

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ORGANICKÉ CHEMIE

**Detekce a charakterizace bakterií s produkcí beta-laktamáz
izolovaných od pacientů s leukémií**

Bakalářská práce

Autor:	Anna Vávrová
Studijní program:	B1407 Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Ing. Magdaléna Röderová, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením Ing. Magdalény Röderové, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci

V Olomouci, 15. 5. 2017

.....

Anna Vávrová

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Ing. Magdaléně Röderové, Ph.D. za trpělivost, ochotu a cenné rady, které mi poskytovala v průběhu řešení práce. Dále mé poděkování patří pracovišti Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnici Olomouc za vytvoření přátelského pracovního prostředí. V neposlední řadě patří mé poděkování mým rodičům za to, že mi umožnili studovat na vysoké škole.

Bakalářská práce vznikla za podpory „Research Support Foundation Vaduz – Comprehensive Study at the Issue of Oncological Diseases“ a projektu „Podpora udržitelnosti Ústavu molekulární a translační medicíny“ LO1304.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Anna Vávrová
Název práce:	Detekce a charakterizace bakterií s produkcí beta-laktamáz izolovaných od pacientů s leukemií
Typ práce:	Bakalářská práce
Pracoviště:	Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Školitel:	Ing. Magdaléna Röderová, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2017
Abstrakt:	<p>Tato bakalářská práce se zabývá detekcí a genetickou charakterizací enterobakterií s produkcí beta-laktamáz. Teoretická část popisuje mechanismy bakteriální rezistence, obzvláště přítomnost <i>bla</i> genů, kódujících produkci enzymů štěpících beta-laktamový kruh. Dále se věnuje způsobům detekce bakteriální rezistence genetickými a fenotypovými metodami. Praktická část je zaměřena na porovnání výsledků klasické PCR a real-time PCR v detekci a charakterizaci bakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz izolovaných od pacientů s leukemií. V poslední části bakalářské práce jsou pak zhodnoceny výsledky získané použitím obou metod a diskutovány výhody a nevýhody jednotlivých systémů v detekci a charakterizaci enterobakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy.</p>
Klíčová slova:	<i>bla</i> geny, ESBL, enterobakterie, leukemie, PCR
Počet stran:	42
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author: Anna Vávrová

Title: Detection and characterization of bacteria producing beta-lactamases isolated from patients with leukemia

Type of thesis: Bachelor thesis

Department: Department of microbiology, Faculty of medicine and dentistry, Palacký University Olomouc

Advisor: Ing. Magdaléna Röderová, Ph.D.

The year of presentation: 2017

Abstract: This bachelor thesis deals with the detection and genetic characterization of enterobacteria which produce beta-lactamases. The theoretical part describes the mechanisms of bacterial resistance, particularly the presence of *bla* genes that cause the production of enzymes which hydrolyze the beta-lactam ring. The chapter also deals with phenotypic and genetic methods for the detection of bacterial resistance. The practical part is focused on comparison of the results of traditional PCR and real-time PCR in the detection and characterization of bacteria with the production of extended spectrum beta-lactamases isolated from patients with leukemia. In the last part of the bachelor thesis the results obtained using both methods are evaluated. In addition, the advantages and disadvantages of individual methods in the detection and characterization of enterobacteria producing extended spectrum beta-lactamases are discussed.

Keywords: *bla* genes, ESBL, enterobacteria, leukemia, PCR

Number of pages: 42

Language: Czech

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část	8
2.1	Obecná charakteristika čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	8
2.1.1	Morfologie a kultivace	8
2.1.2	Klinický význam	8
2.1.3	Významní zástupci čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	9
2.2	Problematika bakteriální rezistence k antibiotikům	12
2.2.1	Mechanismy bakteriální rezistence a jejich genetická podstata	12
2.3	Metody detekce bakteriální rezistence	16
2.3.1	Fenotypové metody	16
2.3.2	Genetické metody	16
3	Cíle práce	18
4	Výsledky	19
4.1	Záchyt a identifikace enterobakterií z klinického materiálu pacientů s leukemií	19
4.2	Genetická detekce <i>bla</i> genů u izolátů enterobakterií.....	21
4.3	Real-time PCR detekce <i>bla</i> _{SHV} a <i>bla</i> _{CTX-M} pomocí GeneProof ESBL kitu.....	23
5	Diskuze	28
6	Experimentální část.....	31
6.1	Materiál a metody	31
6.1.1	Sběr, izolace a identifikace enterobakterií a klinického materiálu	31
6.1.2	Detekce genů, kódujících produkci vybraných typů beta-laktamáz	31
7	Závěr	37
8	Seznam použitých zkratk	38
9	Literatura.....	40

1 Úvod

Leukemii definujeme jako heterogenní skupinu zhoubných onemocnění postihujících krevní buňky, které ztrácejí schopnost diferenciaci. Na druhou stranu tyto buňky zvyšují svůj proliferační potenciál, čímž dochází k jejich nekontrolovatelnému dělení. V závislosti na typu buněk, které maligní transformace postihuje, dělíme leukemii do dvou skupin a to na myeloidní a lymfoidní.¹

Leukemičtí pacienti jsou v důsledku probíhající nemoci a agresivní terapie často vystaveni zvýšenému riziku nozokomiálních infekcí. Navíc díky vysokým dávkám předepisovaných širokospektrých antibiotik a současnému oslabenému imunitnímu systému se z nich stávají ideální kandidáti pro kolonizaci multirezistentními bakteriálními kmeny, což může mít pro jejich zdravotní stav katastrofální následky.¹⁻³

Až do objevu penicilinu Alexandrem Flemingem v roce 1928 byla léčba bakteriálních onemocnění jedním z největších problémů, který sužoval lidskou civilizaci. Odhaduje se, že penicilin od jeho objevu až do současnosti zachránil milióny životů.⁴ Již po pár letech od zavedení penicilinu na trh byla prokázána první bakteriální rezistence k tomuto antibiotiku.⁵ V současné době představuje produkce bakteriálních beta-laktamáz, kódovaných tzv. *bla* geny, jeden z nejvýznamnějších mechanismů rezistence k beta-laktamovým antibiotikům u gramnegativních bakterií.⁶

Bakteriální rezistence k antibiotikům představuje celosvětový problém a je stále diskutovanějším tématem. Mikrobiologické laboratoře se snaží o co nejrychlejší a nejpresnější detekci rezistentních bakterií, aby mohlo dojít k nasazení správné léčby v co nejkratším čase. Vedle klasických fenotypových metod, běžně využívaných v rutinní praxi, se do popředí také dostávají moderní genetické metody, které usnadňují a urychlují diagnostiku.

V předložené bakalářské práci jsme se proto zaměřili na porovnání klasické PCR a nově vyvinutého komerčního kitu v detekci vybraných typů bakteriálních beta-laktamáz u enterobakterií, izolovaných z klinického materiálu pacientů s leukemií.

2 Teoretická část

2.1 Obecná charakteristika čeledi *Enterobacteriaceae*

Z pohledu klinické mikrobiologie je čeleď *Enterobacteriaceae* řazena jako jedna z nejvýznamnějších čeledí gramnegativních tyčinek. Jak je možné z názvu odvodit, tyto bakterie jsou součástí normální střevní mikroflóry člověka a obratlovců (z lat. enteron = střevo).⁷

2.1.1 Morfologie a kultivace

Z morfologického hlediska jsou enterobakterie popisovány jako nesporulující fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinky. Velikost jednotlivých tyčinek se pohybuje mezi 2 až 3 μm a jejich tloušťka dosahuje 0,5 – 0,8 μm . Většina enterobakterií roste na běžných mikrobiologických půdách (masopeptonový agar, krevní agar). K jejich diagnostice je ovšem možné využít také speciální selektivně-diagnostické média (například Endova půda, MacConkey agar nebo deoxycholát-citrátový agar).

Enterobakterie dobře snášejí drobné výkyvy teplot a tlaku. Z hlediska odolnosti vůči vnějším vlivům je možné v rámci této čeledi pozorovat určité rozdíly. Zatímco některé enterobakterie jsou pevně vázány na prostředí střeva, představitelé rodu *Klebsiella* a *Serratia* jsou přizpůsobeny také na prostředí mimo střevo nebo dokonce na vnější prostředí.^{7,8}

2.1.2 Klinický význam

Jak již bylo zmíněno dříve, enterobakterie tvoří součást normální střevní mikroflóry. Jednotlivé bakterie zde mohou zaujímat rozdílné postavení. Může se jednat o komenzální, saprofytický nebo parazitický způsob života. Enterobakterie nemusí působit patogenně pouze ve střevě obratlovců, ale také mohou osídlovat urogenitální systém. Takovýto druh infekce je nejčastější u dlouhodobě nemocných či starších pacientů, a to hlavně z důvodu zavedených močových katetrů. Enterobakterie se také mohou podílet na infekcích dýchacích cest, ran nebo infekcích pohybového aparátu. K nejzávažnějším klinickým stavům poté patří meningitidy nebo sepsy.^{7,8}

Nejčastější způsob přenosu enterobakterií je fekálně – orální cestou. Dále je možné se nakazit z potravin (jak je tomu u salmonel), pouhým vzdušným přenosem nebo v důsledku nesprávných hygienických návyků se může jednat o tzv. „nemoc špinavých rukou“. ^{7,8}

2.1.3 Významní zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*

V následujícím textu budou probrány jednotlivé rody bakterií, se kterými jsme během práce v laboratoři přišli do styku. Jedná se o poměrně časté zástupce a také původce onemocnění vyskytujících se u imunodeficitních pacientů.

2.1.3.1 Rod *Citrobacter*

Zástupci rodu *Citrobacter* patří mezi oportunně patogenní rod, podílející se na vzniku močových infekcí, enterokolitid, endokarditid, osteomyelitid, sepsí nebo novorozeneckých meningitid a to převážně pouze u lidí s oslabenou imunitou. Název rodu pochází ze schopnosti bakterie využívat citrát jako zdroj energie. Mezi nejvýznamnější druhy patří *Citrobacter koseri* a *Citrobacter freundii*.

Pro terapii infekcí vyvolaných zástupci rodu *Citrobacter* nelze použít cefalosporiny I. a II. generace z důvodu primární rezistence. Proto se k léčbě používá zejména ko-amoxicilin, cefalosporiny III. generace (pouze u závažných případů), chinolonony, aminoglykosidy nebo ko-trimoxazol. ⁷⁻⁹

2.1.3.2 Rod *Escherichia*

Rod *Escherichia* byl objeven a popsán rakouským lékařem Theodorem von Escherichem v roce 1885 a po svém objeviteli také nese své rodové jméno. Pro lékařskou, ale také širokou veřejnost je nejznámějším právě druh *Escherichia coli*. Kromě něho byly popsány také další druhy *Escherichia vulneris*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia albertii*. Tyto však nejsou velmi známé a člověka napadají pouze výjimečně.

U zdravých jedinců představuje *E. coli* běžnou součást střevní mikroflóry. Přítomnost této bakterie je pro člověka přínosná a to tvorbou vitamínu K nebo produkcí kolicinů, látek znemožňujících průnik patogenů, ale také se může podílet na infekcích jak střevního, tak mimostřevního traktu.

Za určitých okolností mohou být tyto bakterie významným původcem průjmových onemocnění. Mimostřevní působení nejsou ojedinělá, svědčí o tom i fakt, že *E. coli* je nejčastějším původcem infekcí a zánětů močových cest. Dále může způsobovat infekce žlučových a dýchací cest nebo infekce ran.^{7,8}

Terapie infekcí vyvolaných *E. coli* je založena na tom, zda se jedná o střevní nebo mimostřevní infekci. U střevních infekcí je velmi důležité doplnění ztracených tekutin, podávání prebiotik, případně probiotik, nebo absorbencí pro lepší obnovení správné funkce střeva. U mimostřevních infekcí naopak dochází k okamžitému nasazení antibiotické léčby, aby se zabránilo případné sepsi. Nejčastěji se podávají cefalosporiny II. a III. generace.^{7,8}

2.1.3.3 Rod *Enterobacter*

Hned po *E. coli* jsou enterobaktery druhou nejhojněji zastoupenou bakterií lidského střeva. Nejvýznamnějšími zástupci tohoto rodu jsou *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter kerogenem*, *Enterobacter sakazakii*. Také je zařazujeme mezi potenciálně patogenní bakterie, které se mohou podílet na infekci močových cest, pneumonii nebo sepsi, mající především endogenní charakter. Epidemický výskyt byl zaznamenán u *Enterobacter sakazakii*, kde se jednalo o výskyt meningitid u novorozenců z důvodu přítomnosti v náhražce mateřského mléka.^{7,9}

2.1.3.4 Rod *Klebsiella*

Rod *Klebsiella* byl objeven v roce 1883 německým patologem Carlem Friedländerem. Své rodové jméno ovšem dostala po německém lékaři Edwinu Klebsovi, který se také podílel na objevení *Corynebacterium diphtheriae*. Bakterie rodu *Klebsiella* jsou přirozenou součástí gastrointestinálního traktu. Na rozdíl od enterobakterů jsou klebsiely lépe adaptovány na život mimo střeva člověka. Z klinického hlediska jsou nejčastějším původcem uroinfekcí či infekcí dýchacích cest.

K léčbě infekcí vyvolaných tímto rodem je možné použít cefalosporiny II. a III. generace, ko-trimoxazol, případně nitrofurantoin. Klebsielly jsou primárně rezistentní pouze k ampicilinu. Pokud se jedná o nozokomiální kmeny, produkující tzv. širokospektré beta-laktamázy, k terapii se používají pouze cefalosporiny IV. generace, karbapenemy, popřípadě v kombinaci s aminoglykosidy.^{7,8}

2.1.3.5 Rod *Morganella*

Rod *Morganella* se dříve společně s rody *Proteus* a *Providencia* řadily pod jeden rod se společným názvem *Proteus*. Jedná se o saprofytické bakterie, jejichž hlavním úkolem je likvidace organických zbytků. Nejznámějším zástupcem je *Morganella morganii*. Z hlediska patogenity se mohou zástupci tohoto rodu podílet na vzniku močových infekcí nebo infekcí ran. Mezi ohroženou skupinou lidí patří především onkologičtí pacienti, kteří jsou díky snížené imunitě velmi náchylní k infekcím. Pro léčbu infekcí způsobených zástupci rodu *Morganella* nelze použít ampicilin či cefalosporiny I. a II. generace, jelikož jsou k nim primárně rezistentní.⁷

2.1.3.6 Rod *Pantoea*

Rod *Pantoea* byl dříve řazen pod rod *Enterobacter*. Na základě biochemických odlišností byl tento rod vyčleněn. Známým zástupcem tohoto rodu je *Pantoea agglomerans*. Z hlediska patogenity ji zařazujeme k oportunně patogenním druhům.⁷

2.1.3.7 Rod *Salmonella*

Salmonely řadíme do dvou základních skupin. Jedná se o primárně antropopatogenní salmonely, kam zařazujeme *Salmonella* Typhi a *Salmonella* Paratyphi, způsobující břišní tyfus a paratyfus. K nákaze dochází skrz kontaminovanou vodu, potravinami či přímým kontaktem. Toto onemocnění se vyskytuje hlavně v zemích třetího světa a v rozvojových zemích. K léčbě se využívají zejména cefalosporiny III. generace.^{8,9}

K primárně zoopatogenním salmonelám řadíme u nás nejrozšířenější *Salmonella* Enteritidis a *Salmonella* Typhimurium. Nákaza je možná konzumací infikovaných potravin, jako je maso či vejce nebo výrobků z nich, které se jedí za studena nebo nedostatečně tepelně upravené. K léčbě salmonelových infekcí nebývají obvykle indikovány antibiotika.^{7,8}

2.1.3.8 Rod *Serratia*

Na rozdíl od předchozích zástupců, jsou představitelé rodu *Serratia* lépe uzpůsobeni na život ve vnějším prostředí nežli na život ve střevě (způsobem života patří spíše mezi půdní bakterie). Patří mezi tzv. nozokomiální patogeny. K tomuto poznatku přispívá také fakt, že jsou schopny odolávat účinku dezinfekčních prostředků. Infekce

vyvolané těmito bakteriemi mají často exogenní charakter. K hlavním zástupcům patří *Serratia marcescens* a *Serratia erubidiaea*. Serracie bývají často polyrezistentní, primárně jsou rezistentní k ampicilinu, cefalosporinům I. a II. generace a také ke kolistinu.^{7,8}

2.2 Problematika bakteriální rezistence k antibiotikům

Bakteriální rezistence je popsána jako schopnost mikrobiální populace odolávat účinku tzv. MIC (neboli minimální inhibiční koncentraci pro danou skupinu antibiotik). Bakteriální rezistenci rozdělujeme na primární a sekundární.

Primární neboli přirozená rezistence je typická pro všechny představitele určitého rodu/druhu a vzniká přirozenou nepřítomností určité cílové struktury pro dané antibiotikum, nedostatečným průnikem léku do buňky, nebo jiným chromozomálním mechanismem rezistence. Druhou skupinou je sekundární rezistence, čili získaná. Kmeny, na které původně antibiotika působila, se stávají rezistentními a to například vlivem mutací nebo díky mobilním genetickým elementům jako jsou konjugativní plasmidy, transpozony, případně různé integrované systémy.¹⁰⁻¹³

2.2.1 Mechanizmy bakteriální rezistence a jejich genetická podstata

Rozlišujeme čtyři základní mechanismy bakteriální rezistence. Prvním typem je změna permeability vnější membrány. Malé hydrofilní látky, například beta-laktamová antibiotika nebo fluorochinolony, používají pro vstup do buňky transmembránové proteiny, tzv. poriny. Na rozdíl od toho hydrofobní látky prochází prostou difuzí přes lipidovou dvojvrstvu. V případě porinů rozlišujeme dva základní typy rezistence. Jedná se buďto o změny ve vnější membráně (ztráta či redukce porinů) nebo o změnu funkce membrány způsobené vlivem specifických mutací, čímž dochází k sníženému prostupu antibiotika do buňky.¹⁴

Dalším typem bakteriální rezistence je aktivní vyčerpávání antibiotika z bakteriální buňky pomocí tzv. efluxních pump. Efluxní pumpy jsou proteiny sloužící k transportu toxických substrátů a metabolitů ven z buňky. Pumpy mohou být selektivní, ale také mohou sloužit k transportu naprosto strukturálně odlišných látek. Hlavním problémem jsou pak mutace v genech kódujících tyto transportéry a jejich

následná nadprodukce umožňující bakteriím odolávat účinku konkrétních skupin antibiotik.¹⁵

Třetím příkladem mechanismu bakteriální rezistence je modifikace cílového místa pro dané antibiotikum. Rezistentní bakterie se snaží pozměnit či maskovat cílovou strukturu na kterou antibiotika působí tak, aby nedošlo k jejich rozpoznání, antibiotikum se nemohlo navázat a stalo se tak neúčinným. Jako příklad takovéto rezistence slouží tzv. kmeny MRSA (Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*), kdy díky přenosu *mecA* nebo nověji *mecC* genu a jeho následné expresi dochází k produkci pozměněných penicilin-vázajících proteinů, z anglického penicillin-binding proteins (PBP2a), které pak vykazují sníženou afinitu k beta-laktamovým antibiotikům.¹⁶

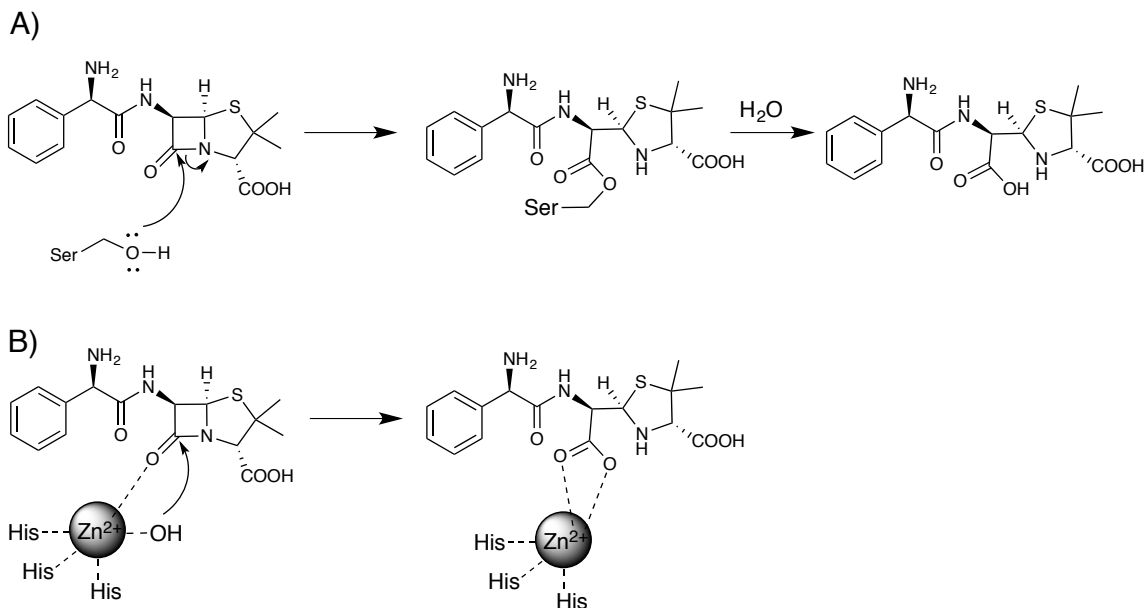
Posledním mechanismem bakteriální rezistence je inaktivace antimikrobiální látky skrze pozměnění její struktury nebo úplnou degradaci. Typickým příkladem pro tento mechanismus rezistence je hydrolýza beta-laktamového kruhu u beta-laktamových antibiotik. Tato hydrolýza bývá způsobena bakteriálními enzymy, tzv. beta-laktamázami.⁶ Tomuto mechanismu rezistence bude věnovaná následující kapitola.

2.2.1.1 Bakteriální beta-laktamázy

Mezi jednu z nejvýznamnějších a nejčastěji předepisovaných skupin antimikrobiálních přípravků patří tzv. beta-laktamová antibiotika. Pro správnou funkci těchto antibiotik je velmi důležitá integrita beta-laktamového kruhu, který představuje základní strukturní jednotku této skupiny antibiotik. Beta-laktamy působí na inhibici syntézy bakteriální stěny tím, že se vážou na bakteriální enzymy PBPs, které hrají důležitou roli v konečném zesíťování buněčné stěny. Do této skupiny přípravků jsou řazeny peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, monobaktamy a inhibitory beta-laktamáz.^{8,17,18}

Beta-laktamová antibiotika mají vazby citlivé na hydrolýzu a soudržnost těchto vazeb je základním klíčem k jejich biologické aktivitě. Existuje proto řada bakteriálních enzymů, které využívají snadné hydrolýzy těchto vazeb, což vede k jejich rozštěpení. Nejvýznamnější skupinou jsou amidázy, které štěpí beta-laktamový kruh u penicilinů a cefalosporinů. Amidázy jsou schopny rozštěpit beta-laktamový kruh dvěma různými způsoby a to buď pomocí reaktivního serinového rezidua v aktivním místě, nebo

účinkem těžkých kovů (nejčastěji Zn^{2+}) spolu s rezidui histidinu a (nebo) cysteinu (Obrázek 1 A a 1B).¹⁹



Obrázek 1: Mechanismus účinku bakteriálních beta-laktamáz

Beta-laktamázy jsou produkovány zejména gramnegativními bakteriemi, které je vylučují do periplasmatického prostoru. Několik typů beta-laktamáz bylo zachyceno také u grampozitivních bakterií, ty jsou na rozdíl od předchozích produkovány do prostoru extracelulárního. Geny kódující tyto enzymy (*bla* geny) byly nalezeny původně na chromozomech (jednalo se poté o druhově specifické enzymy), později byly pozorovány také na plasmidech, což umožňuje jejich horizontální šíření.¹⁸

V dnešní době jsou beta-laktamázy nejčastěji rozřazeny do skupin na základě dvou schémat a to podle Amblerovy molekulární klasifikace²⁰ (do čtyř skupin A-D podle homologie proteinů) nebo Bush-Jacoby-Medieros klasifikačního systému (do tří základních skupin na základě substrátové/ inhibitorové specifity).²¹

Mezi nejvýznamnější skupiny bakteriálních beta-laktamáz patří TEM, SHV a CTX-M typy. Do těchto skupin zařazujeme jak enzymy s úzkým tak se širokým spektrem účinku, tzv. širokospektré beta-laktamázy (neboli ESBL z anglického slova extended-spectrum beta-lactamase). Jsou to enzymy, které na rozdíl od původních beta-laktamáz, jsou schopny hydrolyzovat cefalosporiny III. generace (cefotaxim, ceftazidim, ceftriaxon atd.) a také monobaktamy. Nejsou aktivní vůči cefamycinům a

karbapenemům a jsou inhibovány inhibitory beta-laktamáz (kys. klavulanová, sulbaktam a tazobaktam).²² V dnešní době představují významný medicínský problém.

Rezistence kmenů *E. coli* je až z 90 % dána přítomností TEM-1 beta-laktamázy, která je schopna hydrolyzovat peniciliny a cefalosporiny I. generace. Prvním enzymem odvozeným od TEM-1 je TEM-2 typ, který vznikl nahrazením jediné aminokyseliny. Spektrum účinku však zůstalo zachováno.^{23,24} Dalším typem velmi rozšířené beta-laktamázy je SHV-1, která byla poprvé popsána u bakterie *K. pneumoniae*, kde se vyskytuje jako chromozomálně kódována. Odsud se následně gen inkorporoval do plazmidu a tímto způsobem byl schopen se šířit i do jiných druhů enterobakterií. Spektrum účinku je obdobné jako u TEM-1 resp. TEM-2 enzymů.²⁵

Novější a v současné době nejrozšířenější skupinou jsou tzv. CTX-M enzymy, které přednostně hydrolyzují cefotaxim než ceftazidim. Ty již samy o sobě vykazují ESBL fenotyp. Prvním popsaným byl CTX-M-1 typ, od té doby jejich počet stoupl na více než 100.²⁶

U TEM a SHV typů enzymů je ESBL fenotyp dán přítomností bodových mutací v genech kódujících beta-laktamázy s úzkým spektrem účinku (SHV-1, TEM-1, resp. TEM-2). Následnou záměnou aminokyselin dochází ke změně struktury aktivního místa enzymu a jeho aktivity. V případě SHV enzymů jsou to hlavně záměny v pozicích 238 (glycin za alanin nebo serin), zodpovědnou za hydrolýzu ceftazidimu, a 240 (kyselina glutamová za lysin), zodpovědnou za hydrolýzu cefotaximu. U TEM typů beta-laktamáz jsou obzvláště důležité bodové mutace a následné aminokyselinové substituce v pozicích 104 (kyselina glutamová za lysin), 164 (arginin za serin nebo histidin), 238 (glycin za serin) a 240 (kyselina glutamová za lysin). Vzájemná kombinace jednotlivých aminokyselinových záměn hraje důležitou roli ve výsledném ESBL fenotypu, tj. schopnosti hydrolyzovat jednotlivé cefalosporiny jako cefotaxim a ceftazidim.^{24,25}

Do dnešní doby bylo zaznamenáno 10 různých skupin spadajících pod definici ESBL. Kromě již uvedených TEM, SHV a CTX-M jsou to také PER, VEB, BES, GES, TLA, SFO a OXA typy, které ale již nejsou náplní předložené bakalářské práce.²⁷

2.3 Metody detekce bakteriální rezistence

V poslední době došlo k velkému rozvoji jednotlivých metod sloužících k detekci bakteriální rezistence. Obecně je můžeme rozdělit na metody fenotypové a genetické.

2.3.1 Fenotypové metody

Fenotypovému určení bakteriální rezistence předchází izolace bakterie z klinického materiálu pomocí standardních kultivačních a identifikačních metod a následné použití difuzních nebo dilučních testů pro stanovení citlivosti ke konkrétnímu antibiotiku. Pro detekci produkce ESBL lze využít specifických testů, tzv. Double Disk Synergy Test (DDST), E-test, CLSI test nebo chromogenní půdy. V rutinní mikrobiologické praxi jsou v dnešní době preferovány spíše fenotypové metody, na druhé straně se jeví detekce na této úrovni v některých případech nedostatečná.²⁸

2.3.2 Genetické metody

Cílem bakalářské práce bylo využití genetických metod v detekci a charakterizaci bakterií s produkcí beta-laktamáz. Proto tyto postupy budou popsány podrobněji než metody fenotypové.

Techniky založené na bázi detekce nukleových kyselin poskytují rychlé a citlivé metody pro zjištění přítomnosti genů rezistence a hrají tak klíčovou roli v objasňování jednotlivých mechanismů rezistence. Nejstarší používanou technikou je metoda hybridizace, která je založena na komplementárním párování bází mezi templátovou DNA a navrženou DNA sondou.²⁹ K modernějším postupům pak patří PCR, real-time PCR, pyrosekvencování, DNA microarray a v poslední době také hodně rozšířené celogenomové sekvencování.³⁰⁻³²

Použití genetických metod může být nápomocné při řešení sporných výsledků. Příkladem může být oxacilin – rezistentní *S. aureus*. Pomocí *mecA* sondy nebo PCR lze rozlišit, zda se jedná o izoláty vykazující rezistenci na oxacilin díky přítomnosti *mecA* genu, nebo díky nadprodukcí beta-laktamáz, které pozvolna hydrolyzují oxacilin.³³ Nespornou výhodou při použití genetických metod je fakt, že jsou schopny prokázat rezistentní geny přímo ze vzorku klinického materiálu, čímž umožňují rychlejší detekci přítomné rezistentní bakterie. Jedním z největších celosvětových problémů je také mnohočetná léková rezistence kmenů *Mycobacterium tuberculosis* na streptomycin a

rifampicin. Mutace, vznik rezistence a jejich detekce byly u *M. tuberculosis* prokázány díky PCR a následnému DNA sekvencování. Dále mohou být genetické metody nápomocné při detekci *van* genů v diagnostice vankomycin-rezistentních enterokoků nebo v záchytu jednotlivých *bla* genů u kmenů produkujících beta-laktamázy.³⁴

Na druhé straně však genetické metody někdy selhávají v určení výsledné citlivosti dané bakterie na antibiotikum. Přítomnost genu rezistence totiž nemusí hned znamenat, že se tento gen exprimuje a poté mohou být výsledky označeny jako falešně pozitivní. Genetické metody v dnešní době spíše doplňují ty fenotypové, u nejasných vzorků, pro potvrzení specifických mechanismů rezistence, u kultivačně náročných, či pomalu rostoucích mikroorganismů.²⁹

Pro rychlou a snadnou detekci různých typů bakteriálních beta-laktamáz bylo navrženo několik komerčních diagnostických souprav, tzv. kitů. Příkladem takovýchto souprav může být Hyplex ESBL IDkit od firmy amPLEX, Check-Direct ESBL kit od firmy Check-Points, ESBLs producing bacteria Real-Time PCR kit od firmy Liveriver nebo námi testovaný GeneProof ESBL PCR kit od firmy GeneProof.

GeneProof kit byl navržen pro snazší detekci *bla_{SHV}* a *bla_{CTX-M}* genů přímo z klinického materiálu pomocí real-time PCR. Detekce SHV ESBL je založena na amplifikaci genu *bla_{SHV}* a diskriminaci nejčastěji se vyskytujících mutací vedoucích k ESBL genotypu pomocí fluoroescenčně značených sond. Detekce CTX-M ESBL je založena na principu amplifikace genu *bla_{CTX-M}* a měření nárůstu koncentrace amplifikačního produktu v průběhu PCR pomocí fluoroescenčně značených sond. Součástí kitu je také interní standard kontrolující možnou inhibici PCR reakce, případně i kvalitu izolace DNA, jak je uvedeno v příbalovém letáku diagnostické soupravy.

3 Cíle práce

Hlavní cíle bakalářské práce lze charakterizovat následujícími body:

1. Genetická charakterizace souboru enterobakterií izolovaných od pacientů s leukémií se zaměřením se na detekci genů kódujících produkci bakteriálních beta-laktamáz.
2. Zhodnocení možnosti využití komerčního kitu GeneProof ESBL PCR kit pro rychlou diagnostiku producentů širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL přímo ze vzorků klinického materiálu od pacientů s leukémií.

4 Výsledky

4.1 Záchyt a identifikace enterobakterií z klinického materiálu pacientů s leukemií

Ve sledovaném období od září roku 2015 až do srpna 2016 byly shromažďovány vzorky od vybraných pacientů s leukemickým onemocněním. Od jednoho pacienta bylo zařazeno i několik druhů klinického materiálu (od 1 až po 22) a to podle harmonogramu léčby a návštěvy HOK a aktuálního zdravotního stavu.

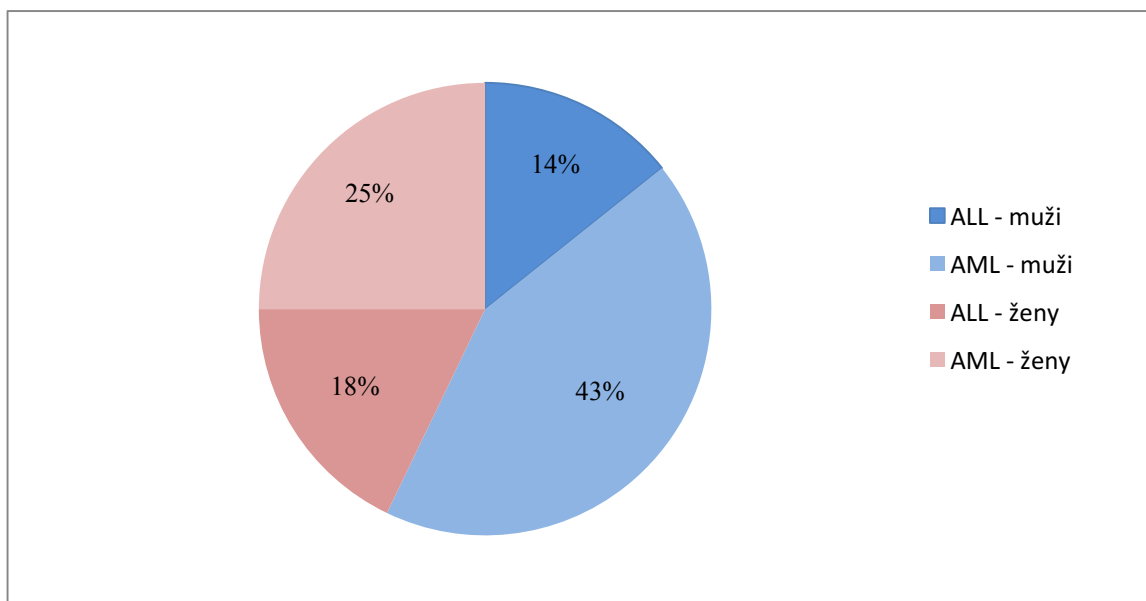
Pro účely bakalářské práce byl poté vybrán soubor 95 vzorků klinického materiálu z období od září 2015 do ledna 2016. V tomto souboru byl od jednoho pacienta zařazen různý počet vzorků materiálu (od 1 až po 12) odebraného v různých časových intervalech (od několika dnů až po několik měsíců). Nejčastěji zastoupeným klinickým materiálem byl výtěr z krku, vzorky stolice, odebrané pomocí rektálního výtěru a moč, nejméně vzorky z dutiny ústní a vzorky sputa. Všechny typy získaného materiálu uvádí tabulka 1.

Tabulka 1: Jednotlivé druhy zastoupeného klinického materiálu odebraného od pacientů s leukémií

Klinický materiál	Počet vzorků
Dutina ústní	1
Hemokultura	3
Krk	35
Moč	18
Perianál	5
Rána	3
Sputum	1
Stolice	29

Z celkového počtu 28 pacientů byl materiál odebrán od 16 mužů a 12 žen. Nejmladším pacientem byl 27letý muž, nejstarším 75letá žena. Všichni tito pacienti trpěli leukemickým onemocněním, přičemž 68 % pacientů trpělo akutní myeloidní leukémií (AML) a 32 % pacientů trpělo akutní lymfatickou leukémií (ALL). Graf 1 uvádí procentuální zastoupení AML a ALL u mužů a žen.

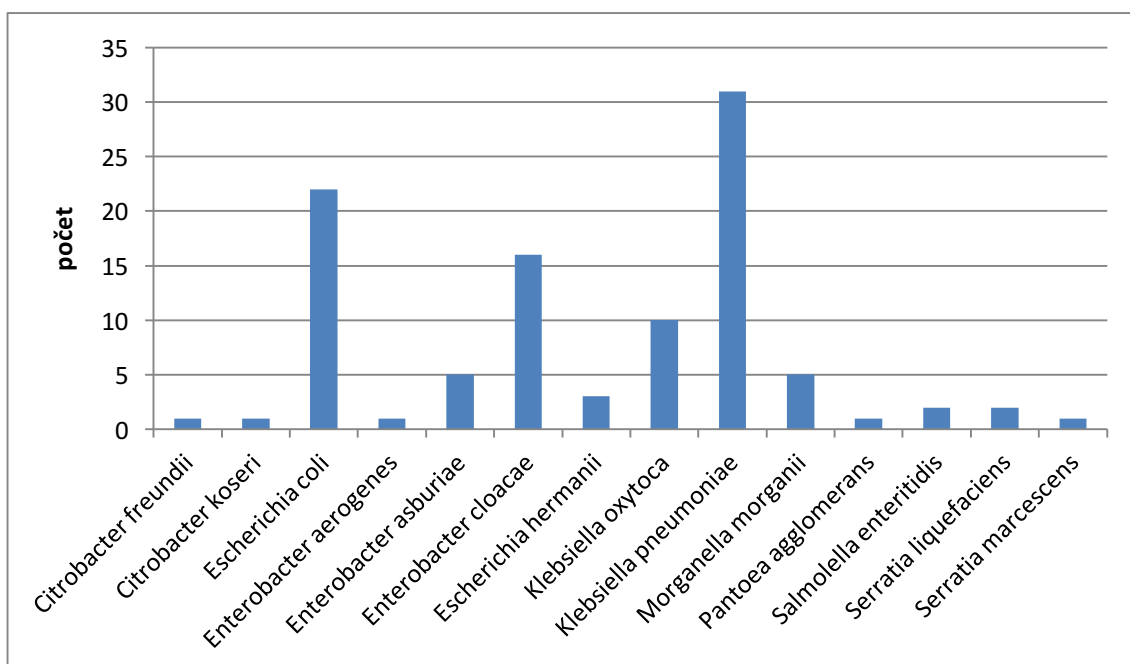
Graf 1: Procentuální zastoupení ALL a AML u mužů a žen



Pomocí standardních mikrobiologických postupů a následné identifikaci s použitím MALDI-TOF MS bylo z klinického materiálu získáno 101 izolátů enterobakterií. Nejhojněji zastoupeným druhem byla *K. pneumoniae*, izolována z 31 vzorků klinického materiálu. Nejčastěji se jednalo o výtěry z krku (58 %) a vzorky stolice (19 %). Druhým nejvíce se vyskytujícím druhem byla *E. coli*, získaná ze 22 vzorků klinického materiálu a to hlavně z moči (45 %) a ze vzorků stolice (23 %). Méně často izolovanými druhy enterobakterií byly *C. freundii* (vzorek výtěru z krku), *C. koseri* (vzorek moči), *Ent. aerogenes* (vzorek moči), *P. agglomerans* (vzorek výtěru z krku) a *S. marcescens*, která byla izolována ze vzorku moči.

Celkové zastoupení nalezených enterobakterií v klinickém materiálu pacientů s ALL nebo AML uvádí graf 2.

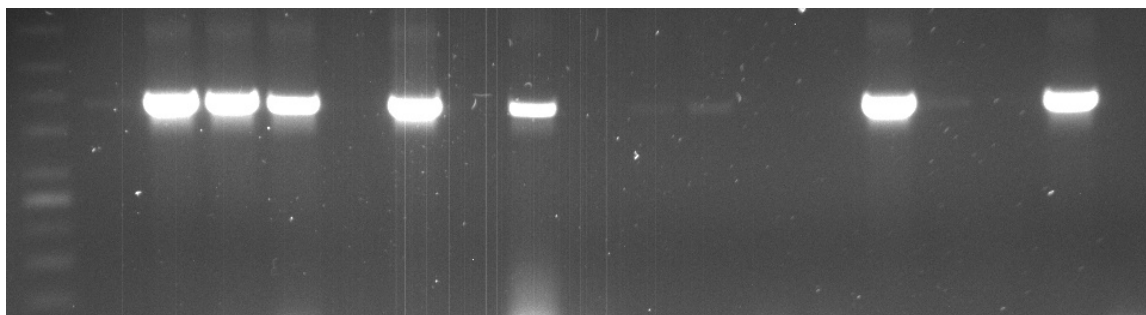
Graf 2: Zastoupení vyizolovaných enterobakterií z klinického materiálu



4.2 Genetická detekce *bla* genů u izolátů enterobakterií

Pro účely genetické detekce *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M} genů byla použita PCR s využitím specifických primerů. Pomocí této metody bylo charakterizováno zastoupení jednotlivých *bla* genů a jejich případná kombinace u 101 enterobakterií. Celkem bylo nalezeno 35 izolátů, u kterých nebyla detekována přítomnost žádné ze sledovaných beta-laktamáz. Naproti tomu nejhojněji zastoupeným genem kódujícím specifickou beta-laktamázu byl *bla*_{TEM}, který byl detekován v 41 % případů. Obrázek 2 dokumentuje výsledky genetické detekce tohoto genu pomocí PCR a následné elektroforézy u vybraných izolátů. Podrobněji popis detekce jednotlivých beta-laktamáz a zastoupení jednotlivých genů uvádí tabulka 2 a graf 3.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19



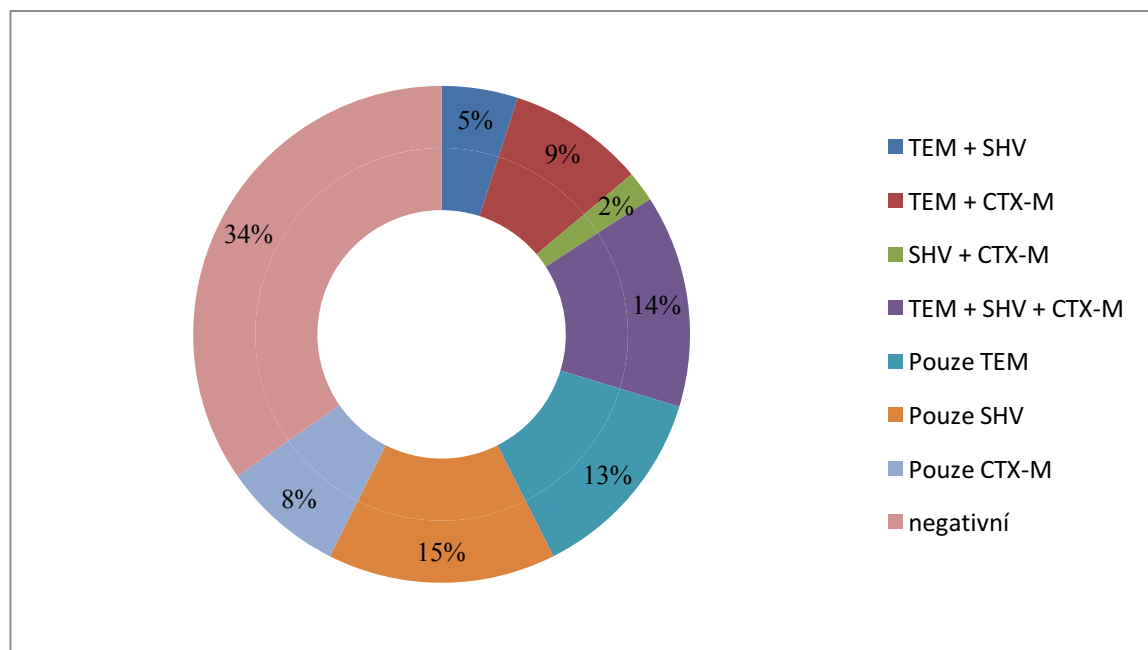
Legenda: 1 - DNA ladder; 3,4,5,7,9,15 – pozitivní vzorky obsahující *bla*_{TEM} gen; 2,6,8,10,11,12,13,14,16,17 – negativní vzorky; 18 - pozitivní kontrola; 19 - negativní kontrola

Obrázek 2: Výsledek detekce *bla*_{TEM} genu pomocí PCR u vybraných vzorků

Tabulka 2: Výskyt zachycených beta-laktamáz u sledovaných izolátů enterobakterií

Typ beta-laktamázy	Počet izolátů
SHV	15
TEM	13
CTX-M	8
TEM + SHV	5
TEM + CTX-M	9
SHV + CTX-M	2
TEM + SHV + CTX-M	14

Graf 3: Procentuální zastoupení beta-laktamáz u testovaných enterobakterií

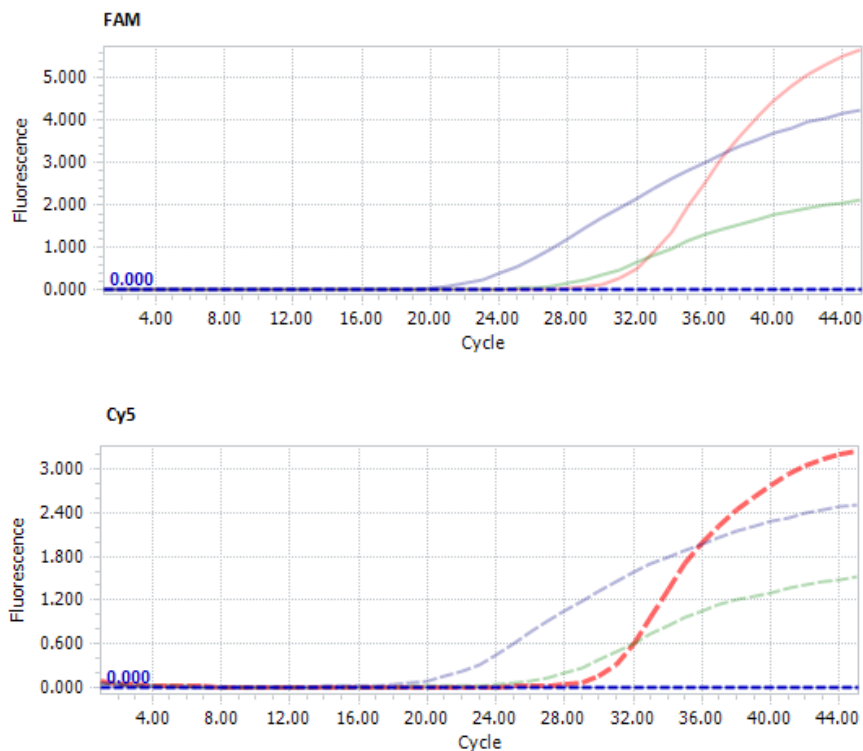


4.3 Real-time PCR detekce *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M} pomocí GeneProof ESBL kitu

Z celkového souboru 95 vzorků klinického materiálu bylo pro další cíl práce, tedy zhodnocení možnosti využití komerčního kitu GeneProof ESBL PCR kit pro rychlou diagnostiku producentů ESBL, použito pouze 83 vzorků. Důvodem byla nemožnost zamražení některých vzorků klinického materiálu (například hemokultur) nebo nezachování původních odběrů.

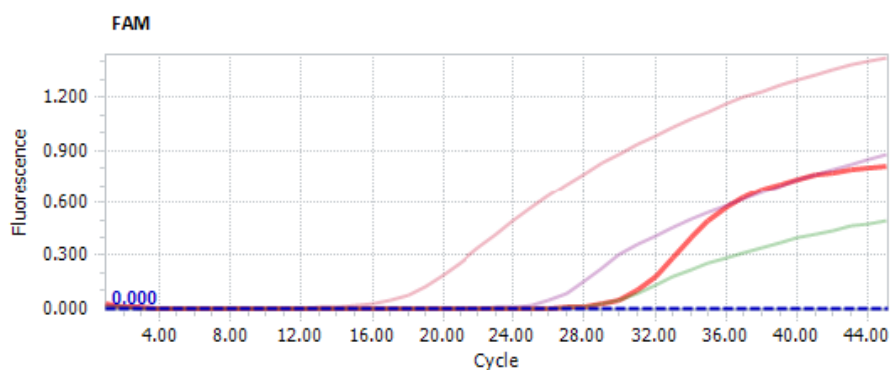
Po izolaci celkové DNA z jednotlivých vzorků byla provedena real-time PCR s využitím komerčního kitu. Vyhodnocení výsledků probíhalo přesně podle doporučení výrobce pro jednotlivé sledované geny a to zhodnocením nárůstu fluorescence v jednotlivých kanálech (kanál FAM, kanál Cy5 a kanál HEX) a jejich vzájemnou kombinací. Výslednou interpretací tak bylo označení vzorku jako ESBL pozitivní (SHV a/nebo CTX-M) nebo ESBL negativní. V případě, že nedošlo k nárůstu fluorescence ani v jednom z detekčních kanálů, výsledek byl označen jako nevalidní. Gen, kódující produkci TEM typu beta-laktamáz, nebyl pomocí tohoto kitu sledován.

Následující obrázky demonstrují ukázky detekce SHV ESBL a CTX-M ESBL využitím real-time PCR a GeneProof ESBL PCR kitu. Na obrázku 3 je možné vidět typický průběh fluorescenčních křivek v detekčním kanálu FAM a Cy5 u dvou SHV ESBL pozitivních vzorků (v obou detekčních kanálech se hodnotí přítomnost specifických mutací u *bla*_{SHV} genu, zodpovědných za ESBL fenotyp; v kanálu FAM SHV mutace v pozici 238 a 240, v kanálu Cy5 v pozici 179). Pozitivní kontrola je znázorněná červeně.



Obrázek 3: Vyhodnocení výsledků analýzy SHV ESBL

Obrázek 4 demonstruje typický průběh fluorescenčních křivek v detekčním kanálu FAM u tří CTX-M ESBL pozitivních vzorků (ve FAM kanálu se hodnotí pouze přítomnost CTX-M beta-laktázy se širokospektrým charakterem). Pozitivní kontrola je znázorněná červeně.



Obrázek 4: Vyhodnocení výsledků analýzy CTX-M ESBL

V následující části uvádíme vzájemné porovnání výsledků PCR a real-time PCR. Vzhledem k tomu, že z jednoho vzorku klinického materiálu mohlo být získáno více bakteriálních kultur s různým zastoupením beta-laktamáz, musel se tento fakt vzít v potaz při závěrečné interpretaci výsledků. Rovněž nebylo hodnoceno 12 případů, u kterých se nezachoval příslušný klinický materiál.

V případě detekce CTX-M ESBL bylo pomocí komerčního kitu označeno 30 vzorků klinického materiálu jako pozitivních. U 25 vzorků byla skutečně nalezena enterobakterie, u které byl pomocí PCR detekován *bla*_{CTX-M} gen. U pěti, označených šedě v tabulce 3, nebyl nalezen gen kódující CTX-M beta-laktamázu. Výsledná shoda tedy dosahovala hodnot 83 %. Metoda s využitím GeneProof kitu se tedy zdá být daleko citlivější.

Současný záchyt CTX-M ESBL a SHV ESBL byl podle real-time PCR detekován ve 4 případech jak uvádí tabulka 4. U dvou enterobakterií byl skutečně potvrzen současný záchyt *bla*_{CTX-M} a *bla*_{SHV} genu. U jednoho izolátu byl ale zachycen pouze jeden gen (*bla*_{CTX-M} u izolátu 22963), u dalšího nebyl ani jeden z přítomných genů. Úspěšnost současného záchytu tedy v tomto případě byla pouze 50 %.

U vzorků klinického materiálu označených jako ESBL negativní (n = 46) buď nebyl nalezen žádný ze sledovaných genů (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M}) nebo byl u izolátů *K. pneumoniae* detekován *bla*_{SHV}, který pravděpodobně kóduje produkci chromozomálně se vyskytující SHV-1 beta-laktamázy a u izolátů *E. coli* gen, který kóduje TEM-1 nebo TEM-2 beta-laktamázy. Všechny tyto typy představují enzymy s úzkým spektrem účinku, nejedná se tedy o ESBL. V tomto případě by pro definitivní potvrzení bylo nutno sekvencování SHV a TEM pozitivních produktů.

U posledních vzorků klinického materiálu (n = 3) byl výsledek označen jako nevalidní. Ve dvou případech se jednalo o SHV, v jednom o CTX-M ESBL detekci. Pravděpodobně došlo k možné inhibici v průběhu PCR reakce nebo selhala účinnost izolačního postupu.

Tabulka 3: Výsledky detekce CTX-M ESBL přímo ze vzorků klinického materiálu a jejich porovnání s výsledky z PCR

Lab. číslo klin. materiálu	Bakteriální nález	PCR			Real-time PCR		Vyhodnocení
		TEM	SHV	CTX-M	ESBL SHV	ESBL CTX-M	
16322	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
16428	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
16660	<i>K. pneumoniae</i>	+	-	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
16924	<i>Ent. cloacae</i>	-	-	-	-	-	
16924	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
16925	<i>E. coli</i>	-	-	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
16930	<i>K. pneumoniae</i>	-	+	-	-	+	ESBL poz./CTX-M
18423	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
18891	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	ESBL poz./CTX-M
20033	<i>E. coli</i>	-	-	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
20635	<i>Ent. cloacae</i>	+	+	-	-	+	ESBL poz./CTX-M
21212	<i>E. coli</i>	-	-	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
21589	<i>Ent. cloacae</i>	-	-	-	-	+	ESBL poz./CTX-M
21712	<i>E. coli</i>	-	-	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
22525	<i>K. oxytoca</i>	+	-	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
22531	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
22599	<i>K. pneumoniae</i>	-	+	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
22599	<i>Ent. cloacae</i>	+	-	-	-	-	
22622	<i>Ent. asburiae</i>	-	-	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
82	<i>Ent. cloacae</i>	+	+	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
231	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
234	<i>Ent. cloacae</i>	+	-	-	-	+	ESBL poz./CTX-M
722	<i>Ent. cloacae</i>	+	-	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
1032	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
1033	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
1146	<i>K. oxytoca</i>	+	-	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
1154	<i>E. coli</i>	-	-	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
1302	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
1718	<i>K. oxytoca</i>	+	-	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
1722	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
1723	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	-	+	ESBL poz./CTX-M
2023	<i>E. coli</i>	-	-	+	-	+	ESBL poz./CTX-M

Tabulka 4: Výsledky detekce SHV ESBL a CTX-M ESBL přímo ze vzorků klinického materiálu a jejich porovnání s výsledky z PCR

Lab. číslo klin. materiálu	Bakteriální nález	PCR			Real-time PCR		Vyhodnocení
		TEM	SHV	CTX-M	ESBL SHV	ESBL CTX-M	
16931	<i>M. morganii</i>	-	-	-	+	+	ESBL poz./SHV/CTX-M
22262	<i>K. pneumoniae</i>	-	+	+	+	+	ESBL poz./SHV/CTX-M
22624	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	ESBL poz./SHV/CTX-M
22624	<i>C. koseri</i>	-	-	-	-	-	
22963	<i>Ent.cloacae</i>	-	-	+	+	+	ESBL poz./SHV/CTX-M

5 Diskuze

Dlouhodobě hospitalizovaní pacienti, pacienti se zavedenými umělými močovými a cévními katetry, nebo imunosuprimovaní jedinci jsou vzhledem k jejich zdravotnímu stavu velice náchylní k nozokomiálním nákazám. Do této skupiny můžeme také zařadit pacienty s leukemií, kteří z důvodu agresivní chemoterapie, radioterapie a následnému oslabení imunitního systému patří k nejohroženějším skupinám. Nozokomiální infekce způsobují prodloužení doby hospitalizace, zvyšují počet předepsaných léků a čas jejich užívání, čímž také dochází ke zvyšování nákladů ve zdravotní péči.^{3,35} Finská studie autorů Lyytikäinen a kol. udává, že až 33 % nozokomiálních nákaz postihne právě pacienty onkologických oddělení.³⁶ Autoři jiných studií uvádějí, že úmrtnost pacientů způsobená nozokomiálními bakteriemi se pohybuje mezi 10 % a 20 %, zatímco mortalita u nozokomiální pneumonie je mnohem vyšší (mezi 40 % a 60 %).^{37,38}

K významným původcům infekcí u hematoonkologických pacientů patří různé představitelé grampozitivních i gramnegativních bakterií, ale také některé druhy hub.³⁹ Nadměrné podávání antibiotik k prevenci nebo léčbě vzniklých infekcí umožňuje selekci rezistentních bakterií, což může následně vést k selhání nasazené antibiotické terapie.^{6, 40}

V předložené bakalářské práci jsme se zabývali genetickou charakterizací souboru enterobakterií, které byly izolovány z klinického materiálu pacientů s leukemií. Z našich výsledků vyplývá, že nejčastěji zachyceným bakteriálním druhem byla *K. pneumoniae*, která byla izolována ze 31 vzorcích, druhou nejhojněji zastoupenou bakterií byla *E. coli* nalezená ve 22 vzorcích klinického materiálu. Nejméně častými byly druhy *C. freundii*, *C. koseri*, *Ent. Aerogenes*, *P. Agglomerans* a *S. Marcescens*. Studie autorů Perola a kol. se zaměřila na retrospektivní analýzu přítomnosti mikroorganismů z odebrání krevních vzorků od hospitalizovaných leukemických pacientů, kteří byli vystaveni chemoterapeutické léčbě a to mezi léty 1992 – 2003. Přítomnost gramnegativních bakterií byla prokázána ve 40 % vzorků. Nejčastěji pak byly zachyceny druhy *E. coli* a *K. pneumoniae*.⁴¹

V důsledku nutnosti přesné a rychlé detekce bakteriálních kmenů rezistentních k používaným antibiotikům dochází neustále k vývoji nových metod pro jejich detekci a to především proto, aby bylo možné co nejrychleji nasadit správný typ léčby. V běžném mikrobiologickém provozu se přednostně používají metody fenotypové, které jsou levné, lehce proveditelné a poměrně rychlé. Na druhé straně ale nejsou schopny definovat přesný typ rezistence. Proto dochází k postupnému zavádění genetických metod i do klasického mikrobiologického provozu. Základem těchto postupů je použití PCR nebo nově real-time PCR. Aby mohlo dojít k co nejefektivnějšímu zhodnocení přítomnosti resp. nepřítomnosti rezistentního agens a nasazení adekvátní antibiotické léčby, je nutné vydat konečný výsledek vyšetření v co nejkratším čase. K tomuto účelu bylo vyvinuto hned několik komerčně dostupných kitů a detekčních systémů, což by mohlo usnadnit a urychlit detekci bakteriální rezistence.^{28,29}

První cíl práce byl zaměřen se na detekci genů kódujících produkci beta-laktamáz u izolovaných enterobakterií a to využitím klasické PCR s následnou separací získaných produktů pomocí gelové elektroforézy. Z výsledků vyplývá, že u izolovaných enterobakterií byly zachyceny všechny typy přítomných beta-laktamáz (TEM, SHV i CTX-M). Nejčastěji zastoupeným genem pak byl *bla*_{TEM} a to buď samostatně nebo v kombinaci s *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M}. Na druhé straně u 35 izolátů nebyla detekována přítomnost žádného ze sledovaných enzymů.

Druhým cílem bylo zhodnocení možnosti využití komerčního kitu GeneProof ESBL PCR kit pro rychlou diagnostiku producentů širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL přímo ze vzorků klinického materiálu od pacientů s leukémií. Komerční kit je založen na genetické identifikaci SHV a CTX-M ESBL přímo z klinického materiálu. Pomocí tohoto detekčního systému dochází k rychlejší a přesnější identifikaci producentů ESBL a to hlavně díky tomu, že není nutná předchozí kultivace přítomných bakterií, kterou jinak vyžaduje klasická PCR.

Z výsledků naší práce vyplývá nesporná výhoda komerčního kitu v rychlé a přesné identifikaci producentů ESBL, jak z časového tak praktického hlediska. Při izolaci DNA není nutná předchozí kultivace přítomných bakterií, čímž se zkracuje detekční čas minimálně o 24 hodin, a také práce s předem namíchanými mastermixy se jeví jako výhodná. Dále odpadá nutnost přenosu naamplifikovaných produktů a jejich

následná separace pomocí gelové elektroforézy, protože výsledky se vyhodnocují na základě porovnání amplifikačních křivek s protokolem uvedeným v příbalovém letáku. V případě detekce CTX-M ESBL byla výsledná míra shody real-time PCR a PCR 83 %. U pěti vzorků klinického materiálu označených jako CTX-M ESBL pomocí GeneProofkitu nebyl nalezen gen, kódující CTX-M beta-laktamázu pomocí klasické PCR. To pravděpodobně poukazuje na vyšší míru citlivosti real-time PCR metody nebo také na to, že z klinického materiálu nebyla izolována ta bakterie, která by obsahovala tento gen. Současný záchyt CTX-M ESBL a SHV ESBL byl podle real-time PCR detekován ve 4 případech. U dvou vzorků nebyl buďto jeden nebo oba geny amplifikovány pomocí PCR. Přikládáme to výše uvedeným důvodům.

K další výhodě GeneProof kitu také patří možnost odlišení enzymů s úzkým a širokým spektrem účinku, tedy SHV-1 od SHV ESBL, což klasická PCR neumožňuje. Je to dáno tím, že u klasické PCR dochází jenom k amplifikaci určitého úseku *bla_{SHV}* genu, zatímco u real-time PCR jsou sledovány specifické mutace, zodpovědné za rozšíření spektra účinku. Na druhé straně, v případě, že se objeví varianta SHV ESBL s novou nebo méně častou mutací, nebude schopen to sledovaný komerční kit zachytit.

K dalším nevýhodám patří nemožnost záchytu TEM ESBL variant, i když v současné době je dominantním celosvětovým typem ESBL CTX-M.²⁶ K poslední nevýhodě patří nemožnost záchytu beta-laktamáz AmpC typu, které mají rovněž schopnost štěpit oxyimino-cefalosporiny. Pomocí fenotypových metod by přítomná bakterie byla označena jako rezistentní k oxyimino-cefalosporinům, zatímco GeneProof ESBL kit by vykazoval nepřítomnost SHV a CTX-M ESBL. Výrobci detekční soupravy jsou si však těchto omezení vědomi a proto v příbalovém letáku uvádějí, že jejich kit nenahrazuje kultivaci ani není určen k vyloučení infekce EBSL kmenem, ale slouží pouze k identifikaci vybraných ESBL genotypů.

6 Experimentální část

6.1 Materiál a metody

6.1.1 Sběr, izolace a identifikace enterobakterií a klinického materiálu

V rámci projektu, který probíhal na Lékařské fakultě Univerzity Palackého (LF UP) v Olomouci pod názvem Comprehensive study at the issue of oncological diseases, byly pacientům hospitalizovaným na Hemato-onkologické klinice (HOK) Fakultní nemocnice Olomouc (FNOL) odebírány vzorky klinického materiálu. Jednalo se o pacienty, kteří byli postiženi jedním ze dvou typů leukémie a to buďto formou ALL (akutní lymfatická leukémie) nebo formou AML (akutní myeloidní leukémie). Sběr vzorků začal v září v roce 2015 a byl ukončen o rok později, v srpnu roku 2016. Odběr vzorků probíhal v pravidelných intervalech, v závislosti od toho jak se jednotliví pacienti dostavili k léčbě na HOK. V rámci pravidelného screeningu jim byl odebírán výtěr z krku, vzorky stolice formou rektálního výtěru a moč, plus další klinický materiál v případech zhoršení zdravotního stavu v důsledku onemocnění.

Pro účely bakalářské práce byl vybrán soubor 95 vzorků klinického materiálu od 28 pacientů HOK. Ty byly následně zaslány na pracoviště Ústavu mikrobiologie LF UP a FNOL, kde byly zpracovány klasickými mikrobiologickými metodami a to podle typu odebraného materiálu. Druhová identifikace přítomných enterobakterií probíhala využitím metody MALDI-TOF-MS. Takto charakterizované izoláty byly následně zamrazeny do kryozkumavek (ITEST plus s.r.o., Česká republika) a uloženy při -80 °C pro další zpracování.

Zbytková část klinického materiálu po mikrobiologickém zpracování byla rovněž zamrazena při -80 °C pro genetické analýzy.

6.1.2 Detekce genů, kódujících produkci vybraných typů beta-laktamáz

První část práce byla zaměřena na detekci *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M} genů ze vzorků DNA izolovaných od jednotlivých enterobakterií. V druhém případě se jednalo o detekci genů, kódujících produkci ESBL typu SHV a CTX-M přímo ze vzorků klinického materiálu.

6.1.2.1 Izolace DNA z bakteriálních kultur

Prvním krokem k izolaci bakteriální DNA bylo vyočkování enterobakterií z kryozkumavky na krevní agar (Trios, Česká republika) a následná kultivace při 35 °C po dobu 24 hodin za účelem získání čisté kultury. Bakteriální DNA byla izolována podle níže uvedeného postupu s využitím komerčního kitu DNA Blood and Tissue kit (QIAGEN, Německo).

1. Přenesení dvou kolonií narostlé kultury do 1,5 ml eppendorfky, do které byl nepipetován 1 ml sterilní vody. Následná centrifugace 10 minut při 7500 rpm. Odstranění supernatantu.
2. Rozsuspendování peletu v 180 µl ATL pufru.
3. Přidání 20 µl proteinázy K, důkladné zvortexování a inkubace při 56 °C po dobu 10 minut při 7500 rpm. Zvortexování zkumavky po dobu 15 s a přidání 200 µl AL pufru současně s 200 µl etanolu (96 %) a následné opětovné zvortexování.
4. Přepipetování směsi do Dneasy Mini spin kolonky, umístěné v 2 ml záchytné kolonce. Centrifugace 1 minutu při 8000 rpm. Vyhození roztoku a záchytné zkumavky.
5. Přemístění Dneasy Mini spin kolonky do nové záchytné zkumavky, přidání 500 µl AW1 pufru a centrifugace po dobu 1 minuty při 8000 rpm. Vyhození roztoku a záchytné zkumavky.
6. Přemístění Dneasy Mini spin kolonky do nové záchytné zkumavky, přidání 500 µl AW2 pufru a centrifugace po dobu 3 minut při 14 000 rpm, aby došlo k vysušení membrány na kolonce.
7. Přemístění Dneasy Mini spin kolonky do nové 1,5 ml centrifugační zkumavky a nepipetování 200 µl pufru AE přímo na membránu kolonky. Inkubace 1 minutu při pokojové teplotě. Centrifugace 1 minutu při 8000 rpm. Zamražení získaného eluentu při – 80 °C.

6.1.2.2 PCR detekce *bla* genů u izolátů enterobakterií

Prvním krokem pro detekci *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M} bylo připravení reakční směsi, tzv. PCR master mixu, složeného z PCR vody (Top – Bio, Česká republika), sady nukleotidů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), *Taq* DNA polymerázy (Top – Bio, Česká republika), 10x koncentrovaného reakčního pufru s hořčíkem skládajícího se z 10 mM Tris/HCl, 500 mM KCl, 1% Triton X – 100, 15 mM MgCl₂ (Top – Bio, Česká

republika), sady primerů (forward a reverse)(East Port, Česká republika). Jednotlivé množství všech PCR složek je uvedeno v tabulce 5, charakterizaci použitých primerů uvádí tabulka 6.

Tabulka 5: Jednotlivé složky PCR reakce a jejich výsledné koncentrace

PCR komponenty	Obsah jednotlivých složek	Výsledná koncentrace
PCR voda	20,7 μ l	
dNTPs	0,2 μ l	200 μ M
Primer forward	0,2 μ l	0,8 μ M
Primer reverse	0,2 μ l	0,8 μ M
PCR pufr + MgCl ₂	2,5 μ l	1x + c (Mg ²⁺) = 1,5 mM
<i>Taq</i> polymeráza	0,2 μ l	1 U
Templátová DNA	1 μ l	

Tabulka 6: Sekvence oligonukleotidových primerů použitých pro detekci *bla* genů u enterobakterií

Beta-laktamázy	Primer forward	Velikost
	Primer reverse	
SHV ⁴²	5'-CTTTACTCG CCTTTATCG-3' 5'-TCCCCGAGATAAATCACCA-3'	827 bp
TEM ⁴³	5'-GCGGAACCCCTATTTG-3' 5'-ACCAATGCTTAATCAGTGAG-3'	964 bp
CTX-M ⁴⁴	5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGT-3' 5'-TGGGTRAARTARGTSACCAGA-3'	593 bp

Připravený Master mix byl poté rozpipetován do jednotlivých jamek PCR stripů po 24 μ l a do každé jamky byl přidán 1 μ l bakteriální DNA. Stripy byly následně po uzavření a krátké centrifugaci vloženy do přístroje (LightCycler 96, Roche, Německo). Průběh a jednotlivé kroky PCR reakce jsou shrnuty v tabulce 7. Použité pozitivní kontroly uvádí tabulka 8. Jako kontrola kvality byla použita tzv. negativní kontrola (tj. voda bez obsahu bakteriální DNA).

Tabulka 7: Průběh PCR reakce pro *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} a *bla*_{SHV} geny

Jednotlivé kroky reakce	Počet cyklů	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	1	95 °C	7 min
Denaturace	30	95 °C	30 s
Hybridizace primerů		58 °C	30 s
Elongace		72 °C	1 min
Závěrečná elongace	1	72 °C	7 min

Tabulka 8: Použité pozitivní kontroly během PCR reakce

Typ beta-laktamázy	
CTX-M	<i>Escherichia coli</i> NCTC 13400 (<i>bla</i> _{CTX-M-15})
TEM	<i>Escherichia coli</i> NCTC 13351 (<i>bla</i> _{TEM-3})
SHV	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 13368 (<i>bla</i> _{SHV-18})

6.1.2.3 Separace v agarózovém gelu

Po ukončení PCR reakce byly amplikony podrobeny separaci v agarózovém gelu. Pro přípravu gelu byly použity komponenty zmíněné v tabulce 9.

Tabulka 9: Rozpis jednotlivých složek pro přípravu agarózového gelu

Složky	Množství
10 x TBE pufr	10 ml
Agaróza	1,5 g
Destilovaná voda	90 ml

Prvním krokem při separaci v agarózovém gelu bylo navážení přesného množství agarózy (Serva, Německo). To bylo za tepla rozpuštěno v 10x zředěném TBE pufru (Biotech, Česká republika). Po ochlazení připravené směsi bylo přidáno 5 μ l Sybersafe barvičky (Thermo Fischer Scientific, USA) a vzniklá směs byla vlita do předem připravené vaničky o objemu 250 ml a nechala se polymerizovat na vzduchu. Ztuhlý agarózový gel byl přelit již připraveným separačním pufrům 1x TBE (Biotech, Česká

republika). Následně bylo smícháno 10 µl amplifikované DNA s 2 µl nanášecího pufru (Top-Bio, Česká republika) a naneseno do gelu. Délka separace trvala 90 minut při napětí 100 V. Po ukončení separace v agarózovém gelu byly amplikony vizualizovány pomocí transiluminátoru pod UV světlem. Velikost jednotlivých fragmentů byla stanovena pomocí DNA markeru s rozsahem fragmentů 200 – 1500 bp (Top-Bio, Česká republika). Velikost jednotlivých produktů uvádí tabulka 6.

6.1.2.4 Izolace celkové DNA ze vzorků klinického materiálu

Prvním krokem izolačního postupu bylo důkladné zvortexování rozmraženého klinického materiálu. Následně bylo odebráno 200 µl vzorku do 1,5 ml eppendorfky. K tomuto množství materiálu bylo přidáno 10 µl interního standartu, který byl součástí kitu GeneProof ESBL PCR Kit (GeneProof, Česká republika) a 180 µl AL pufru, s následným zvortexováním. Další postup byl shodný s postupem při izolaci DNA z bakteriální kultury od kroku č. 3 po krok č. 6 (viz 6.1.2.1 izolace DNA z bakteriálních kultur). V posledním kroku došlo k přemístění Dneasy Mini spin kolonky do nové 1,5 ml centrifugační zkumavky a napipetování 50 µl AE pufru přímo na membránu kolonky. Eppendorfka byla inkubována po dobu 1 minuty při pokojové teplotě s následnou centrifugací 1 minutu při 8000 rpm, aby došlo k eluci. Postup byl opakován s dalšími 50 µl AE pufru. Celkově tak bylo získáno 100 µl eluentu.

6.1.2.5 Real-time PCR detekce *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M} genů pomocí GeneProof ESBL kitu

Prvním krokem bylo rozpipetování mastermixu, který byl dodán výrobcem, podle postupu uvedeného v návodu k použití. Do jednotlivých jamek PCR stripů bylo napipetováno 30 µl příslušného mastermixu (jednak pro SHV a jednak pro CTX-M ESBL), dále bylo přidáno 10 µl předem vyizolované DNA. Do poslední jamky každé reakce bylo napipetováno 10 µl pozitivní kontroly (společné pro SHV i CTX-M ESBL). Uzavřené stripy byly krátce zcentrifugovány a následně vloženy do přístroje (LightCycler 96, Roche, Německo). Průběh PCR reakce včetně jednotlivých cyklů, je popsán v tabulce 10.

Tabulka 10: Real-time PCR detekce *bla_{SHV}* a *bla_{CTX-M}* genů pomocí GeneProof ESBL kitu

Jednotlivé kroky	Teplota	Čas	Detekovaný kanál	Počet cyklů
Hold	37 °C	2 min		1
Hold	95 °C	10 min		1
PCR	95 °C	5 s		45
	64 °C	40 s	FAM + HEX + Cy5	
	72 °C	20 s		

7 Závěr

Cílem předložené bakalářské práce byla genetická charakterizace souboru enterobakterií izolovaných z různých druhů klinického materiálu od pacientů s ALL nebo AML. Z celkového počtu 101 izolátů představovala *K. pneumoniae* nejčastěji zastoupený druh a to u 31 vzorků. Ve většině případů se jednalo o výtěry z krku a vzorky stolice. Druhou nejvíce zastoupenou enterobakterií byla *E. coli*, získána ze 22 vzorků klinického materiálu a to hlavně z moči a ze vzorků stolice.

S využitím klasické PCR a sady specifických primerů byla u 66 izolátů enterobakterií potvrzena přítomnost *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M} genů nebo jejich vzájemných kombinací. Ve 14 případech daná enterobakterie dokonce produkovala všechny typy sledovaných beta-laktamáz (TEM, SHV i CTX-M typ).

Dalším cílem bylo zhodnocení možnosti využití komerčního kitu GeneProof ESBL PCR kit pro rychlou diagnostiku producentů širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL přímo ze vzorků klinického materiálu od pacientů s leukémií. V porovnání s klasickou PCR, kdy v průběhu reakce dochází pouze k amplifikaci určitého úseku DNA a prokazuje se pouze přítomnost resp. nepřítomnost daného genu, komerční kit umožňuje také zachytit mutace v specifických pozicích, zodpovědných za rozšíření spektra účinku. Tím je schopen přímo potvrdit nebo vyvrátit výsledný ESBL fenotyp. U GeneProof kitu také dochází k detekci vybraného mechanismu bakteriální rezistence přímo z klinického materiálu. Tímto se metoda stává rychlejší a v mnoha ohledech i citlivější, vzhledem k tomu, že nevyžaduje přítomnost životaschopné bakterie, jenom její DNA. Na druhé straně má kit i několik limitací. Zaměřuje se pouze na detekci nejrozšířenějších typů enzymů bakteriální rezistence a to SHV a CTX-M beta-laktamáz. V případě přítomnosti bakterií produkujících TEM nebo AmpC enzymy s rozšířeným spektrem účinku by výsledek byl falešně negativní. Rovněž naše výsledky potvrdily několik nesrovnalostí mezi výsledky klasické PCR a real-time PCR.

8 Seznam použitých zkratek

ALL	akutní lymfatická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
<i>bla</i>	gen kódující beta-laktamázu
bp	pár bází
BES	typ beta-laktamázy
CLSI	Clinical Laboratory Standart Institute
CTX-M	typ beta-laktamázy
Cy5	Cyanine 5, typ fluorescenční barvičky
dATP	deoxyadenosin trifosfát
dCTP	deoxycytidin trifosfát
DDST	Double Disc Synergy Test
dGTP	deoxyguanosin trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleotid trifosfáty
dTTP	deoxytymidin trifosfát
ESBL	extended – spectrum beta – lactamases, beta-laktamázy s rozšířeným spektrem účinku
FAM	fluorescein amidite, typ fluorescenční barvičky
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
GES	typ beta-laktamázy
HEX	hexachloro-fluorescein, typ fluorescenční barvičky

HCl	kyselina chlorovodíková
HOK	Hemato – onkologická klinika
KCl	chlorid draselný
LF UP	Lékařská fakulta Univerzity Palackého
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MgCl ₂	chlorid hořečnatý
OXA	typ beta-laktamázy
PBPs	penicilin binding protein, penicilin vázající proteiny
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
PER	typ beta-laktamázy
SHV	typ beta-laktamázy
TBE	Tris/Borát/EDTA pufr
TEM typ	typ beta-laktamázy
TLA	typ beta-laktamázy
rpm	revolutions per minute, počet otáček za minutu
SFO	typ beta-laktamázy
VEB	typ beta-laktamázy

9 Literatura

- (1) Chandran, R.; Hakki, M.; Spurgeon, S. Azevedo, L. *Sepsis - An Ongoing and Significant Challenge*; In Tech: Rijeka, **2012**.
- (2) Du, B.; Long, Y.; Liu, H.; Chen, D.; Liu, D.; Xu, Y.; Xie, X. *Intensive Care Med.* **2002**, *28*, 1718–1723.
- (3) Liu, H.; Zhao, J.; Xing, Y.; Li, M.; Du, M.; Suo, J.; Liu, Y. *PLoS One* **2014**, *9*, e113506.
- (4) Tan, S. Y.; Tatsumura, Y. *Singapore Med. J.* **2015**, *56*, 366–367.
- (5) Abraham, E. P.; Chain, E. *Nature* **1940**, *146*, 837.
- (6) Alekshun, M. N.; Levy, S. B. *Cell* **2017**, *128*, 1037–1050.
- (7) Votava, M.kapitola. *Lékařská mikrobiologie speciální*; Neptun, **2003**.
- (8) Beneš, J. *Infekční lékařství*; Galén: Praha, **2009**.
- (9) Bednář, M., Fraňková, V., J., Souček, A., Vávra, J. *Lékařská mikrobiologie*; Marvil: Praha, **1996**.
- (10) Spellberg, B.; Gilbert, D. N. *Clin. Infect. Dis.* **2014**, *59*, 71–75.
- (11) Chinedum, I. E. *African J. Biotechnol.* **2005**, *4*, 1606–1611.
- (12) Bennett, P. M. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 347–357.
- (13) Woodford, N.; Ellington, M. J.; Radman, M.; Fons, M.; Taddei, F. *Clin. Microbiol. Infect.* **2007**, *13*, 5–18.
- (14) Delcour, A. H. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1794*, 808–816.
- (15) Webber, M. A.; Piddock, L. J. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, 9–11.
- (16) Lambert, P. A. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1471–1485.
- (17) Hrabák, J. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* **2007**, *3*, 103–111.

- (18) Livermore, D. M. *Clin. Microbiol. Rev.* **1995**, *8*, 557–584.
- (19) Wright, G. D. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1451–1470.
- (20) Ambler, R. P. *Phil. Trans. R. Soc. B* **1980**, *289*, 321–331.
- (21) Bush, K.; Jacoby, G. A.; Medeiros, A. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 1211–1233.
- (22) Gniadkowski, M. *Clin. Microbiol. Infect.* **2001**, *7*, 597–608.
- (23) Bois, S. K. Du; Marriott, M. S.; Amyes, S. G. B. *J. Antimicrob. Chemother.* **1995**, *35*, 7–22.
- (24) Sobhan Ghafourian, Nourkhoda Sadeghifard, S. S. and Z. S. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2015**, *17*, 11–22.
- (25) Bradford, P. A. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, *14*, 933–951.
- (26) Rossolini, G. M.; D’Andrea, M. M.; Mugnaioli, C. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**, *14*, 33–41.
- (27) Paterson, D. L.; Bonomo, R. A. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18*, 657–686.
- (28) Sedlakova, M. H.; Hanulik, V.; Chroma, M.; Hricova, K.; Kolar, M.; Schaumann, R.; Rodloff, A. C. *Med. Sci. Monit.* **2011**, *17*, 147–152.
- (29) Fluit, A. C.; Visser, M. R.; Schmitz, F. J. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, *14*, 836–871.
- (30) Ishmael, F. T.; Stellato, C. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **2008**, *101*, 437–443.
- (31) Petrosino, J. F.; Highlander, S.; Luna, R. A.; Gibbs, R. A.; Versalovic, J. *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 856–866.
- (32) Ng, P. C.; Kirkness, E. F. *Genetic variation*; Springer: London, **2010**.
- (33) Ubukata, K.; Nakagami, S.; Nitta, A.; Yamane, A.; Kawakami, S.; Sugiura, M.; Konno, M. *J. Clin. Microbiol.* **1992**, *30*, 1728–1733.
- (34) Persing H. David, Tenover C., Fred, Versalovic, J. *Molecular Microbiology: diagnostic principles and practice* 2nd ed.; ASM press: Washington, **2004**.

- (35) Kothari, A.; Sagar, V.; Ahluwalia, V.; Pillai, B. S.; Madan, M.; Edmond, M. B. *J. Hosp. Infect.* **2009**, *71*, 143–148.
- (36) Lyytikäinen, O.; Lumio, J.; Sarkkinen, H.; Kolho, E.; Kostiala, A.; Ruutu, P.; Team, H. I. S. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *35*, 14–19.
- (37) Velasco, E.; Soares, M.; Byington, R.; Martins, C. A. S.; Schirmer, M.; Dias, L. M. C.; Gonçalves, V. M. S. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2004**, *23*, 596–602.
- (38) Tumbarello, M.; Spanu, T.; Caira, M.; Treccarichi, E. M.; Laurenti, L.; Montuori, E.; Fianchi, L.; Leone, F.; Fadda, G.; Cauda, R. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2009**, *64*, 320–326.
- (39) Collin, B. A.; Leather, H. L.; Wingard, J. R.; Ramphal, R. *Clin. Infect. Dis.* **2001**, *33*, 947–953.
- (40) Huoi, C.; Vanhems, P.; Nicolle, M.-C.; Michallet, M.; Bénét, T. *PLoS One* **2013**, *8*, e58121.
- (41) Perola, O.; Nousiainen, T.; Pentikäinen, J.; Laatikainen, A.; Katila, M. L. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2005**, *24*, 766–768.
- (42) Chanawong, A.; M'Zali, F. H.; Heritage, J.; Lulitanond, A.; Hawkey, M. P. *Microb. Lett.* **2000**, *184*, 85–89.
- (43) Olesen, I.; Hasman, H.; Aerestrup, F. M. *Microb. Drug Resist.* **2004**, *10*, 334–340.
- (44) Pagani, L.; Dell'Amico, E.; Migliavacca, R.; D'Andrea, M. M.; Giacobone, E.; Amicosante, G.; Romero, E.; Rossolini, G. M. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 4264–4269.