť *bla*_{TEM}
- Obrázok 26:** Porovnanie krivky topenia vzorky 10608 s kontrolnými kmeňmi obsahujúcimi *bla*_{TEM}
- Obrázok 27:** Porovnanie krivky topenia vzorky 10608 s kontrolnými kmeňmi obsahujúcimi *bla*_{CTX-M-1} skupinu
- Obrázok 28:** Porovnanie krivky topenia vzorky 10608 s kontrolnými kmeňmi obsahujúcimi *bla*_{CTX-M-9} skupinu
- Obrázok 29:** Porovnanie krivky topenia vzorky 10608 s kontrolnými kmeňmi obsahujúcimi *bla*_{SHV}
- Obrázok 30:** Porovnanie krivky topenia vzorky 10608 s kontrolnými kmeňmi obsahujúcimi kombináciu *bla*_{TEM} a *bla*_{CTX-M-1} skupinu
- Obrázok 31:** Porovnanie krivky topenia vzorky 10608 s kontrolnými kmeňmi obsahujúcimi kombináciu *bla*_{TEM} a *bla*_{CTX-M-9} skupinu
- Obrázok 32:** Porovnanie krivky topenia vzorky 10608 s kontrolnými kmeňmi obsahujúcimi kombináciu *bla*_{TEM} a *bla*_{SHV}
- Obrázok 33:** Porovnanie krivky topenia vzorky 10608 s kontrolnými kmeňmi obsahujúcimi kombináciu *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M-1} skupinu

- Obrázok 34:** Výsledný dendrogram ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* z KNTB
- Obrázok 35:** Výsledný dendrogram ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* z FNO
- Obrázok 36:** Výsledný dendrogram ESBL-pozitívnych izolátov *Escherichia coli* z FNOL
- Obrázok 37:** Umiestnenie IS26 a ISEcp1 u kmeňa *Escherichia coli* 4490 produkujúceho CTX-M-15 β -laktamázu v porovnaní so známou sekvenciou génu *bla*_{CTX-M-15} obsahujúceho tieto genetické elementy
- Obrázok 38:** Výsledný plazmidový profil u jednotlivých konjugátov, donora a akceptora determinantov rezistencie
- Obrázok 39:** Výsledok PCR detekcie *bla*_{CTX-M} génu u jednotlivých konjugátov, donora a akceptora determinantov rezistencie

11.4 Zoznam použitých skratiek

AmpC	typ širokospektrálnych β -laktamáz (trieda C podľa Amblera)
AmpD	N-acetyl-muramyl-L-alanín amidáza
AmpG	transmembránový proteín
AmpR	proteín regulujúci expresiu <i>ampC</i> génu
AFLP	dĺžkový polymorfizmus amplifikovaných fragmentov (angl. amplified fragment length polymorphisms)
A, G, C, T	adenín, guanín, cytozín, tymín
<i>bla</i>	gén kódujúci produkciu β -laktamáz
bp	bázový pár
CAM	agarové médium obsahujúce cefoxitín (angl. cefoxitin agar medium)
CIT	skupina AmpC β -laktamáz
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CMY	typ AmpC β -laktamáz
C-N väzba	uhlíkovo-dusíková väzba
CTX	cefotaxim
CTX-M	typ AmpA β -laktamáz (trieda A podľa Amblera)
DDST	Double Disc Synergy Test
DHA	skupina AmpC β -laktamáz
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleozidtrifosfáty
EBC	skupina AmpC β -laktamáz
ERIC	analýza enterobakteriálnych repetitívnych intragénových sekvencií (angl. enterobacterial repetitive intergenic consensus)
ESBL	širokospektrálna β -laktamáza (angl. extended-spectrum β -lactamase)
FNO	Fakultná nemocnica v Ostrave
FNOL	Fakultná nemocnica v Olomouci
HRM	analýza krivky topenia s vysokým rozlíšením (angl. high-resolution melting analysis)
IRS-PCR	PCR založená na amplifikácii rozptýlených restričných miest (angl. interspersed repetitive sequence PCR)
JIS	jednotka/y intenzívnej starostlivosti

Kan	kanamycín
kbp	kilobázový pár
KNTB	Krajská nemocnica Tomáša Baťu
LCR	ligázová reťazová reakcia (angl. ligase chain reaction)
<i>mecA</i>	gén kódujúci produkciu pozmenených PBP2a
MIC	minimálna inhibičná koncentrácia (angl. minimum inhibition concentration)
MLST	typizácia multilokálnych sekvencií (angl. multilocus sequence typing)
Omp	proteín vonkajšej membrány (angl. outer membrane protein)
OXA	typ AmpA β -laktamáz (trieda A podľa Amblera)
PBP2a	penicilín viažuci proteín 2a (angl. penicillin-binding protein 2a)
PCR	polymerázová reťazová reakcia (angl. polymerase chain reaction)
PFGE	pulzná gélová elektroforéza (angl. pulsed-field gel electrophoresis)
RAPD	polymorfizmus náhodne amplifikovaných úsekov DNA (angl. random amplified polymorphic DNA)
REP-PCR	analýza repetitívnych extragenových sekvencií pomocou PCR (angl. repetitive extragenic palindromic PCR)
RFLP	polymorfizmus dĺžky restričných fragmentov (angl. restriction fragment length polymorphism)
RNA	ribonukleová kyselina
<i>rpoB</i>	gén kódujúci produkciu β -podjednotky RNA polymerázy
SHV	typ AmpA β -laktamáz (trieda A podľa Amblera)
SSCP	jednovláknový konformačný polymorfizmus (angl. single strand conformational polymorphism)
TBE pufor	Tris/borát/EDTA pufor
TetA	tetracyklínový efluxný proteín
TetR	proteín fungujúci ako represor <i>tetA</i> génu
TEM	typ AmpA β -laktamáz (trieda A podľa Amblera)
T _m	teplota topenia (angl. melting temperature)
UV svetlo	ultrafialové svetlo
w/v	hmotnostný zlomok (angl. weight/volume)

Štúdium a predložená dizertačná práca boli realizované za finančnej podpory grantu Interní grantové agentury Ministerstva zdravotníctví ČR IGA MZ 9950-3, výskumného zámeru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR MSM6198959205 a vnitřního grantu LF UP „LF_2011_002“.