



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Identifikace a charakterizace**

**beta-laktamáz s rozšířeným spektrem účinku  
(ESBL) u bakterií**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Hana Chudobová</b>
Studijní program:	N1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Patrik Mlynářčík, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2021

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Hana Chudobová
Název práce	Identifikace a charakterizace beta-laktamáz s rozšířeným spektrem účinku (ESBL) u bakterií
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Ústav mikrobiologie
Vedoucí práce	Mgr. Patrik Mlynářčík, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	<p>Narůstající bakteriální rezistence na dostupná beta-laktamová antibiotika je velmi vážným problémem v oblasti veřejného zdraví, zejména z důvodu produkce širokého spektra beta-laktamáz. Diplomová práce je zaměřena na beta-laktamázy s rozšířeným spektrem účinku (ESBL). Cílem práce bylo navrhnout PCR test na rychlou detekci genů kódujících ESBL, analyzovat ESBL-produkující bakterie se zaměřením na genetickou charakterizaci přítomných enzymů a <i>in silico</i> analýza vybraných ESBL enzymů. Celkově bylo vyšetřeno 99 kmenů enterobakterií a Gram-negativních nefermentujících bakterií rezistentních k ceftazidimu a cefotaximu. Ke screeningu ESBL genů byla využita PCR amplifikace použitím specifických párů primerů. Sekvenční analýza a designování primerů bylo provedeno použitím bioinformatického softwaru Geneious Prime. Celkem bylo navrženo 56 párů primerů pro detekci 37 typů různých ESBL genů, z čehož 16 specifických párů bylo experimentálně otestovaných v <i>in vitro</i> podmínkách. Po vzájemném porovnání aminokyselinových sekvencí ESBL (CTX-M, SHV a TEM) byly na základě přítomnosti zachovaných aminokyselin a homologních motivů vytvořeny fylogenetické stromy. Tato studie poukazuje na přítomnost různých ESBL genů u vybraných bakterií animálního původu a navrhovaný soubor primerů by měl být schopen specificky detekovat více než 99,8 % všech popsaných ESBL enzymů.</p>
Klíčová slova	beta-laktamáza, ESBL, antibiotická rezistence, bakterie, PCR, primer
Počet stran	61
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Hana Chudobová
Title of thesis	Identification and characterization of extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in bacteria
Type of thesis	Diploma
Department	Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, Department of Microbiology
Supervisor	Mgr. Patrik Mlynářčík, Ph.D.
The year of presentation	
Abstract	<p>The growing bacterial resistance to available beta-lactam antibiotics is a very serious public health problem, especially due to the production of a wide range of beta-lactamases. This thesis is focused on extended-spectrum beta-lactamases (ESBL). The aim of this work was to design a PCR test for rapid detection of genes encoding ESBL, to analyze ESBL-producing bacteria with a focus on genetic characterization of the enzymes present and <i>in silico</i> analysis of selected ESBL enzymes. A total of 99 strains of enterobacteria and Gram-negative non-fermenting bacteria resistant to ceftazidime and cefotaxime were examined. PCR amplification using specific primer pairs was used to screen for ESBL genes. Sequence analysis and primer design were performed using Geneious Prime bioinformatics software. A total of 56 primer pairs were designed to detect 37 types of different ESBL genes, of which 16 specific pairs were experimentally tested <i>in vitro</i>. After comparing the amino acid sequences of ESBL (CTX-M, SHV and TEM), phylogenetic trees were created based on the presence of conserved amino acids and homologous motifs. This study indicates the presence of different ESBL genes in selected bacteria of animal origin and the proposed primer set should be able to specifically detect more than 99.8% of all described ESBL enzymes.</p>
Keywords	beta-lactamase, ESBL, antibiotic resistance, bacteria, PCR, primer
Number of pages	61
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci s názvem „Identifikace a charakterizace beta-laktamáz s rozšířeným spektrem účinku (ESBL) u bakterií“ vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

„Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Mgr. Patrikovi Mlynářčikovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu, trpělivost a v neposlední řadě za vstřícnost, kterou mi v průběhu zpracování práce věnoval.“

# Obsah

<b>Seznam zkratk</b> .....	8
<b>1 Úvod</b> .....	9
<b>2 Cíle práce</b> .....	10
<b>3 Současný stav řešené problematiky</b> .....	11
3.1 Charakteristika patogenů .....	11
3.1.1 Čeleď <i>Enterobacteriaceae</i> .....	11
3.1.2 Charakteristika vybraných zástupců nefermentujících Gram-negativních bakterií .....	12
3.2 Stručný přehled beta-laktamových antibiotik .....	13
3.3 Bakteriální antimikrobiální rezistence .....	14
3.4 Mechanismy rezistence k beta-laktamovým antibiotikům .....	15
3.4.1 Modifikace cílového místa .....	15
3.4.2 Aktivní vyčerpávání antibiotika (efluxní pumpy) .....	15
3.4.3 Změna propustnosti vnější membrány .....	16
3.4.4 Enzymatická inaktivace antibiotika .....	16
3.5 Beta-laktamázy .....	17
3.5.1 Klasifikace beta-laktamáz .....	17
3.5.2 Beta-laktamázy typu AmpC .....	18
3.5.3 Karbapenemázy .....	20
3.5.3.1 Molekulární třída A karbapenemázy .....	20
3.5.3.2 Metallo-beta-laktamázy .....	21
3.5.3.3 Molekulární třída D karbapenemázy .....	21
3.5.4 Oxacilinázy .....	22
3.5.5 Beta-laktamázy s rozšířeným spektrem účinku .....	22
3.5.5.1 SHV beta-laktamázy .....	23
3.5.5.2 TEM beta-laktamázy .....	24
3.5.5.3 OXA beta-laktamázy .....	25
3.5.5.4 CTX-M beta-laktamázy .....	25
3.5.5.5 Minoritní typy ESBL .....	27
3.5.5.6 Globální epidemiologie ESBL .....	27
3.5.5.7 Epidemiologie ESBL v České republice .....	29
<b>4 Experimentální část</b> .....	30
4.1 Materiál .....	30
4.1.1 Bakteriální izoláty a kultivace .....	30
4.1.2 Chemikálie .....	31

4.1.3	Laboratorní vybavení a softwary .....	31
4.2	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy .....	32
4.2.1	Sekvenční analýza.....	32
4.2.2	Zhotovení fylogenetických stromů .....	32
4.2.3	Navrhování primerů pro polymerázovou řetězovou reakci .....	32
4.2.4	Podmínky izolace a amplifikace bakteriální DNA pomocí hot-start polymerázové řetězové reakce .....	37
4.2.5	Rozdělení amplifikačních produktů pomocí elektroforézy .....	38
4.3	Výsledky .....	39
4.3.1	<i>In silico</i> analýza ESBL enzymů.....	39
4.3.2	Bodové mutace u vybraných ESBL enzymů .....	46
4.3.3	Výskyt ESBL-pozitivních Gram-negativních bakterií v animálních vzorcích .....	46
4.4	Diskuze.....	48
<b>5</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>53</b>
	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>54</b>

## Seznam zkratk

ATB	antibiotikum
BLDB	<i>beta-lactamase database</i>
CARBA	karbapenemáza
cESBL	<i>extended-spectrum beta-lactamase</i> třídy C
EARS-net	<i>European Antimicrobial Resistance Surveillance Network</i>
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
EPI	<i>efflux pump inhibitor</i>
ESBL	<i>extended-spectrum beta-lactamase</i>
GNNF	Gram-negativní nefermentující bakterie
MBL	metalo-beta-laktamáza
MCR	<i>mobilized colistin resistance</i>
MDR	<i>multidrug resistance</i>
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NDM	New Delhi metalo-beta-laktamáza
OXA	oxacilináza
PBP	<i>penicillin-binding protein</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RND	<i>resistance-nodulation-division</i>
RT-PCR	<i>real-time polymerase chain reaction</i>



# 1 Úvod

Bakterie představují neodmyslitelnou součást lidského života. Mnohé jsou prospěšné a tvoří přirozenou mikroflóru člověka, jiné mohou za určitých okolností způsobovat závažná infekční onemocnění ohrožující život pacienta. Z tohoto důvodu se lidstvo snaží proti těmto bakteriálním patogenům bojovat, a to zejména pomocí antibiotik. S vývojem celé řady nových antibiotik souviselo i rozšíření bakterií, které jsou vůči nim odolné tzv. rezistentní. V současnosti se stále častěji při léčbě infekcí objevuje problém bakteriální rezistence, který je prohlubován nesprávným či nadměrným užíváním antibiotik a jehož důsledkem je neúčinnost antibiotické léčby a v nejhorším případě i smrt pacienta. Bakteriální rezistence k antibiotikům zasahuje nejen do oblasti zdravotnictví, ale má vliv také například na ekonomiku.

Mechanismů, které si bakteriální patogeny vyvinuly v boji proti antibiotiku, je mnoho a jedním z nich je produkce enzymů degradujících příslušnou antibakteriální látku. V případě beta-laktamů se hovoří o tzv. beta-laktamázách, jejichž působení a rozdělení je popsáno v teoretické části diplomové práce. Důraz je kladen zejména na beta-laktamázy s rozšířeným spektrem účinku (z angl. *Extended-Spectrum Beta-Lactamase*, ESBL), které jsou schopné inaktivovat více typů beta-laktamových antibiotik (například peniciliny, cefalosporiny I.-IV. generace či monobaktamy). V současnosti je známo více než 593 různých ESBL uvedených v databázi BLDB (z angl. *Beta-Lactamase Database*).

V experimentální části bylo analyzováno 99 kmenů Gram-negativních bakterií pocházejících z kuřecích farem a jatek na Moravě na přítomnost ESBL genů. K detekci pomocí PCR bylo použito 16 párů specifických oligonukleotidů navržených pomocí bioinformačního softwaru Geneious. Mimo to bylo navrženo dalších 40 párů primerů, které nebyly experimentálně testovány. V případě tří velkých skupin ESBL (CTX-M, SHV a TEM) byly po porovnání aminokyselinových sekvencí vytvořeny fylogenetické stromy znázorňující příbuznost jednotlivých podtypů ESBL.

## 2 Cíle práce

Cílem diplomové práce je zvládnutí metod používaných na školicím pracovišti, včetně teoretických základů a práce s genetickými databázemi.

### **Teoretická část:**

- Práce s odbornou literaturou a zpracování rešerše na téma beta-laktamáz rozšířeným spektrem účinku (ESBL).

### **Praktická část:**

- Izolace nukleových kyselin z vybraných Gram-negativních bakterií.
- Provádění PCR experimentů a vyhodnocení výsledků.
- Navrhování primerů použitím bioinformatického softwaru, *in silico* analýza enzymů.

## 3 Současný stav řešené problematiky

### 3.1 Charakteristika patogenů

Většina mikroorganismů je pro rostliny i živočichy prospěšná, některé však mají schopnost vyvolat u hostitelského organismu onemocnění. Tyto mikroorganismy se označují termínem patogeny (Madigan *et al.*, 2018). Patogeny tvoří rozmanitou skupinu organismů, do které se řadí zejména bakterie, dále také viry, prvoci, kvasinky a plísně (Votava *et al.*, 2007).

#### 3.1.1 Čeleď *Enterobacteriaceae*

Čeleď *Enterobacteriaceae* tvoří Gram-negativní fermentující bakterie nacházející se zejména ve střevním traktu živočichů včetně člověka. Jedná se o poměrně obsáhlou čeleď zahrnující více než čtyřicet rodů. Jednotlivé druhy mohou být obligátně patogenní, patřící do rodů *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, nebo oportunně patogenní, kam lze zařadit například rody *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* či *Serratia* (Votava *et al.*, 2007).

Nejčastějšími původci lidských infekcí z rodu *Citrobacter* jsou enterobakterie *Citrobacter freundii* a *Citrobacter koseri*. Tyto oportunní patogeny je možné nalézt v potravě, ve vodě, v půdě či ve střevech zvířat včetně člověka. *C. freundii* je za určitých okolností schopen u člověka vyvolat infekce močových cest, dýchacích cest, jater, endokardu a další onemocnění. Tato bakterie se šíří zejména v nemocničním prostředí a u pacientů vyvolává infekce chirurgických ran a meningitidu. Významnou komplikací léčby infekcí je produkce beta-laktamáz některými kmeny, což vede ke zvýšení úmrtnosti ve srovnání s kmeny citlivými na účinek antibiotik (ATB; Liu *et al.*, 2018).

Mezi enterobakterie je řazen také rod *Serratia*, pro člověka je významný zejména druh *Serratia marcescens* způsobující závažné infekce dýchacích a močových cest (Mahlen, 2011). Jedním z méně známých druhů rodu *Serratia* je *Serratia fonticola*. Tato bakterie se vyskytuje převážně u zvířat, velmi vzácně způsobuje infekční onemocnění u člověka. Nejčastěji se objevuje jako původce infekcí měkkých tkání a kůže či močových cest. Nedávno bylo zjištěno, že může způsobovat také infekce žlučových cest (Hai *et al.*, 2020). Více informací o námi studovaných enterobakteriích je uvedeno v diplomové práci z roku 2019 (Chalachanová, 2019).

### 3.1.2 Charakteristika vybraných zástupců nefermentujících Gram-negativních bakterií

Základní charakteristika *Acinetobacter baumannii* je uvedena v diplomové práci z roku 2019 (Chalachanová, 2019). Dalším zástupcem Gram-negativních nefermentujících (GNNF) bakterií je rod *Pseudomonas*, konkrétně druh *Pseudomonas aeruginosa*. Tuto oportunní bakterii lze nalézt hlavně v nemocničním prostředí (zejména na jednotkách intenzivní péče), ale i v prostředí komunitním. Zřídka je součástí normální lidské mikrobiální flóry, avšak riziko kolonizace se výrazně zvyšuje u pacientů se sníženou imunitou, s porušenou kožní či slizniční bariérou, po chirurgickém zákroku apod. Tento patogen bývá hlavní příčinou nozokomiální pneumonie, způsobuje také infekce močových cest a krevního řečiště. Léčbu infekcí způsobených *P. aeruginosa* komplikuje její schopnost rychle si vyvinout rezistenci na více antibakteriálních léčiv. Průběh infekce se zhoršuje, prodlužuje se délka pobytu v nemocnici, zvyšují se i celkové náklady na léčbu a v nejhorším případě tento stav končí smrtí pacienta (Lister *et al.*, 2009).

Gram-negativní oportunní patogen *Stenotrophomonas maltophilia* patřící do rodu *Stenotrophomonas* byl izolován zejména z vodního prostředí (jezera, řeky) nebo ze zdrojů souvisejících s vodou (čističky odpadních vod, roztoky kontaktních čoček, vodovodní baterie a mnoho dalších). Tato bakterie byla také identifikována na povrchu materiálů používaných například v intravenózních kanylách, kde vytváří tzv. biofilm. *S. maltophilia* se projevila jako významný původce infekcí dýchacích cest, močových cest, kostí a kloubů, očních infekcí a dalších (Brooke, 2012).

Rod *Ochrobactrum* patřící do skupiny GNNF bakterií je široce rozšířen v životním prostředí zahrnujícím vodu, půdu, rostliny a živočichy včetně člověka. Nejběžnějším zástupcem je *Ochrobactrum anthropi*, později byl identifikován další druh označený jako *Ochrobactrum intermedium*. Infekce způsobené *O. intermedium* nejsou časté, nicméně vzhledem k obtížnému odlišení od *O. anthropi* může docházet k záměnám a zkreslování údajů. *O. intermedium* se projevuje jako oportunní patogen vykazující multirezistentní vlastnosti a vyskytující se převážně u imunokompromitovaných jedinců (Apisarnthanarak *et al.*, 2005).

Nepohyblivé nefermentující bakterie rodu *Myroides* (dříve klasifikované jako *Flavobacterium odoratum*) jsou vzácnými oportunními patogeny. Tento rod zahrnuje zejména dva druhy, *Myroides odoratus* a *Myroides odoratimimus*. Způsobují obtížně léčitelné infekce kvůli jejich vysoké rezistenci k mnoha antibakteriálním látkám. Infekce propuká většinou u jedinců se sníženou imunitou, ale byly hlášeny i případy postihující

imunokompetentní jedince. Jedním z případů byla infekce způsobená druhem *M. odoratimimus* u dítěte po prasečím kousnutí, důsledkem byl rozvoj cellulitis s tvorbou abscesů (Maraki *et al.*, 2012).

## 3.2 Stručný přehled beta-laktamových antibiotik

Název beta-laktamových ATB je odvozen od přítomnosti charakteristické čtyřčlenné struktury tzv. beta-laktamového kruhu, který je nezbytný pro jejich antibakteriální aktivitu. Beta-laktamy jsou nejpoužívanější skupinou antibakteriálních látek. Více informací o jejich toxicitě a mechanismu účinku je popsáno v diplomové práci z roku 2019 (Chalachanová, 2019).

Klasifikace beta-laktamů vychází z jejich chemické struktury; podle počtu beta-laktamových kruhů ve své struktuře se dělí na čtyři hlavní skupiny. Jeden beta-laktamový kruh obsahuje skupina s názvem monobaktamy, u penicilinů a karbapenemů došlo k fúzi kruhu s pětičlenným penemovým kruhem a cefalosporiny jsou složeny z šestičlenného cefemového kruhu. Velkou část penicilinů tvoří deriváty kyseliny 6-aminopenicilanové získané z plísně rodu *Penicillium*, avšak v dnešní době se většinou tato ATB vyrábí semisyntetickými procesy zahrnující fermentaci. Prvním klinicky užívaným beta-laktamem byl penicilin G s nízkým spektrem účinku, jeho účinek působí zejména na Gram-pozitivní a Gram-negativní koky. Semisyntetické peniciliny (aminopeniciliny, karboxypeniciliny a ureidopeniciliny) mají širší spektrum, což umožňuje proniknout přes vnější membránu některých Gram-negativních bacilů. Cefalosporinová ATB jsou odvozena od kyseliny 7-aminocefalosporanové získané z plísně rodu *Cephalosporium*. Tato skupina je klasifikována podle generace (I.-V.). Obecně platí, že cefalosporin vyšší generace má lepší účinek na Gram-negativní bakterie, ale zároveň klesá jeho účinnost proti Gram-pozitivním bakteriím. Nejširší spektrum ze všech beta-laktamových ATB mají karbapenemy jako jsou imipenem a meropenem. Jejich baktericidní účinek dobře působí na streptokoky a stafylokoky, kromě toho jsou aktivní také proti Gram-negativním tyčinkám a obligátním anaerobům. Jediným dostupným a klinicky využívaným monobaktamem je aztreonam, který má spektrum omezené na aerobní a fakultativně anaerobní Gram-negativní bakterie. Výhodou aztreonamu je vysoký stupeň rezistence vůči hydrolýze beta-laktamázi (Votava *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2004).

### 3.3 Bakteriální antimikrobiální rezistence

Bakteriální rezistence k ATB je stále se prohlubujícím nejen zdravotním, ale také ekonomickým problémem a úzce souvisí s častějším používáním ATB v klinické praxi. Antibiotika v medicíně způsobila revoluci a díky nim bylo zachráněno nespočet životů. S objevem ATB byly také objeveny mechanismy rezistence bakterií. Zanedlouho po zavedení penicilinu do praxe byl identifikován penicilin-rezistentní kmen *Staphylococcus aureus*. Řešením se zdálo být použití methicilinu (první antirezistentní ATB), avšak došlo k rozvoji další rezistence a vzniku methicilin rezistentní formy *S. aureus* (MRSA; Davies and Davies, 2010). Bakterie rezistentní proti více ATB lépe přežívají, jsou odolnější a šíří se po celém světě. Tímto způsobem dochází k selhávání lékařské péče při léčbě infekčních onemocnění a celkové krizi v oblasti veřejného zdraví (Aleksun and Levy, 2007).

Bakterie se vyznačují různým stupněm citlivosti nebo rezistence na konkrétní ATB. Tento stupeň lze stanovit pomocí minimální inhibiční koncentrace léčiva (MIC), která zabraňuje růstu bakterií. Pokud daná koncentrace ATB neinhibuje bakteriální růst, jedná se o rezistentní populaci bakterií. Bakteriální rezistenci lze rozdělit do dvou základních skupin, a to přirozenou a získanou. Přirozená rezistence se vyznačuje absencí nebo sníženou citlivostí cílové struktury ATB (Reygaert, 2018). Typickým příkladem přirozené rezistence je nepřítomnost buněčné stěny u mykoplasmat, což zabraňuje účinku beta-laktamových ATB blokujících syntézu buněčné stěny (Coculescu, 2009). Získaná rezistence je buď způsobena mutacemi v genech zaměřených na ATB nebo přenesením genu rezistence. Tyto geny jsou mobilní a mohou se přenášet mezi jednotlivými bakteriemi pomocí genetických elementů jako jsou bakteriofágy, plazmidy, transpozony. Tímto způsobem se původně citlivý bakteriální kmen stane rezistentním (Levy and Marshall, 2004).

Mechanismy bakteriální rezistence lze rozdělit do čtyř hlavních kategorií. Těmito čtyřmi mechanismy jsou aktivní vyčerpávání (efflux) ATB z buňky, zhoršený průnik ATB do buňky, enzymatická inaktivace ATB a modifikace cílového místa. Navíc byl nedávno popsán nový mechanismus rezistence na ATB, který spočíval ve změně tvaru a velikosti bakterií v přítomnosti ATB. V krátkosti bylo zjištěno u *Caulobacter crescentus*, že zvýšení šířky a zakřivení buněk podporuje rychlejší růst bakterií při inhibici syntézy proteinů kvůli chloramfenikolu. Díky změnám tvaru se bakterie přizpůsobí ATB (Banerjee *et al.*, 2021). Z toho vyplývá, že ATB tolerance může zaprvé souviset se zvýšením objemu buněk prostřednictvím změn v šířce buněk, což by mělo vést ke snížení koncentrace intracelulárních molekul ATB rychlostí, která je úměrná rychlosti růstu buněk. Zadruhé zředění intracelulárních molekul ATB pro danou velikost buňky může souviset se

snížením přítoku ATB přes povrch buňky v důsledku snížení poměru povrchu k objemu. Navíc nárůsty průměrného průměru buněk a jejich délek v reakci na chloramfenikol byly zjištěny i u *E. coli* (Si *et al.*, 2017).

### **3.4 Mechanismy rezistence k beta-laktamovým antibiotikům**

Bakteriální rezistence k beta-laktamům je zprostředkována zejména třemi základními mechanismy. Nejběžnějším mechanismem je produkce enzymů, které inaktivují ATB. Dále bakterie využívají schopnost změnit cílové místo působení ATB. Třetím mechanismem je zabránění přístupu ATB k cílovému místu prostřednictvím změny propustnosti nebo pomocí aktivního vyčerpávání z buňky (Wilke *et al.*, 2005).

#### **3.4.1 Modifikace cílového místa**

Pro antimikrobiální účinek je nutné, aby se dané cílové místo nevyskytovalo, případně se dostatečně lišilo od savčích buněk. V takovém případě se ATB váže na cílovou strukturu v bakteriální buňce a zabráňuje růstu bakterií. Často mají cílová místa životně důležité funkce a není možné se jich úplně zbavit. Proto jsou bakterie schopné prostřednictvím mutací změnit strukturu cílového místa se zachováním jeho původní funkce (Lambert, 2005).

Tento mechanismus rezistence se uplatňuje zejména u Gram-pozitivních bakterií prostřednictvím exprese proteinů vázajících penicilin (z angl. *Penicillin-Binding Protein*, PBP), které na sebe poutají beta-laktamy s nízkou afinitou. Klinicky významným příkladem je MRSA, který dosahuje rezistence získkem a expresí genu *mecA*, který kóduje PBP2a s nízkou afinitou (Chambers, 1997). Gen *mecA* je součástí mobilního chromozomálního elementu, což je příčinou jeho rychlého šíření mezi jednotlivými stafylokokovými kmeny (Rice, 2012).

#### **3.4.2 Aktivní vyčerpávání antibiotika (efluxní pumpy)**

Efluxní pumpy jsou transportní proteiny, jejichž přirozenou funkcí je vylučování toxických látek do vnějšího prostředí. Kromě této funkce se také vyznačují silnou schopností vyčerpávat některá ATB, jakými jsou beta-laktamy, chinolony a částečně i aminoglykosidy (Bonomo and Szabo, 2006). Často jsou geny efluxní pumpy součástí operonu s regulačním genem, jehož funkcí je kontrola exprese daného proteinu. Výsledkem zvýšené exprese je vznik rezistence vůči různým látkám včetně ATB. Pumpy se tedy vyznačují širokou substrátovou specifitou spojenou s rezistencí na více léčiv (Webber and Piddock, 2003).

Jelikož představují velký problém při antibakteriální léčbě, byly objeveny inhibitory efluxních pump (z angl. *Efflux Pump Inhibitor*, EPI). Tyto inhibitory se v kombinaci s ATB ukázaly jako slibná léčba infekčních onemocnění (Sun *et al.*, 2014).

Pumpy zejména u Gram-negativních bakterií hrají klíčovou roli při rezistenci na více léčiv (z angl. *Multidrug Resistance*, MDR). Například RND (z angl. *Resistance-Nodulation-Division*) efluxní systémy jsou zvláště rozšířené u Gram-negativních bakterií a umožňují vyčerpávání široké škály antimikrobiálních látek (Li and Nikaido, 2009). Jedním z příkladů RND systému je MexAB-OprM vyskytující se u *P. aeruginosa*. Důsledkem zvýšené exprese tohoto systému je MDR na chinolony a většinu beta-laktamů kromě imipenemu (Masuda *et al.*, 2000).

### **3.4.3 Změna propustnosti vnější membrány**

Pouze Gram-negativní bakterie jsou schopné odolávat účinku ATB pomocí snížené propustnosti vnější membrány. Kvůli hydrofobnímu charakteru vnější membrány musí hydrofilní molekuly prostupovat do buňky pomocí transmembránových proteinů tzv. porinů. Poriny umožňují průnik různých látek do buňky včetně několika tříd ATB. Difúze je omezena změnou počtu porinů nebo změnou kvalitativní funkce, díky čemuž se ATB nedostane do buňky. Bakterie se tedy stává rezistentní vůči účinkům ATB (Nguyen Van and Gutmann, 1994). Příkladem této rezistence je ztráta porinu D2 (také protein OprD) pravděpodobně kvůli mutaci a následné inaktivaci *oprD* genu. Ztráta OprD umožnila bakterii *P. aeruginosa* odolávat účinku karbapenemů, zejména imipenemu. K rozvoji tohoto typu rezistence dochází cca u 25 % pacientů léčených tímto ATB (Bonomo and Szabo, 2006).

### **3.4.4 Enzymatická inaktivace antibiotika**

Velké množství ATB obsahuje hydrolyticky citlivé chemické vazby, které jsou důležité pro správnou funkci léčiva. Z tohoto důvodu si bakterie vyvinuly enzymy, jejichž cílem je štěpení těchto zranitelných vazeb a inaktivace ATB (Wright, 2005). V podstatě již od roku 1940 (Abraham and Chain, 1940) byla intenzivně studována široká rodina enzymů degradujících ATB tzv. beta-laktamáz. Jednotlivé třídy beta-laktamáz jsou detailněji popsány v další kapitole.



## 3.5 Beta-laktamázy

Zejména u Gram-negativních bakterií je hlavním obranným mechanismem proti beta-laktamům účinek beta-laktamáz. Tyto enzymy umožňují bakteriím odolávat ATB díky hydrolýze amidové vazby čtyřčlenného beta-laktamového kruhu penicilinů a cefalosporinů.

Rozšiřování tohoto typu rezistence se děje prostřednictvím mobilních genetických elementů (plazmidy či transpozony), které usnadňují rychlý přenos genů mezi bakteriemi. Beta-laktamázy jsou produkovány do periplazmatického prostoru v případě Gram-negativních bakterií nebo jsou navázány na cytoplazmatickou membránu, popř. vylučovány do vnějšího prostředí u Gram-positivních bakterií (Wilke *et al.*, 2005). Existují dvě hlavní strategie při hydrolýze beta-laktamového kruhu. Některé beta-laktamázy využívají k jeho narušení ionty kovu (nejčastěji zinku) tzv. metalo-beta-laktamázy (MBL), ale častěji se jedná o působení serinových beta-laktamáz. V druhém případě dochází k reakci beta-laktamového kruhu se serinovým residuem v aktivním místě enzymu za vzniku acylesteru. Po následné hydrolýze esteru dojde k uvolnění aktivního enzymu a hydrolyzovaného neaktivního léčiva (Waley, 1992).

### 3.5.1 Klasifikace beta-laktamáz

V současnosti je známo velké množství beta-laktamáz, které jsou rozděleny dle různých parametrů do několika skupin. Původně byly beta-laktamázy klasifikovány na základě typu ATB, které degradují. První skupinou byly penicilinázy se schopností hydrolyzovat peniciliny a druhou skupinou byly cefalosporinázy, které dobře hydrolyzují cefalosporiny (Fleming *et al.*, 1963). V současné době jsou využívána dvě klasifikační schémata. Jedná se o systém podle Bush-Jacoby-Medeirose, ve kterém jsou enzymy rozříděny podle jejich substrátové specifity a citlivosti k inhibitorům. Druhým systémem je klasifikační schéma dle Amblera z roku 1980, které dělí enzymy dle aminokyselinové sekvence (Bush *et al.*, 1995).

Amblerova klasifikace beta-laktamáz rozděluje enzymy pouze do čtyř tříd, které jsou označeny písmeny A-D. Do tříd A, C a D jsou řazeny serinové enzymy, třída B obsahuje metaloenzymy s iontem zinku v aktivním místě (Ambler, 1980). Tato klasifikace vycházející z aminokyselinové sekvence je stabilní a nelze ji narušit mutacemi. Bodové mutace mohou způsobit problémy při klasifikaci enzymů dle jejich fenotypových vlastností, protože mohou výrazně změnit substrátovou specifitu enzymu či citlivost na inhibitory. Následkem toho je enzym špatně přiřazen ke skupině (Livermore, 1995). Na druhou stranu funkční klasifikace poskytuje možnost spojit daný enzym s jeho klinickými vlastnostmi, což je výhodné například při posuzování rezistence (Bush *et al.*, 2010).

Klasifikační systém dle Bush-Jacoby-Medeirose z roku 1995 dělí enzymy do čtyř základních skupin označených 1-4 (Bush *et al.*, 1995), v dnešní době se skupina 4 vynechává. Klasifikace řadí enzymy dle jejich schopnosti hydrolyzovat specifické třídy beta-laktamových ATB a dle schopnosti inaktivace enzymu pomocí inhibitorů kyseliny klavulanové, sulbaktamu a tazobaktamu. Do skupiny 1 jsou řazeny cefalosporinázy, které patří do molekulární třídy C dle Amblera. Obvykle nejsou inhibovány kyselinou klavulanovou. Do této skupiny se řadí například AmpC beta-laktamázy. Z této skupiny byla vyčleněna podskupina 1e, která vykazuje vyšší aktivitu proti ceftazidimu a dalším oxyimino-beta-laktamům. Do skupiny 2 náleží molekulární třídy A a D (serinové beta-laktamázy). Jedná se o nejpočetnější skupinu, do které jsou zařazeny beta-laktamázy s úzkým spektrem, ale také s rozšířeným spektrem účinku (ESBL). Tato skupina byla původně rozdělena na osm podskupin (2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d, 2e, 2f), v současnosti sem patří čtyři nové podskupiny (2ber, 2ce, 2de, 2df). Typickou vlastností téměř pro všechny členy je vysoká citlivost k inhibitorům. Skupina 3 zahrnuje MBL, které vyžadují ion zinku v aktivním místě. Skupina se vyznačuje nízkou citlivostí k inhibitorům, jakými jsou kyselina klavulanová či tazobaktam, výjimku tvoří kyselina ethylendiaminotetraoctová (EDTA) nebo kyselina dipikolinová. Enzymy jsou v této skupině rozčleněny dle funkce na 3 podskupiny (3a, 3b a 3c). Do skupiny 4 původně patřily penicilinázy, které nebyly dobře inhibovány kyselinou klavulanovou. Tato skupina, jak už bylo zmíněno, se vynechává a enzymy jsou řazeny do skupin 1-3 (Bush *et al.*, 1995; Bush *et al.*, 2010).

### 3.5.2 Beta-laktamázy typu AmpC

Důležitou skupinu enzymů, které umožňují bakteriím odolávat účinkům beta-laktamových ATB, tvoří beta-laktamázy typu AmpC. Jedná se primárně o cefalosporinázy, které hydrolyzují většinu penicilinů, cefalosporiny včetně oxyiminocefalosporinů a monobaktamy. Enzymy jsou relativně rezistentní k účinkům inhibitorů beta-laktamáz (kyselina klavulanová, sulbaktam, tazobaktam; Bush *et al.*, 2010). Dle Amblerova klasifikačního schématu jsou řazeny do třídy C a podle Bush-Jacoby-Medeirosovy klasifikace patří do skupiny 1 (Ambler, 1980; Bush *et al.*, 1995).

AmpC beta-laktamázy kódované chromozomálními geny jsou široce distribuovány u většiny bakteriálních zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*, ale také u bakterií z jiných čeledí, jako jsou *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *P. aeruginosa* a jiné. U mnohých střevních bakterií je exprese chromozomálního *ampC* genu za normálních okolností nízká. K indukci exprese dochází v okamžiku reakce na vnější stimul, kterým je například působení beta-laktamového ATB. Do indukce genu *ampC* jsou zapojeny proteiny metabolismu

buněčné stěny AmpR, AmpD a AmpG. Celý proces indukce *ampC* nejprve zahrnuje vazbu beta-laktamového ATB na PBP v bakteriální buněčné stěně. Výsledkem je narušení syntézy peptidoglykanu, který je v periplazmě degradován na oligopeptidy N-acetylglukosamin-1,6-anhydro-N-acetylmuramové kyseliny (prekurzory buněčné stěny). Tyto produkty degradace jsou transportovány do cytoplasmy za pomoci membránové permeázy AmpG. Indukce exprese je zakončena vazbou transkripčního regulátoru AmpR do promotorové oblasti genu *ampC*. Při aktivaci AmpR jsou jako kofaktory zapojeny prekurzory buněčné stěny. Výsledkem celého procesu je zvýšení aktivity *ampC* promotoru, a tedy zvýšená exprese proteinu AmpC (Hanson and Sanders, 1999). Do regulace exprese AmpC je zapojen také cytosolický protein AmpD, který funguje jako negativní regulátor exprese. AmpD je N-acetylmuramyl-L-alanin amidáza účastní se recyklace produktů degradace peptidoglykanů, zabraňuje jejich hromadění a následně aktivaci AmpR (Jacobs *et al.*, 1995).

Příčinou rezistence střevních bakterií bývá mutace v některém z genů podílejících se na expresi beta-laktamázy typu AmpC a následná změna inducibilní produkce na trvalou. Nejčastěji dochází k mutaci genu *ampD*, což vede k hyperinducibilitě či konstitutivní hyperprodukcí AmpC. Mutace genů *ampR* a *ampG* jsou méně časté (Jacoby, 2009). Inducibilní typ exprese není přítomen u všech Gram-negativních bakterií kódujících inducibilní *ampC* gen. Exprese genu *ampC* u bakterie *E. coli* vykazuje konstitutivní charakter, příčinou je absence regulačního genu *ampR*. U této bakterie je exprese *ampC* regulována atenuačním mechanismem, stejně jako u bakteriálních druhů *Shigella* (Honoré *et al.*, 1986). Jednotlivá beta-laktamová ATB se odlišují ve schopnosti indukovat expresi AmpC, mezi silné induktory patří peniciliny a cefalosporiny I. generace (Jacoby, 2009). Také inhibitory beta-laktamázy fungují jako induktory, zejména kyselina klavulanová (Weber and Sanders, 1990).

Kromě zmíněných genů ležících na chromozomech existuje i další skupina genů, které jsou lokalizovány na plazmidech. Mezi producenty takto kódovaných AmpC řadíme zejména střevní bakterie, které přirozeně nenesou chromozomální gen *ampC* (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp.). Vyskytují se však také u bakterií, které vykazují nízkou úroveň exprese *ampC* genu (*E. coli*). Podobně jako chromozomálně kódované AmpC beta-laktamázy poskytují rezistenci vůči širokému spektru beta-laktamových ATB (Philippon *et al.*, 2002).

Dále byly popsány i ESBL třídy C (cESBL, například ADC). Některé cESBL mohou také hydrolyzovat karbapenemy. Patří sem chromozomálně kódovaný enzym ADC-68 popsáný u *A. baumannii*, jehož C-smyčka byla stabilizována v otevřené konformaci horní části R2 a mohla tak lépe pojmout karbapenemy s většími bočními řetězci R2 (Jeon *et al.*,

2014). Cefalosporinázy třídy C (AmpC) jsou přítomny u většiny členů čeledi *Enterobacteriaceae* (zejména *E. coli* a *Enterobacter* spp.). Stejně jako chromozomálně kódované enzymy s relativně nízkou expresí jsou však indukovatelné některými beta-laktamovými ATB (Poole, 2004). Kromě toho byly také popsány plazmidem zprostředkované AmpC beta-laktamázy (např. DHA-1, CMY-2; Singtohin *et al.*, 2010).

### 3.5.3 Karbapenemázy

Karbapenemázy představují skupinu beta-laktamáz, která se vyznačuje nejširším spektrem hydrolytických schopností ve srovnání s ostatními enzymy hydrolyzujícími beta-laktamy. Termín karbapenemázy není zcela přesný, jelikož do jejich hydrolytického spektra patří kromě karbapenemů také peniciliny, cefalosporiny a monobaktamy. Enzymy lze klasifikovat do dvou hlavních molekulárních rodin z hlediska mechanismu hydrolýzy v aktivním místě. První skupinu tvoří tzv. MBL, které k narušení beta-laktamového kruhu potřebují alespoň jeden atom zinku. Druhou skupinu charakterizuje využití serinu v aktivním místě enzymu, jedná se o serinové beta-laktamázy. Dle Amblerova klasifikačního schématu se karbapenemázy rozdělují do tří molekulárních tříd. Enzymy s obsahem serinu jsou řazeny do tříd A a D, přičemž MBL se zinkem v aktivním místě se řadí do třídy B. Stejně jako beta-laktamázy typu AmpC mohou být geny kódující produkci karbapenemáz lokalizované na chromozomech, ale také na plazmidech, což představuje problém velmi rychlého mezidruhového šíření (Queenan and Bush, 2007).

Co se týče karbapenemáz, tak nejdominantnějšími karbapenemázami na světě se staly například IMP-4, KPC-2, NDM-5 nebo VIM-1 a některé varianty OXA (OXA-23, OXA-48; Arana *et al.*, 2017; Boral *et al.*, 2019; Khan *et al.*, 2017; Roberts *et al.*, 2020).

#### 3.5.3.1 Molekulární třída A karbapenemázy

Serinové karbapenemázy třídy A (funkční zařazení dle Bush-Jacoby-Medeirose do skupiny 2f) se vyskytují v klinických izolátech bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* (Bush *et al.*, 1995). Tuto třídu lze rozdělit do čtyř hlavních skupin: NMC/IMI, SME, KPC a GES beta-laktamázy. Jejich společnou vlastností je schopnost hydrolyzovat karbapenemy, cefalosporiny, peniciliny a aztreonam, vyznačují se také citlivostí k inhibitorům kyselině klavulanové a tazobaktamu (Queenan and Bush, 2007).

Například GES enzymy byly nejprve klasifikovány jako ESBL z důvodu velkého množství hydrolyzovatelných substrátů zahrnujících peniciliny a cefalosporiny s rozšířeným spektrem. Jelikož GES hydrolyzují v menší míře i imipenem, byly zařazeny také do funkční

skupiny 2f karbapenemáz. Geny kódující tuto rodinu enzymů je možné nalézt v integrorech na plazmidech. I přesto, že jsou vzácné, zprávy o jejich nálezů jsou hlášeny po celém světě (Queenan and Bush, 2007).

### 3.5.3.2 Metallo-beta-laktamázy

Enzymy, které k hydrolyze beta-laktamového kruhu ATB vyžadují přítomnost jednoho či více atomů zinku v aktivním místě, se nazývají MBL. Dle Amblerova klasifikačního schématu patří do molekulární třídy B (podle Bush-Jacoby-Medeirose se funkčně řadí do skupiny 3). Metallo-beta-laktamázy se vyznačují schopností hydrolyzovat v různé míře imipenem, podle níž jsou podrobněji zařazeny do funkčních skupin 3a, 3b a 3c. Po srovnání nukleotidových sekvencí genů kódujících MBL byly enzymy zařazeny do tří molekulárních podtříd: B1, B2 a B3. Většina MBL hydrolyzuje širokou škálu beta-laktamů kromě monobaktamů a není inhibována kyselinou klavulanovou či tazobaktamem. Nicméně jsou všechny citlivé k inhibitorům typu dvojmocných chelátorů iontů, jako je například EDTA (Walsh *et al.*, 2005).

Nejběžnějšími typy MBL, které byly identifikovány, jsou IMP, NDM, VIM, SPM a GIM. Jejich kódující geny jsou součástí genové kazety zabudované do integronu (Walsh, 2005). Genové kazety kromě rekombinačního místa obvykle obsahují gen MBL s fúzaným genem udělujícím rezistenci k aminoglykosidovým ATB, avšak nemají schopnost se samostatně přenášet mezi jednotlivými organismy. Z tohoto důvodu lze nalézt integrony v plazmidech či jiných geneticky mobilních elementech (Walsh *et al.*, 2005).

V současnosti je MBL Nového Dillí (z angl. *New Delhi Metallo-Beta-Lactamase*, NDM) jedním z nejběžněji uváděných karbapenemázových mechanismů rezistence na světě (Villa *et al.*, 2015). Gen kódující NDM-1 (*bla<sub>NDM-1</sub>*) byl poprvé zjištěn v izolátu *K. pneumoniae* v roce 2008 u švédského pacienta indického původu (Yong *et al.*, 2009). Poté byl tento plazmidem zprostředkovaný mechanismus rezistence velmi často popsán.

### 3.5.3.3 Molekulární třída D karbapenemázy

Molekulární třída D/funkční skupina 2 serinových beta-laktamáz zahrnuje skupinu enzymů nazývajících se oxacilinázy (OXA) na základě jejich schopnosti hydrolyzovat oxacilin. Do této třídy patří i několik OXA s karbapenemázovou aktivitou. Velká část OXA karbapenemáz byla identifikována v Gram-negativním oportunním patogenu *A. baumannii*. Prvním objeveným byl ARI-1 (akronym k *Acinetobacter* rezistentní k imipenemu), jeho sekvenováním bylo objasněno, že patří do třídy D oxacilináz, a enzym byl přejmenován na

OXA-23 (Nordmann and Poirel, 2002). Mezi další OXA karbapenemázy je možné zařadit OXA-24/-40, OXA-25, OXA-26, OXA-27 a OXA-48.

Obecně OXA karbapenemázy hydrolyzují peniciliny a cefalosporiny s úzkým spektrem účinku, naopak cefalosporiny s rozšířeným spektrem a aztreonam nejsou, popř. jen velmi slabě, hydrolyzovány. V malé míře jsou těmito enzymy hydrolyzovány karbapenemy imipenem a meropenem. Karbapenemázy typu OXA jsou oproti ostatním beta-laktamázám z funkční skupiny 2 hůře inhibovány kyselinou klavulanovou, účinněji působí tazobaktam (Walther-Rasmussen and Høiby, 2006).

### 3.5.4 Oxacilinázy

U těchto enzymů byla původně popsána schopnost hydrolyzovat peniciliny isoxazolylového typu jako je oxacilin. Nicméně součástí této třídy jsou i enzymy s aktivitou cefalosporináz či karbapenemáz, jedná se tedy o beta-laktamázy s vysoce rozmanitým profilem selektivity k substrátu (June *et al.*, 2014). Více informací o této problematice je uvedeno v diplomové práci z roku 2019 (Chalachanová, 2019).

### 3.5.5 Beta-laktamázy s rozšířeným spektrem účinku

Běžně užívaná definice ESBL říká, že se jedná o enzymy schopné hydrolyzovat a způsobovat rezistenci nejenom k penicilinům a cefalosporinům I. a II. generace, ale štěpí taktéž cefalosporiny III., IV. generace a monobaktamy (aztreonam). Naproti tomu jejich účinek nepůsobí na cefamyciny a karbapenemy. Mezi producenty ESBL patří zejména střevní bakterie *E. coli* a *K. pneumoniae*, ale rovněž další druhy pocházející z čeledi *Enterobacteriaceae*, a *P. aeruginosa* (Pitout *et al.*, 2005).

Z hlediska klasifikace se tyto enzymy zařazují do molekulárních tříd A a D dle Amblera, v rámci klasifikačního systému dle Bush-Jacoby-Medeirose patří do skupin 2be a 2d. Společnou vlastností ESBL patřících do třídy A je citlivost na působení inhibitorů, jakými jsou kyselina klavulanová, sulbaktam a tazobaktam, avšak beta-laktamázy třídy D jsou na jejich působení rezistentní. Dalším společným znakem těchto enzymů je lokalizace jejich kódujících genů na plasmidech, což usnadňuje přenos mezi jednotlivými bakteriálními izoláty (Pitout *et al.*, 2005).

Většina ESBL je odvozena od beta-laktamáz skupiny 2b (například TEM-1, TEM-2 či SHV-1); označení skupiny 2be znamená, že tyto enzymy mají rozšířené („extended“) spektrum. Dalšími předky ESBL jsou enzymy ze skupiny 2d typu OXA (Bush *et al.*, 1995). První objevený enzym s rozšířeným spektrem účinku byl nalezený v Německu u izolátu

*Klebsiella ozaenae*. U klinického izolátu byla pozorována rezistence k cefalosporinům III. generace i přesto, že u něj byla původně zjištěna pouze přítomnost SHV-1 enzymu s úzkým spektrem účinku. Následně prostřednictvím heteroduplexní analýzy byl identifikován nový *bla* gen kódující první ESBL označenou SHV-2 (Kliebe *et al.*, 1985). Brzy poté následovaly objevy dalších derivátů s rozšířeným spektrem účinku odvozených nejen od SHV-1, ale například také od TEM-1. Rozšířené spektrum substrátové specifity ESBL je způsobeno jednou či více aminokyselinovými substitucemi ve struktuře jejich předků (Bradford, 2001).

Jak bylo výše uvedeno, velká část ESBL je tvořena deriváty enzymů TEM nebo SHV. Mezi nověji objevené a z hlediska výskytu neobvyklé ESBL třídy A zahrnují GES/IBC, VEB a PER beta-laktamázy. Nicméně nejrozšířenějšími enzymy jsou CTX-M, jejichž produkce a míra šíření se od poloviny 90. let výrazně zvýšily (Bonnet, 2004). Kromě toho byl ESBL fenotyp popsán u dalších skupin beta-laktamáz, jako jsou ADC, CARB, OXA, OXY a L2.

Členové čeledi *Enterobacteriaceae* patří mezi hlavní producenty ESBL a jejich šíření bylo zaznamenáno zejména v nemocničním a komunitním prostředí. Nicméně byla prokázána přítomnost producentů ESBL (převážně typu CTX-M-15) také v potravinách živočišného původu (například kravské mléko, mléčné výrobky, kuřecí maso), což naznačuje možný přenos prostřednictvím potravního řetězce (Alegria *et al.*, 2020). V experimentální části diplomové práce byly použity izoláty Gram-negativních bakterií pocházející z kuřecích farem a jatek na Moravě a výskyt ESBL v těchto izolátech byl potvrzen.

Mnoho ESBL genů bylo identifikováno jako zdroj získané rezistence u různých Gram-negativních bakterií, další studie však ukazují, že ESBL se přirozeně vyskytují také u klinicky relevantních patogenů a u environmentálních druhů. Například mnoho chromozomálně kódovaných a přirozeně se vyskytujících ESBL, jako například CSP-1, KLUA-1, KLUC-1, OXY-1, RAHN-1 a SGM-1, bylo popsáno u různých bakterií, i když jejich úloha ve fenotypové rezistenci je malá (Guillon *et al.*, 2010; Lamoureaux *et al.*, 2013).

### **3.5.5.1 SHV beta-laktamázy**

První ESBL SHV-2 byla objevena v klinickém izolátu *K. pneumoniae*, který kromě tohoto enzymu obsahoval beta-laktamázu s úzkým spektrem SHV-1. Po sekvenování bylo zjištěno, že se SHV-2 liší ve změně aminokyseliny G na S v poloze 238 od SHV-1, přičemž tato bodová mutace stojí za rozšířením spektra substrátové specifity. Vzhledem k selekčnímu tlaku cefalosporinů III. generace z důvodu jejich častého používání došlo k rozšíření SHV-2 po celém světě (Paterson and Bonomo, 2005). Několik let od objevu SHV-2 byly

identifikovány další čtyři ESBL vyskytující se u bakterie *K. pneumoniae*. Konkrétně se jednalo o častěji se vyskytující SHV-2a, SHV-5 a zřídka se objevující SHV-3 a SHV-4. Mnoho dalších variant bylo posléze detekováno, velká většina v klinických izolátech *K. pneumoniae* (Heritage *et al.*, 1999).

Enzymy SHV jsou řazeny dle funkční klasifikace do skupiny 2be a dle molekulární struktury patří do třídy A serinových beta-laktamáz. Ke své aktivitě vyžadují v aktivním místě přítomnost serinového residua v pozici 70, v jehož blízkosti se nachází několik konzervovaných aminokyselinových motivů. Příkladem je motiv S-X-X-K (X značí variabilní aminokyseliny) v pozici 70 až 73, který je z velké části společný s třídou D serinových beta-laktamáz. Dalším motivem je S-D-N v pozici 130 až 132 nebo K-T-G v pozici 234 až 236 (Bush, 2013). Většina SHV enzymů s rozšířeným spektrem je odvozena od SHV-1 s odlišností jedné či více aminokyselin, již tato malá změna stačí k vytvoření rozšířeného spektra. Zejména se jedná o substituci G238S popř. E240K, serinové residuum je zodpovědné za hydrolýzu ceftazidimu a lysinové residuum za štěpení cefotaximu (v obou případech se jedná o cefalosporiny III. generace; Bradford, 2001). Karbapenemová ATB nepatří do hydrolytického profilu SHV enzymů, nicméně byl objeven klinický izolát *K. pneumoniae* s nízkou citlivostí na některé cefalosporiny s rozšířeným spektrem a také imipenem. Následně bylo zjištěno, že za sníženou citlivost k imipenemu je zodpovědný derivát beta-laktamázy SHV-1 s aminokyselinovou změnou A146V označený SHV-38. Geny kódující SHV-38 jsou umístěny na chromozomu, což znamená, že se jedná o první chromozomální enzym typu SHV s rozšířeným spektrem hydrolýzy (Poirel *et al.*, 2003).

### 3.5.5.2 TEM beta-laktamázy

TEM enzymy typu ESBL jsou odvozeny od TEM-1 a TEM-2 enzymů s úzkým spektrem. TEM-1 i TEM-2 vykazují podobný hydrolytický profil, do kterého patří peniciliny a cefalosporiny I. generace. Jejich odlišnou vlastností je rozdílný izoelektrický bod způsobený jedinou změnou v aminokyselinovém složení. Jako první identifikovaná ESBL typu TEM je považována plazmidem kódovaná TEM-3 objevená v izolátech *K. pneumoniae*. Vzhledem ke své zvýšené aktivitě proti cefotaximu byl enzym původně označen jako CTX-1. Po sekvenování bylo zjištěno, že se od TEM-2 liší pouze dvěma aminokyselinovými substitucemi a enzym byl přejmenován na TEM-3 (Paterson and Bonomo, 2005). Na základě kombinování změn aminokyselin dochází ke vzniku různých fenotypů TEM enzymů, jako například odlišné izoelektrické body (hodnoty se pohybují v rozmezí 5,2–6,5) či schopnost hydrolyzovat oxyimino-cefalosporiny (ceftazidim, cefotaxim). Pro změnu fenotypu a rozšíření hydrolytického profilu jsou důležité následující bodové mutace: E104K, R164S/H,



E240K a G238S (poslední zmíněná mutace je typická pro TEM i SHV enzymy). ESBL typu TEM udělují rezistenci k ATB zejména bakteriím *E. coli* a *K. pneumoniae*, ale vyskytují se i u jiných bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, jakými jsou *P. mirabilis*, *Salmonella* spp., *Enterobacter aerogenes* a jiné (Bradford, 2001).

### 3.5.5.3 OXA beta-laktamázy

Další rozrůstající se skupinu ESBL tvoří OXA enzymy, odlišují se od TEM a SHV svým zařazením do klasifikace. Jsou součástí molekulární třídy D a funkční skupiny 2d. Hlavním producentem ESBL typu OXA je *P. aeruginosa*. Nicméně OXA byly detekovány i u dalších Gram-negativních bakterií, především *Acinetobacter* spp. Vývoj těchto enzymů z beta-laktamáz s úzkými spektry byl velmi podobný jako u SHV a TEM. Například OXA-11, OXA-14, OXA-16, OXA-17 a další jsou odvozeny od OXA-10 a liší se v jednom až několika aminokyselinových residuích. Varianty odvozené od OXA-10 mají společnou alespoň jednu ze dvou následujících aminokyselinových substitucí: S73N nebo G157D. Substituce G na D v poloze 157 je důležitá pro vývoj odolnosti k ceftazidimu. Do hydrolytického profilu ESBL typu OXA lze také zařadit cefotaxim a někdy i aztreonam (Bradford, 2001). Dále je pro OXA charakteristická rezistence na kyselinu klavulanovou, bylo však zjištěno, že OXA-18 je citlivá na působení tohoto inhibitoru (Philippon *et al.*, 1997).

### 3.5.5.4 CTX-M beta-laktamázy

V posledních letech se velmi rozšířila skupina plazmidem kódovaných ESBL označená CTX-M. Již během 80. let 20. století byl z různých zemí hlášen výskyt enzymů, které nepatří do TEM a SHV beta-laktamáz a přednostně hydrolyzují cefotaxim než ceftazidim. V Německu byl tento objevený enzym označen CTX-M-1, následně byl ve Francii detekován a sekvenován enzym zvaný MEN-1, který sdílel pouze cca 40% identitu s TEM a SHV. Později bylo zjištěno, že CTX-M-1 a MEN-1 jsou identické enzymy. Dalším identifikovaným enzymem rezistentním na cefotaxim byl v Japonsku izolovaný Toho-1, poté se ukázalo, že se jedná o variantu CTX-M-2 a tento enzym byl přejmenován na CTX-M-44. Tímto způsobem došlo k objevení několika CTX-M enzymů po celém světě. Skupina CTX-M enzymů představuje rychle rostoucí rodinu ESBL, která byla identifikována na všech obydlených kontinentech a detekována v široké škále klinických bakterií, zejména u čeledi *Enterobacteriaceae* (Bonnet, 2004).

Z hlediska substrátové specifity CTX-M enzymy lépe štěpí cefalosporiny I. generace (cefalotin nebo cefaloidin) než peniciliny (benzylpenicilin), ale preferenčním substrátem jsou cefalosporiny III. generace (cefotaxim). Hydrolyza cefotaximu probíhá přednostně ve

srovnání s ceftazidimem, který je štěpen obtížněji a nedochází tedy k zajištění rezistence na toto ATB. Tyto enzymy jsou citlivé na účinek inhibitorů beta-laktamázy, charakteristickou vlastností je lepší inhibice při použití tazobaktamu než sulbaktamu a kyseliny klavulanové (Bradford, 2001). Pomocí cílené mutagenese byl určen vliv typu aminokyselinového residua v dané pozici na změnu hydrolytického profilu. Při substituci R276N u beta-laktamázy CTX-M-4 se ukázalo, že mutantní enzym vykazuje horší úroveň štěpení cefotaximu, ceftriaxonu a aztreonamu a také je méně citlivý na působení kyseliny klavulanové a tazobaktamu. Lze se tedy domnívat, že aminokyselinové residuum R276 ovlivňuje hydrolyzu oxyimino-cefalosporinů (Gazouli *et al.*, 1998).

CTX-M nemají schopnost hydrolyzovat karbapenemy. Nicméně poměrně nedávno byl identifikován enzym CTX-M-33, derivát celosvětově rozšířeného enzymu CTX-M-15 lišící se pouze v jedné aminokyselinové substituci (N109S), který vykazoval schopnost hydrolyzovat meropenem. Za tuto vlastnost pravděpodobně odpovídá zmíněná aminokyselinová substituce N109S a silný selekční tlak tohoto ATB (Poirel *et al.*, 2019).

CTX-M enzymy je možné klasifikovat na základě podobností v jejich aminokyselinové sekvenci do pěti hlavních skupin: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 a CTX-M-25. Členové jedné skupiny sdílí mezi sebou i více než 94% identitu, avšak zástupci z různých skupin vykazují identitu menší než 90 % (Bonnet, 2004).

Všechny geny *bla*<sub>CTX-M</sub> vycházejí ze společného předka, který byl pomocí horizontálního přenosu zanesen do chromozomu různých environmentálních druhů bakterie rodu *Kluyvera*. Prekurzory genů kódující skupiny enzymů CTX-M-1 a CTX-M-2 byly identifikovány v bakteriálním druhu *Kluyvera ascorbata*, zdrojem prekurzorů genů pro CTX-M-8 a CTX-M-9 je druh *Kluyvera georgiana*. Geny *bla*<sub>CTX-M</sub> bývají často lokalizovány na plazmidech a jiných přenosných prvcích, které usnadňují jejich šíření. Právě mezi jednotlivými druhy bakterií rodu *Kluyvera* byl zaznamenán opakovaný přenos *bla*<sub>CTX-M</sub> z chromozomů na plazmidy, přesný mechanismus přenosu však zůstává neobjasněn. Nicméně bylo zjištěno, že zejména dva genetické prvky jsou zapojeny do přenosu těchto genů. Prvním prvkem je inzerční sekvence *ISCR1* vyskytující se u skupin CTX-M-2 a CTX-M-9, druhý prvek *ISEcp1* je spojený se skupinami CTX-M-1, CTX-M-8 a CTX-M-25. Nejen tyto prvky mohou souviset s rychlostí přenosu *bla*<sub>CTX-M</sub> genů rezistence, také například množství plazmidů vyskytujících se v bakteriální populaci či vystavení izolátů antimikrobiálním látkám hraje roli při mobilizaci chromozomálních genů na plazmidy. Zvýšená rychlost šíření prvků antimikrobiální rezistence mezi širokým spektrem bakteriálních patogenů představuje závažný problém pro veřejné zdraví (Barlow *et al.*, 2008).

### 3.5.5.5 Minoritní typy ESBL

Většina ESBL je odvozena od TEM, SHV či CTX-M enzymů, nicméně bylo identifikováno několik typů ESBL, které nejsou blízce spojeny se zmíněnými enzymy. Do této skupiny lze zařadit SFO, BEL, BES, GES, PER, VEB, TLA a další typy enzymů. Například PER enzymy sdílí s SHV a TEM cca 25 % homologních sekvencí. Zástupce PER enzymů PER-1 byl detekován v klinických izolátech *P. aeruginosa* a účinně štěpí peniciliny, cefotaxim, ceftazidim a také aztreonam, kromě toho je inhibován kyselinou klavulanovou, sulbaktamem i tazobaktamem. Z 86 % je PER-1 homologní s PER-2; oba tyto enzymy jsou také do určité míry příbuzné s VEB-1 beta-laktamázu. Celkově cca 40–50 % homologie vykazují ESBL typu PER-1, PER-2, VEB-1, CME-1 a TLA-1, jejich společnou vlastností je podobný hydrolytický profil zahrnující oxyimino-cefalosporiny (zejména ceftazidim) a aztreonam. Zajímavým příkladem minoritní skupiny ESBL je SFO-1 kódovaný plazmidem, jehož součástí je i regulační gen *ampR*, který umožňuje indukci beta-laktamázy podobným způsobem jako je tomu u třídy C beta-laktamáz. Od třídy C se liší neschopností hydrolyzovat cefamyciny a také je citlivý na působení kyseliny klavulanové. Enzymy minoritní skupiny ESBL jsou vzácné, ale často se mohou asociovat s geny rezistence proti ostatním ATB jako jsou aminoglykosidy či chinolony (Bradford, 2001; Paterson and Bonomo, 2005; Naas *et al.*, 2008).

### 3.5.5.6 Globální epidemiologie ESBL

Beta-laktamázy s rozšířeným spektrem se staly globálním problémem při léčbě hospitalizovaných pacientů poté, co se do klinické praxe zavedla beta-laktamová ATB s rozšířeným spektrem. Většina mikroorganismů produkující tyto enzymy je řazena do čeledi *Enterobacteriaceae*, nejrozšířenějšími producenty jsou zejména *K. pneumoniae* a *E. coli* izolované z nemocničního prostředí. Bakteriální kmeny produkující ESBL jsou nejčastěji nalezeny v nemocničních odděleních u hospitalizovaných pacientů s různými rizikovými faktory, jakými jsou například délka pobytu v nemocnici, závažnost onemocnění, předchozí vystavení ATB, doba strávená na jednotce intenzivní péče či zavedený močový/arteriální katetr (Bradford, 2001; Gniadkowski, 2001). Nicméně ESBL byly také identifikovány u pacientů umístěných do pečovatelských domů (Bradford *et al.*, 1995).

Stále se rozšiřující problém rezistence ESBL je z velké části způsoben častým a neodůvodněným předepisováním zejména cefalosporinů s rozšířeným spektrem. Narůstající rezistenci k cefalosporinům III. generace u *E. coli* izolátů lze pozorovat v gradientu od

severních zemí k jižním, nejnižší procentuální podíl lze pozorovat v severní Evropě a nejvyšší v jižní Evropě. Aktuální stav rezistence lze vyhodnotit pomocí databáze EARS-net. Například procentuální podíl izolátů *E. coli* rezistentních k cefalosporinům III. generace byl v roce 2019 ve Švédsku 7,8 % a oproti tomu v Itálii byl 30,9 %. Česká republika v letech 2017-2019 dospěla ke zvýšení procentuálního podílu z 14,2 % na 15,9 % pro rezistenci způsobenou *E. coli*. Dále v případě *K. pneumoniae* byla rezistence vůči cefalosporinům III. generace ve většině evropských zemí nižší než 60 %, ale v některých oblastech překročila 70 %, jako například v Bulharsku (data získaná z databáze EARS-net; <https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>).

Do konce 90. let byla většina identifikovaných ESBL typu SHV a TEM pocházejících z nozokomiálních izolátů *K. pneumoniae* (zejména na jednotkách intenzivní péče). V následujících letech epidemiologická situace ESBL prošla dramatickými změnami. Hlavními producenty ESBL se staly kmeny *E. coli* exprimující CTX-M typ beta-laktamáz, které se šíří zejména prostřednictvím mobilních genetických elementů. Také došlo ke zvýšení počtu izolátů z komunitního prostředí, většinou od pacientů s infekcí močových cest (Cantón *et al.*, 2008).

V USA se první objevenou ESBL stal TEM-10 produkovaný bakterií *K. pneumoniae* v roce 1989 (Quinn *et al.*, 1989), další zprávy zahrnovaly zejména ESBL typu TEM, avšak byla popsána i ohniska enzymů SHV či CTX-M (Paterson and Bonomo, 2005). V Jižní Americe první identifikované ESBL byly SHV-2 a SHV-5 z *K. pneumoniae* (Casellas and Goldberg, 1989). Po propuknutí infekce *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium v Argentině byl detekován CTX-M-2 enzym, který se následně rozšířil do mnoha částí Jižní Ameriky (Bauernfeind *et al.*, 1992).

I v Austrálii se objevily kmeny pozitivní na ESBL, přibližně 5 % klinických izolátů *K. pneumoniae* produkovalo ESBL (Bell *et al.*, 2002). První zprávy o ESBL v Asii informovaly o produkci SHV-2 (Paterson and Bonomo, 2005). Shromážděné vzorky izolátů z let 1998 a 1999 obsahovaly 30,7 % ESBL pozitivních izolátů *K. pneumoniae* a 24,5 % izolátů *E. coli* (Bell *et al.*, 2002). Původně převažovaly ESBL typu SHV, posléze však byly hlášeny stále častější zprávy o výskytu ESBL typu CTX-M, což vzbuzuje podezření, že CTX-M jsou dominantní typy ESBL v Asii (Paterson and Bonomo, 2005). Mnoho studií však uvádí, že CTX-M-15 je nejběžnějším enzymem ESBL mezi lidskými klinickými izoláty na celém světě (Peirano and Pitout, 2019).

### 3.5.5.7 Epidemiologie ESBL v České republice

V roce 2004 bylo provedeno testování izolátů *K. pneumoniae* z klinického materiálu od pacientů hospitalizovaných v 16 českých nemocnicích. Z 913 izolovaných kmenů bylo 25,6 % určeno jako ESBL pozitivní. Přibližně dvakrát více pozitivních kmenů bylo identifikováno u pacientů na jednotkách intenzivní péče než na standardních odděleních. Z těchto výsledků lze vyvodit relativně vysokou prevalenci ESBL pozitivních kmenů *K. pneumoniae* v České republice (Kolář *et al.*, 2005).

Další výzkum, ve kterém byla stanovena frekvence ESBL pozitivních izolátů čeledi *Enterobacteriaceae* ve třech velkých nemocnicích ve východní části České republiky včetně Fakultní nemocnice v Olomouci, byl proveden v průběhu roku 2009. Z celkově 12 922 kmenů z čeledi *Enterobacteriaceae* bylo 7 % (907 případů) ESBL pozitivních izolátů, jednalo se zejména o *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* a *E. coli*. Na jednotkách intenzivní péče bylo identifikováno vyšší procento izolátů *K. pneumoniae* než *E. coli* a byly to zejména izoláty produkující ESBL typu CTX-M (Kolář *et al.*, 2010). Po porovnání s rokem 2007 v roce 2010 došlo u hospitalizovaných pacientů v Olomouckém kraji ke zvýšenému výskytu ESBL pozitivních bakterií ze 3 % na 8 %. Také v případě komunitního prostředí byla frekvence ESBL zvýšena z 1 % na 3 % (Husičková *et al.*, 2012). V nedávné studii genotypizace ESBL- a AmpC-pozitivních izolátů *K. pneumoniae* a *E. coli* izolovaných z Fakultní nemocnice Olomouc po dobu 10 let (2010-2019) prokázala převahu ESBL typu CTX-M, konkrétně CTX-M-15 a CTX-M-9 druhů (Kolář *et al.*, 2021). Produkce ESBL je z klinického hlediska velmi významná a pro správné nastavení antibiotické léčby je důležité znát i její epidemiologickou situaci.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Bakteriální izoláty a kultivace

V experimentální části diplomové práce byly použity vybrané izoláty Gram-negativních bakterií pocházejících z kuřecích farem a jatek na Moravě. Konkrétně bylo použito 99 bakteriálních kmenů rezistentních k cefalosporinům III. generace (cefotaxim, ceftazidim) - 2 kmeny *C. freundii*, 3 kmeny *E. cloacae*, 35 kmenů *E. coli*, 1 kmen *M. odoratimimus*, 2 kmeny *O. intermedium*, 40 kmenů *Pseudomonas* spp., 1 kmen *S. fonticola* a 15 kmenů *Stenotrophomonas* spp. Více informací o sběru, zpracování vzorků a identifikaci druhů je uvedeno ve studii z roku 2018 (Bardoň *et al.*, 2018). Citlivost animálních izolátů k vybraným ATB byla stanovena pomocí mikrodiluční metody (EUCAST). Všechny izoláty byly také testovány na ESBL a AmpC beta-laktamázy pomocí soupravy ESBL + AmpC (Biovendor).

Pět referenčních kmenů bylo použito jako pozitivní kontrola - *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> a *bla*<sub>OXA-1</sub> produkující *E. coli* (NCTC 13400), *bla*<sub>GES-1</sub> a *bla*<sub>OXA-2-like</sub> pozitivní *C. freundii* BP7m, *bla*<sub>OXA-10-like</sub> produkující *E. coli* DR348-CEF, *bla*<sub>OXA-48</sub> pozitivní *K. pneumoniae* (NCTC 13442), a *bla*<sub>SHV-18</sub> produkující *K. pneumoniae* (NCTC 13368). Negativní kontroly byly PCR směsi s přidáním vody namísto templátové DNA. Analyzované kmeny bakterií byly uchovány při -80 °C použitím ITES Kryobanky B (ITES plus). Samotné izoláty bakterií byly vyočkované použitím sterilních jednorázových inokulační klik (1 µl; Biologix) na krevní agar (Columbia). Kultivace bakterií byla provedena v termostatu (Incucell; BMT) při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

### 4.1.2 Chemikálie

- Agaróza pro elektroforézu DNA (SERVA, Německo)
- Barvivo SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA)
- Combi *Taq* DNA polymeráza (Top-Bio, ČR)
- Destilovaná voda (dH<sub>2</sub>O)
- DNA marker molekulové hmotnosti o velikosti 200-1500 bp (Top-Bio, ČR)
- dNTP mix (Top-Bio, ČR)
- Forward/reverse primer (East Port Praha)
- Nanášecí pufr (PCR loading buffer; Top-Bio, ČR)
- PCR reakční pufr (10x, PCR Blue Buffer; Top-Bio, ČR)
- PCR voda (Top-Bio, ČR)

### 4.1.3 Laboratorní vybavení a softwary

- Azure 200 - dokumentační systém (Biotech, ČR)
- Elektroforetická komora (EASY-CAST; Owl Scientific)
- Geneious (Biomatters, Nový Zéland)
- NanoPhotometer NP80 – Implen (Biotech, ČR)
- PCR termocykler (RotorGene™ 6000; Corbett Research)
- Zdroj stejnosměrného elektrického napětí (MP-300 V; Major Science)

## **4.2 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy**

### **4.2.1 Sekvenční analýza**

Sekvence genů kódujících ESBL (Naas *et al.*, 2017), které byly popsány (naposledy přístupné v březnu 2021), byly staženy z databáze GenBank. Porovnání nukleotidových/aminokyselinových sekvencí a analýza mutací byly provedeny pomocí bioinformačního softwaru Geneious Prime (Biomatters).

### **4.2.2 Zhotovení fylogenetických stromů**

Fylogenetické stromy byly vytvořeny pomocí softwaru Geneious Prime (Biomatters) použitím PhyML na základě modelu Le a Gascuel. První fylogenetický strom byl získán porovnáním 216 různých typů CTX-M enzymů, druhý je tvořen 199 SHV a třetí 199 TEM beta-laktamázi.

### **4.2.3 Navrhování primerů pro polymerázovou řetězovou reakci**

Homologní oblasti v nukleotidových sekvencích sloužily k návrhu primerů pomocí Primer3 (Geneious Prime). Výše uvedené izoláty byly testovány pomocí polymerázové řetězové reakce (z angl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) na přítomnost genů ESBL. Šestnáct párů primerů na základě BLDB databáze (<http://bldb.eu/>) bylo testováno u animálních izolátů a referenčních kmenů pomocí PCR. Dále bylo navrženo 40 párů primerů, které nebyly experimentálně testovány. Podrobné specifikace použitých primerů jsou uvedeny v (Tab. 1).



**Tab. 1. (první část)** Sekvence primerů použitých na detekci ESBL genů metodou PCR.

Označení PCR	Cílové místo (podtypy)	Název primeru	Nukleotidová sekvence (směr 5'→3') <sup>a</sup>	Přirozený (N) nebo získaný (A) / fenotyp	Klinicky významné ESBL	Velikost ampliconu (bp)	T <sub>m</sub> (°C)	Reference
Simplex I	CTX-M (208)	CTX-M-F1/R1	ATGTGCAGYACCAGTAARGT, TGGGTRAARTARGTSACCAGA	N nebo A / ESBL	CTX-M-1 to -3/-8/-9/-14/-15/-19/-27/-40/-55	593	55	(Pagani <i>et al.</i> , 2003)
	CTX-M (7)	CTX-M-F2/R2	ATGTGCAGYACCAGYAAAG, GGCCARATCACCGCRATAT			551	56	Článek v přípravě
	GES (45)	GES-F1/R1	ACGTTCAAGTTTCCGCTAG, GGCAACTAATTCGTCACGT	N nebo A / ESBL nebo karbapenemáza	GES-3/-7/-11	624	53	(Kolář <i>et al.</i> , 2020)
	GES (1)	GES-F2/R2	ATGATCGTGGAGTGGAGCCC, AAGAAGCCGATGTCGTTGCG			448	58	Tato studie
	OXA-1-like (11)	OXA(1)-F/R	TCTGTTGTTTGGGTTTCGC, TCTATGGTGTTCATATGGCTG	N nebo A / úzké spektrum, BSBL nebo ESBL	OXA-1	245	53	(Mlynářčík <i>et al.</i> , 2020)
	OXA-2-like (22)	OXA(2)-F/R	ATAGTTGTGGCAGACGAAC, TTGACCAAGCGCTGATG	N nebo A / ESBL	OXA-2/-15/-32/-141/-210	452	54	Článek v přípravě
	OXA-10-like (38)	OXA(3)-F/R	ACAAAGAGTTCTCTGCCGAA, TCCACTTGATTAAGTGC	N nebo A / ESBL	OXA-10	421	53	Tato studie
	OXA-18	OXA(4)-F/R	ACCATCTGGCTGAAGGATT, CAGAAGTTTCCGACAGGG	A / ESBL	OXA-18	506	53	Tato studie
	OXA-45	OXA(5)-F/R	GCGGTAACACACTGTCAT, GGGTCAATTGCTGCGAATA	A / ESBL	OXA-45	333	52	Tato studie
	OXA-48-like (92)	OXA(6)-F/R	ACCARGCATTTTTACCCGCA, GGCATATCCATATTCATCGC	N nebo A / ESBL nebo karbapenemáza	OXA-48/-163/-181/-204	538	55	Tato studie
	OXA-48-like (9)	OXA(7)-F/R	ACGAGAATAMACAGCAGGG, GATAMACAGGCACAACCGA			228	56	
	PER (12)	PER-F1/R1	CTCGACGCTACTGATGGTA, TTCATTGGTTCGGCTTGAC	N nebo A / ESBL	PER-1/-2/-6/-7/-8/-12	820	54	Tato studie
	PER (3)	PER-F2/R2	CTGTTAATCGTGCTGCAAGT, GACAAATACCGCCACCAAT			530	53	
	SHV (199)	SHV-F/R	TGGATGCCGNTGACNAACAGC, NTATCGGCGATAAACAGNCC	N nebo A / BSBL, ESBL nebo karbapenemáza	SHV-2/-4/-5/-7/-11/-12/-25/-26/-38/-107/-110/-128/-182	451	59	Článek v přípravě
	TEM (199)	TEM-F/R	CACCAGTCACAGAAAAGCA, AGGGCTTACCATCTGGC	N nebo A / BSBL nebo ESBL	TEM-1/-3/-21/-24/26/-47/-52/-54/-68/-116/-122	450	54	Článek v přípravě

<sup>a</sup>Pro degenerované primery: B = C nebo G nebo T, H = A nebo C nebo T, K = G nebo T, M = A nebo C, N = jakákoliv báze, R = A nebo G, S = G nebo C, W = A nebo T, Y = C nebo T. Primery použité na sekvenování byly stejné jako ty, které se používají na PCR. <sup>b</sup>Navržené primery, ale neověřené. AmpC - beta-laktamáza typu AmpC, BSBL - beta-laktamáza se širokým spektrem účinku, ESBL – beta-laktamáza s rozšířeným spektrem účinku, CARBA – karbapenemáza.

**Tab. 1. (druhá část)** Sekvence primerů použitých na detekci ESBL genů metodou PCR.

Označení PCR	Cílové místo (podtypy)	Název primeru	Nukleotidová sekvence (směr 5' → 3') <sup>a</sup>	Přirozený (N) nebo získaný (A) / fenotyp	Klinicky významné ESBL	Velikost amplikonu (bp)	T <sub>m</sub> (°C)	Reference
Simplex I	VEB (27)	VEB-F/R	TTTCCGATTGCTTTAGCCG, CCCCAACATCATTAGTGGC	N nebo A / ESBL	VEB-1/-4/-9/-25	553	54	Článek v přípravě
	ACI (1)	ACI-F/R	CCGTTGACATGGAGAATGG, GCGTGTCCGGTTATGGAATT	N / ESBL	ACI-1	507	54	Tato studie
	ADC (178)	ADC-F1/R1	MAACCTAAAAACYCAATCGGTG, YGGATAAGMAAACTCTTCCCA			417	58	
	ADC (29)	ADC-F2/R2	RGTTTCTAYCAAGTCGGYA, GCGTTCTTCATTBGGGAATACGT			268	59	
	ADC (8)	ADC-F3/R3	TTCCAGATGAAGTMCAAACAGAYC, HGGATAAGARAACCTTCCCA	N / AmpC, ESBL nebo karbapenemáza	ADC-7/-10/-11/-18/-25/-26/-52/-56/-68/-73/-74/-81/-106/-135/-152	470	58	Článek v přípravě
	ADC (4)	ADC-F4/R4	TATACGAGTGGCAACCTTGG, AATTGCGCGTCGAATATCTG			423	54	
Simplex II <sup>b</sup>	ADC (5)	ADC-F5/R5	TGGTCTACAATCCGTTCAAGA, GCCGGGGTTAACTCGAAT			517	54	
	ADC (7)	ADC-F6/R6	TATRATGTGCCGGGTATGG, RTCTGTTTGTACTTCAICTGG			318	54	Tato studie
	BEL (4)	BEL-F/R	CGTTCCTTGAAGAGTACGC, ACCCGTTACCCATGAATCA	A / ESBL	BEL-1/-2	401	53	Tato studie
	BES (1)	BES-F/R	ATAAGCGGTGCATTATGC, CTTAAGCCAGCTCACCAG	A / ESBL	BES-1	363	53	Tato studie
	BPS (11)	BPS-F/R	GCTYCAGTACAGCGACAAC, GTCKTGTTGCCGAGCATCCA	N / cefalosporináza nebo ESBL	BPS-1	270	57	Tato studie
	CARB (29)	CARB-F1/R1	GGTCTCCGGTGATGGATAA, GTGTGCGTGACTCGTAAG			303	55	
	CARB (8)	CARB-F2/R2	GGGAAAACGTTGGGAACAT, TAATAGCACGCGACCCATA	N nebo A / BSBL nebo ESBL	CARB-2/-5/-8/-10	578	54	Článek v přípravě
	CARB (13)	CARB-F3/R3	YGGTGATTTGAGGGATACG, RCGCGAYTGTGATGWATAAAC			358	55	
	CARB (1)	CARB-F4/R4	TCTCTCCTCGAGCAACAAA, AAGTGAGAGCTCGGTTTCT			708	53	Tato studie

<sup>a</sup>Pro degenerované primery: B = C nebo G nebo T, H = A nebo C nebo T, K = G nebo T, M = A nebo C, N = jakákoliv báze, R = A nebo G, S = G nebo C, W = A nebo T, Y = C nebo T. Primery použité na sekvenování byly stejné jako ty, které se používají na PCR. <sup>b</sup>Navržené primery, ale neověřené. AmpC - beta-laktamáza typu AmpC, BSBL - beta-laktamáza se širokým spektrem účinku, ESBL – beta-laktamáza s rozšířeným spektrem účinku, CARBA – karbapenemáza.

**Tab. 1. (třetí část)** Sekvence primerů použitých na detekci ESBL genů metodou PCR.

Označení PCR	Cílové místo (podtypy)	Název primeru	Nukleotidová sekvence (směr 5'→3') <sup>a</sup>	Přirozený (N) nebo získaný (A) / fenotyp	Klinicky významné ESBL	Velikost ampliconu (bp)	T <sub>m</sub> (°C)	Reference
Simplex II <sup>b</sup>	CdiA (2)	CdiA-F/R	CGTGCTCGCTTTCTTTACT, CACCTGCTCCGGTTTTATC	N / penicilináza nebo ESBL	CdiA	692	53	Tato studie
	CepA (6)	CepA-F/R	AGTGACAATAATGCCTGCG, TGCTTCGGAATCTTTCACG	N / ESBL	CepA	438	52	Tato studie
	CfxA (13)	CfxA-F/R	GAAATTGGTGTGGCGGTTA, CAGCACCAAGAGGAGATGT	N nebo A / BSBL nebo ESBL	CfxA/CfxA-2	442	53	Tato studie
	CGA (1)	CGA-F/R	AGCTACAGTCGGTGTCTTCT, TTCATTTCTGCGCCTGTT	N / ESBL	CGA-1	640	53	Tato studie
	CIA (4)	CIA-F/R	GATGGTTTCTGCCTTTGCT, CTCCGGAAATTTTCGCG	N / ESBL	CIA-1	299	53	Tato studie
	CME (3)	CME-F/R	CCAAAGTGACAACAACGGA, TCCTGAATCGTTCTCAGCA	N / ESBL	CME-1/-2	376	53	Tato studie
	CSP (1)	CSP-F/R	TCTGCTGAGGTTGATTGGA, TCCCACATCATTGGTAGCA	N / ESBL	CSP-1	346	53	Tato studie
	CumA (3)	CumA-F/R	ATCTCCAATGCTATGGGCT, TCACGAGGATCACCATGAA	N / BSBL nebo ESBL	-	483	53	Tato studie
	DES (1)	DES-F/R	GTTCCAGTTATTCCAGGCG, TGCCAGCACTTTAAAGGTG	N / ESBL	DES-1	269	53	Tato studie
	ERP (1)	ERP-F/R	GTATCGGGCTGTCTCTGAT, GCTGTGCTGTCTGTAATCC	N / ESBL	ERP-1	477	54	Tato studie
	FAR (1)	FAR-F/R	CTGAAGAAATCTGGTCGCC, AGCAGTTTCAGGATCTGGT	N / ESBL	FAR-1	473	53	Tato studie
	KLUA (12)	KLUA-F/R	CGCTCAATGTTAACGGTGA, TTCATGGCAGTATTGTCGC	N / ESBL	KLUA-9	395	52	Tato studie
	KLUC (6)	KLUC-F/R	CGATTGCGGAAAAACATGT, CGCCGAGGCTAAWACATC	N nebo A / ESBL	KLUC-2/-3	521	53	Tato studie
	LUT (6)	LUT-F/R	TGCTCATGAAAAAGCTGGG, ACCTGTCTTATCGCCTACC	N / BSBL nebo ESBL	LUT-1	299	54	Tato studie

<sup>a</sup>Pro degenerované primery: B = C nebo G nebo T, H = A nebo C nebo T, K = G nebo T, M = A nebo C, N = jakákoliv báze, R = A nebo G, S = G nebo C, W = A nebo T, Y = C nebo T. Primery použité na sekvenování byly stejné jako ty, které se používají na PCR. <sup>b</sup>Navržené primery, ale neověřené. AmpC - beta-laktamáza typu AmpC, BSBL - beta-laktamáza se širokým spektrem účinku, ESBL – beta-laktamáza s rozšířeným spektrem účinku, CARBA – karbapenamáza.

**Tab. 1. (čtvrtá část)** Sekvence primerů použitých na detekci ESBL genů metodou PCR.

Označení PCR	Cílové místo (podtypy)	Název primeru	Nukleotidová sekvence (směr 5'→3') <sup>a</sup>	Přirozený (N) nebo získaný (A) / fenotyp	Klinicky významné ESBL	Velikost ampliconu (bp)	T <sub>m</sub> (°C)	Reference
Simplex II <sup>b</sup>	L2 (18)	L2-F1/R1	TTCCCGATGTGCAGCAC, TTGCTGCCGGTCTTGTC	N / ESBL	L2-2, L2-3, L2-E-10	518	53	Článek v přípravě
	L2 (4)	L2-F2/R2	NCGATTCTNCAGTTCAGT, NTTGTCGATCAGCCAGTC			667	54	
	OHIO (1)	OHIO-F/R	CTTTCCCATGATGAGCACC, CCCGCAGATAAATCACCAC	A / ESBL	OHIO-1	599	54	Tato studie
	OXY (28)	OXY-F1/R1	TAAAGTGATGGCYGCCGC, RTTGGTGGTGCCGTAATC	N / ESBL	OXY-1 a OXY-2 varianty	517	54	Tato studie
	OXY (20)	OXY-F2/R2	CCCTGCCTTTATTGCTCTG, TTTATCTCCCACGACCCAG			665	54	
	PME (1)	PME-F/R	GATCCACTTCAGCGATGAC, GACATCGTGGGTCTTGTTT	A / ESBL	PME-1	478	54	Tato studie
	RAHN (2)	RAHN-F/R	ATGACGTCAGTTCAGCAAC, CATCCATTCCACCAGTTGC	N / ESBL	RAHN-1/-2	555	54	Tato studie
	SFO (1)	SFO-F/R	CTCGAGAAAACTCCGGTG, GTTAGGGTTTGCAGGCTTT	A / ESBL	SFO-1	473	54	Tato studie
	SGM (7)	SGM-F/R	CATGTGCTCGACCTTCAAG, ATCGGCAGCARCAGRTTGG	N / ESBL	-	225	58	Tato studie
	SMO (1)	SMO-F/R	CTCACAGACCGTATAACCGT, GAATGTCTCATCGCCGATC	N / ESBL	SMO-1	316	54	Tato studie
	TLA (2)	TLA-F/R	GCTAAAGGTACGGATTTCGC, CTTAACGCCAAGCTTGCTA	A / ESBL	TLA-1/-3	417	54	Tato studie
	TLA2 (1)	TLA2-F/R	ATCGTGCTTGCTGTTTTGA, TCATTTGCCGCATTGTTCT	A / ESBL	-	623	52	Tato studie

<sup>a</sup>Pro degenerované primery: B = C nebo G nebo T, H = A nebo C nebo T, K = G nebo T, M = A nebo C, N = jakákoliv báze, R = A nebo G, S = G nebo C, W = A nebo T, Y = C nebo T. Primery použité na sekvenování byly stejné jako ty, které se používají na PCR. <sup>b</sup>Navržené primery, ale neověřené. AmpC - beta-laktamáza typu AmpC, BSBL - beta-laktamáza se širokým spektrem účinku, ESBL – beta-laktamáza s rozšířeným spektrem účinku, CARBA – karbapenamáza.

#### 4.2.4 Podmínky izolace a amplifikace bakteriální DNA pomocí hot-start polymerázové řetězové reakce

Genetická detekce genů ESBL proběhla pomocí PCR použitím extrahované DNA z bakteriálních izolátů za dříve popsanych podmínek (Mlynářčík *et al.*, 2016). Koncentrace genomické DNA byla měřena pomocí spektrofotometru (NanoPhotometer NP80 – Implen). PCR byla prováděna v konečném objemu 12,5  $\mu$ l za použití DNA polymerázy Combi *Taq* (Top-Bio, ČR) s konečnou koncentrací 0,5  $\mu$ M pro každý primer. Ve zkratce, nejprve byla připravena reakční směs (mastermix), jejíž součástí byly reagenty nezbytné pro správný průběh amplifikace templátové DNA. Jednalo se o reakční pufr (10x, PCR Blue Buffer; Top-Bio, ČR) s obsahem hořčičných iontů (15 mM), směs deoxyribonukleotidů (dNTPs; 10 mM každý), forward/reverse primery (Tab. 1; 100  $\mu$ M každý), termostabilní DNA polymerázu (Combi *Taq* DNA polymeráza, 1U/ $\mu$ l; Top-Bio, ČR), a PCR vodu (Tab. 2). Mastermix byl připraven ve větším objemu podle počtu vzorků a následně byl rozdělen po 11,5  $\mu$ l do jednotlivých mikrozkušavek. Poté byl ke směsi přidán 1  $\mu$ l templátové bakteriální DNA (100 ng). Celá směs byla centrifugována a vložena do PCR termocyklieru (RotorGene<sup>TM</sup> 6000; Corbett Research) s předem nastavenými časovými a teplotními podmínkami (Tab. 3). Pro kontrolu správného průběhu PCR reakce byla použita pozitivní a negativní kontrola.

**Tab. 2.** Složení reakční směsi pro PCR.

PCR reagentie	Objem pro jednu reakci [ $\mu$ l]
PCR voda	9,25
10x PCR reakční pufr	1,25
dNTP směs	0,25
Forward primer	0,06
Reverse primer	0,06
Combi <i>Taq</i> DNA polymeráza	0,63
Templátová DNA	1

**Tab. 3.** Časové a teplotní podmínky PCR reakce.

Průběh PCR	Teplota [ $^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94	3 min	1
Denaturace	94	30 s	
Nasednutí primerů	52-59	30 s	32
Extenze	72	1 min na 1 kb	
Finální extenze	72	10 min	1
Chlazení	4	-	-

#### **4.2.5 Rozdělení amplifikačních produktů pomocí elektroforézy**

Elektroforetická separace výsledných produktů amplifikace byla provedena v horizontálním 1% agarózovém gelu. Nejprve bylo 0,6 g agarózy zahřátím rozpuštěno v 54 ml destilované vody a 6 ml 10x TBE pufru (Tris-Borate-EDTA, pH 8,3; Bio-Rad, USA). Do ochlazené směsi (přibližně 50 °C) bylo přidáno 5 µl barviva SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA) sloužícího ke zviditelnění DNA v gelu. Takto připravený 1% agarózový gel byl nalit do elektroforetické vany, kde došlo k jeho zatuhnutí. Gel byl poté přelitý 1x TBE pufrům (70 ml zásobního 10x TBE pufru bylo zředěno v 630 ml destilované vody). Do první jamky bylo aplikováno 10 µl markeru molekulové hmotnosti o velikosti 200–1500 bp (Top-Bio, ČR). Následující jamky byly zaplněny produkty PCR reakce o objemu 9 µl. Vzorky i marker byly do jamek gelu nanášeny spolu s 2 µl nanášecího pufru (PCR loading buffer; Top-Bio, ČR), který sloužil k vizualizaci pohybu DNA v gelu.

Po aplikaci vzorků byly elektrody elektroforézy připojeny ke zdroji jednosměrného elektrického napětí (MP-300 V; Major Science) při 105 V po dobu 60 minut. Po skončení separace byla rozdělená DNA v gelu zviditelněna pomocí zobrazovacího systému Azure 200 (BioTech, ČR) a velikost jednotlivých PCR produktů byla určena pomocí markeru molekulové hmotnosti. Amplikony byly potvrzeny Sanger sekvenováním (Elisabeth Pharmacon, ČR).

## 4.3 Výsledky

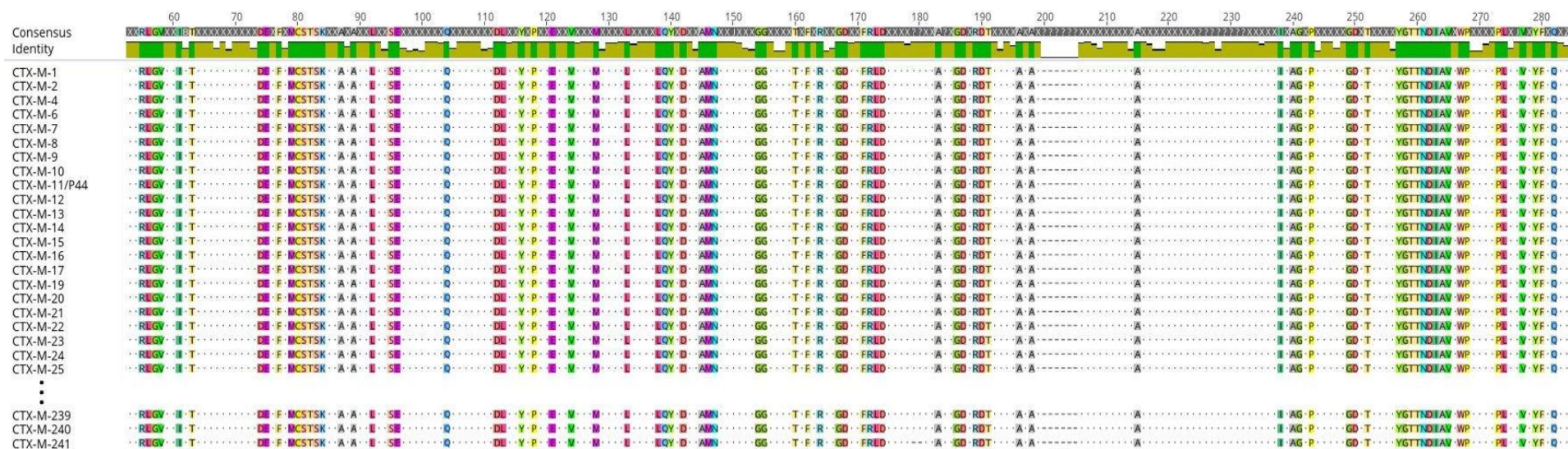
### 4.3.1 *In silico* analýza ESBL enzymů

Vyhledávání v databázích BLDB a BLASTn ukázalo, že u enterobakterií i GNNF bakterií byla popsána široká škála beta-laktamáz třídy A a C, MBL a beta-laktamáz třídy D, jako je OXA. Konkrétně, co se týče klinicky významných ESBL enzymů (CTX-M, SHV, TEM), se nám podařilo zjistit, že byly popsány u následujících rodů bakterií (výsledky nejsou ukázány) – *Acinetobacter*, *Achromobacter* (jen TEM typ), *Alcaligenes* (jen TEM typ), *Atlantibacter* (jen CTX-M a TEM typ), *Bacillus*, *Bordetella* (jen TEM typ), *Brevibacterium* (jen CTX-M a TEM typ), *Brucella* (jen TEM typ), *Burkholderia* (jen CTX-M a SHV typ), *Campylobacter* (jen TEM typ), *Cedecea* (jen SHV typ), *Citrobacter*, *Cronobacter* (jen SHV a TEM typ), *Elizabethkingia* (původně *Chryseobacterium*; jen TEM typ), *Enterobacter*, *Enterococcus* (jen SHV a TEM typ), *Erwinia* (jen TEM typ), *Escherichia*, *Haemophilus* (jen TEM typ), *Hafnia* (jen TEM typ), *Kersteria* (jen SHV typ), *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Lactobacillus* (jen TEM typ), *Leclercia* (jen CTX-M a TEM typ), *Legionella* (jen TEM typ), *Lysobacter* (jen TEM typ), *Morganella*, *Mycobacterium* (jen TEM typ), *Neisseria* (jen TEM typ), *Nocardia* (jen TEM typ), *Ochrobactrum* (jen CTX-M a SHV typ), *Pantoea* (jen CTX-M a TEM typ), *Pasteurella* (jen TEM typ), *Proteus*, *Providencia* (jen CTX-M a TEM typ), *Pseudomonas*, *Pseudochrobactrum* (jen CTX-M typ), *Ralstonia* (jen TEM typ), *Raoultella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shewanella* (jen CTX-M typ), *Shigella*, *Staphylococcus* (jen TEM typ), *Stenotrophomonas* (jen SHV typ), *Streptococcus* (jen TEM typ), *Streptomyces* (jen TEM typ), *Superficieibacter* (jen SHV a TEM typ), *Vibrio* (jen CTX-M a TEM typ) a *Yersinia* (jen TEM typ) .

Produkce beta-laktamáz u Gram-negativních patogenů je přispívajícím k rezistenci na beta-laktamová ATB. V současnosti bylo v BLDB databázi popsáno více než 593 různých ESBL. Pro diplomovou práci byly navrženy primery k detekci těchto ESBL genů. S přihlédnutím k výše uvedeným údajům bylo analyzováno celkem 37 typů genů kódujících ESBL. Jednalo se o 35 genů kódujících členy beta-laktamáz třídy A (například CARB, CTX-M, GES, L2, OXY, PER, SHV, SME, TEM, VEB), a po jednom členovi skupiny beta-laktamáz třídy C (ADC) a třídy D (4 podskupiny OXA, OXA-18 a OXA-45; Tab. 1).

Celkem bylo navrženo 56 specifických párů primerů k detekci ESBL s použitím programu Primer3 (Geneious, Biomatters). Výsledky primer-BLAST ukázaly, že kromě nejdůležitějších alelických variant vybraných typů ESBL byly tyto oligonukleotidy schopné detekovat všechny nebo většinu alelických variant těchto typů enzymů, které se běžně vyskytují u enterobakterií a GNNF bakterií.

*In silico* analýza ESBL enzymů byla použita k detekci přítomnosti různých zachovaných aminokyselin a motivů. V rámci studovaných CTX-M enzymů bylo identifikováno několik konzervovaných aminokyselin jako je například methionin-cystein-serin-threonin-serin-lysin na pozici 71-76 (71-MCSTSK-76; číslování podle CTX-M-1; Obr. 1). Na tomto obrázku nejsou uvedeny zbylé aminokyselinové úseky a aminokyseliny jako jsou methionin na pozici 1 (M1), glutamin na místě 34 a 35 a 268 (Q34 a Q35), leucin v poloze 37 (L37), alanin a kyselina glutamová na pozici 273 až 274 (273-AE-274), leucin a alanin na pozici 280-281 (280-LA-281) a alanin na místě 284 (A284).

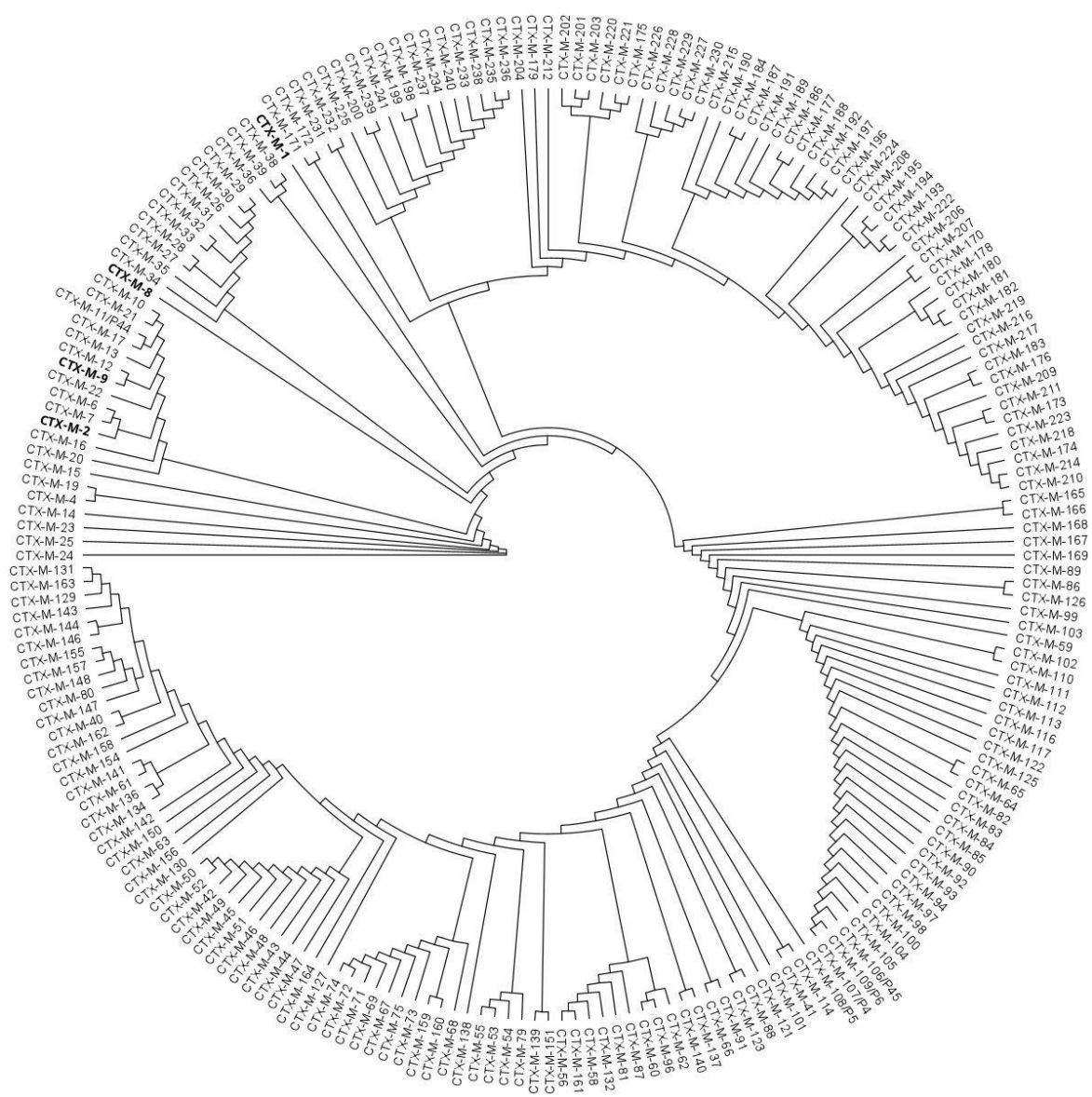


**Obr. 1.** Porovnání 216 aminokyselinových sekvencí CTX-M enzymů. Analýza a tvorba obrázku byla provedena v programu Geneious Prime. Na obrázku jsou barevně zvýrazněny pouze stejné aminokyselinové zbytky ve všech sekvencích. Zelený panel označuje aminokyseliny, které jsou v dané poloze totožné ve všech sekvencích. Odlišné aminokyselinové zbytky jsou označeny tečkami.



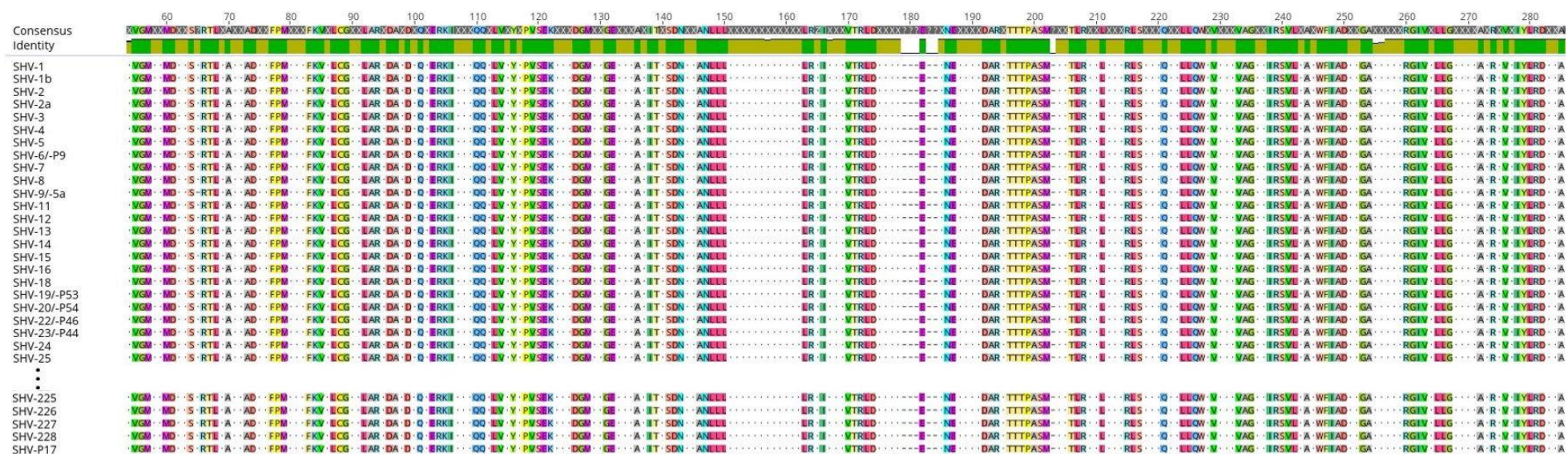
Po porovnání aminokyselinových sekvencí CTX-M enzymů byla zjištěna jejich sekvenční identita (55,3-99,7 %). Například CTX-M-150 a CTX-M-151 ukázaly pouze 55,3% aminokyselinovou identitu, zatímco u CTX-M-155 a CTX-M-157 byla nalezena 99,7% identita (výsledky nejsou uvedeny).

Rekonstrukcí fylogenetického stromu bylo umožněno sledovat příbuznost jednotlivých aminokyselinových sekvencí CTX-M enzymů. Do analýzy bylo celkově zahrnuto 216 typů různých CTX-M. Enzymy CTX-M byly rozděleny do čtyř hlavních sublinií nebo skupin (CTX-M-1-like, CTX-M-2-like, CTX-M-8-like, CTX-M-9-like; Obr. 2).



**Obr. 2.** Fylogenetický strom CTX-M enzymů. Dendrogram získaný porovnáním 216 CTX-M enzymů použitím Geneious PhyML programu.

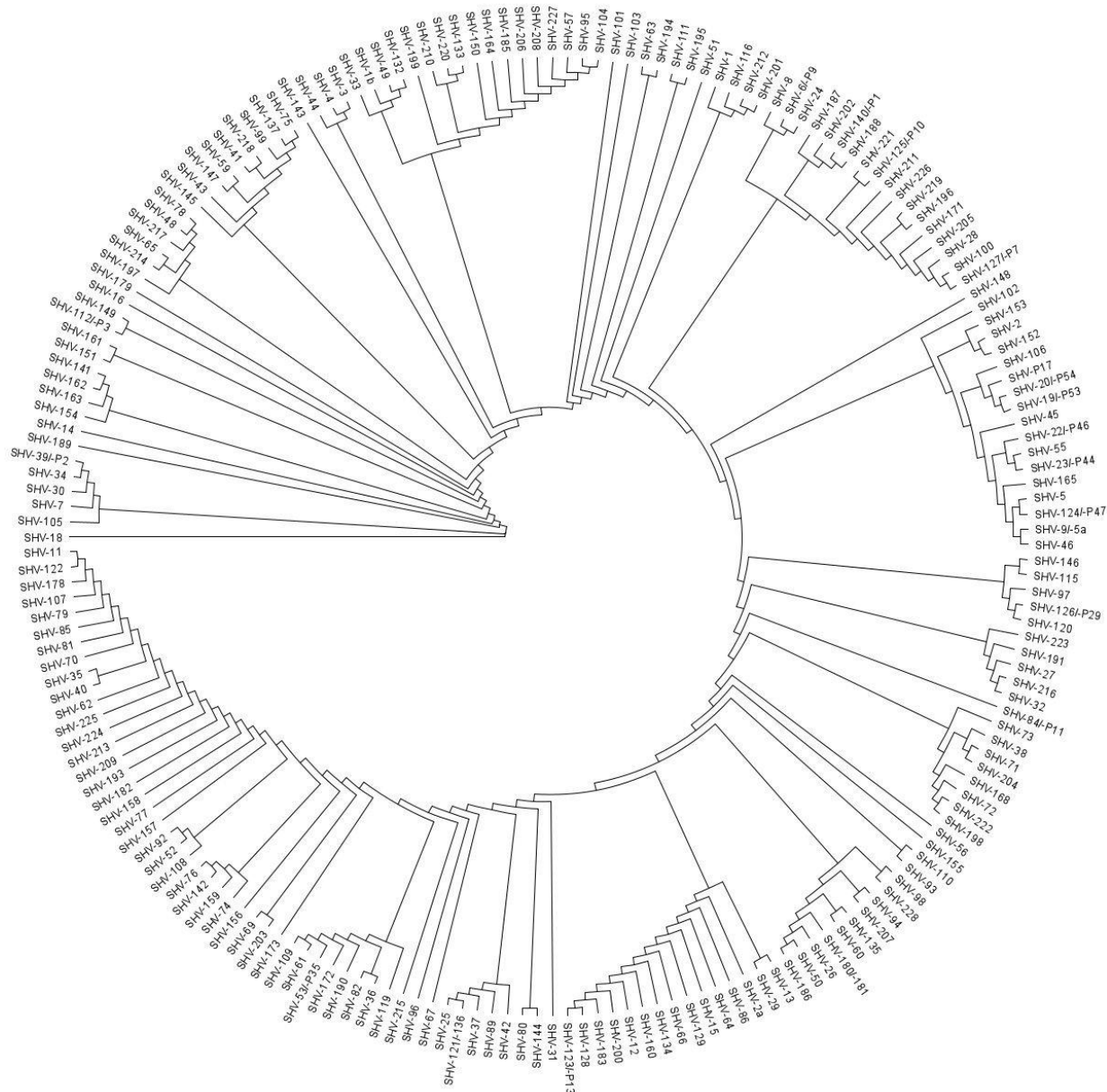
Porovnáním 199 sekvencí SHV enzymů byly identifikovány individuálně zachované motivy aktivních míst včetně x-x-fenylalanin-lysin na pozici 66-69 (66-XXFK-69; číslování podle SHV-1; Obr. 3). Mezi ostatní aminokyselinové úseky a aminokyseliny, které nejsou uvedeny na obrázku, patří arginin na pozici 2 a 5 (R2, R5), isoleucin na pozicích 8 až 9 (I8, I9), leucin v místech 11 až 12, 17 a 26 (11-LL-12, L17, L26), valin v místě 19 (V19), serin-prolin-glutamin na pozici 22-24 (22-SPQ-24), glutamin-isoleucin-lysin v poloze 28-30 (28-QIK-30), serin a kyselina glutamová na pozici 32 až 33 (32-SE-33), serin a glycin v místě 37-38 (37-SG-38), methionin v poloze 266 (M266), glutamin na místě 271 (Q271), isoleucin a alanin na pozici 273-274 (273-IA-274), glycin v poloze 277 (G277), alanin na pozici 279 (A279) a kyselina glutamová-histidin-tryptofan-glutamin na pozici 282-285 (282-EHWQ-285).



**Obr. 3.** Porovnání 199 aminokyselinových sekvencí SHV enzymů. Analýza a tvorba obrázku byla provedena v Geneious Prime. Na obrázku jsou barevně zvýrazněny pouze stejné aminokyselinové zbytky ve všech sekvencích. Zelený panel označuje aminokyseliny, které jsou v dané poloze totožné ve všech sekvencích. Odlišné aminokyselinové zbytky jsou označeny tečkami.

V tomto případě srovnání aminokyselinových sekvencí pozorovaných SHV enzymů ukázalo 93,1-99,7% sekvenční identitu mezi nimi. Například SHV-16 a SHV-100 měly 93,1% aminokyselinovou shodu, zatímco v případě SHV-7 a SHV-105 byla identita 99,7 % (výsledky nejsou ukázány).

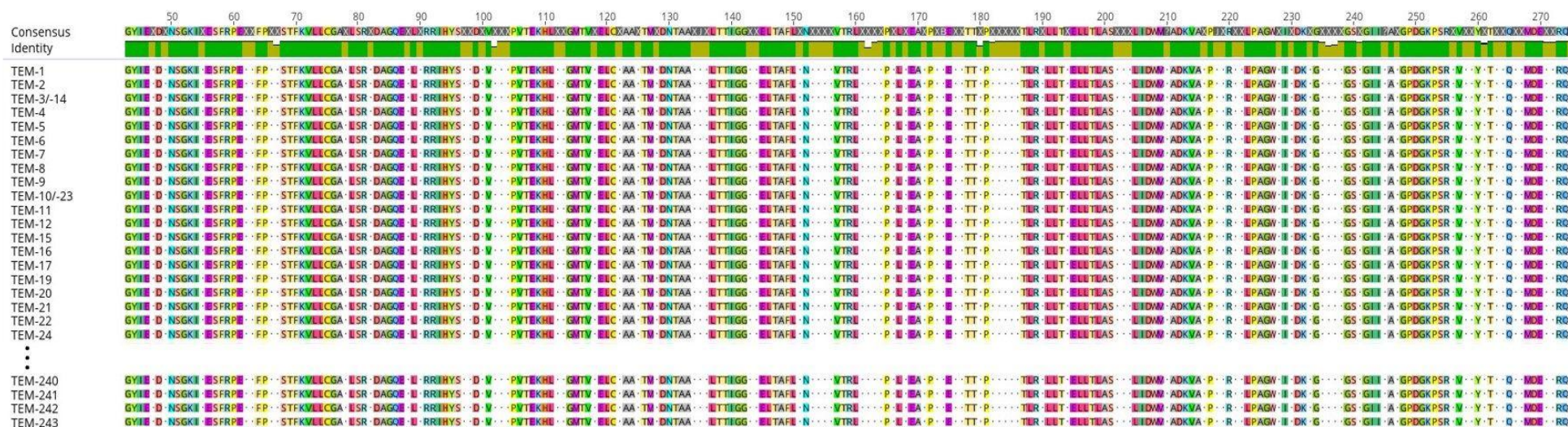
Příbuznost jednotlivých SHV enzymů byla znázorněna pomocí fylogenetického stromu. Kořenové uspořádání stromu umožnilo rozlišit různá seskupení a identifikovat několik hlavních skupin a podskupin (Obr. 4).



**Obr. 4.** Fylogenetický strom SHV enzymů. Dendrogram získaný porovnáním 199 SHV enzymů prostřednictvím Geneious PhyML programu.



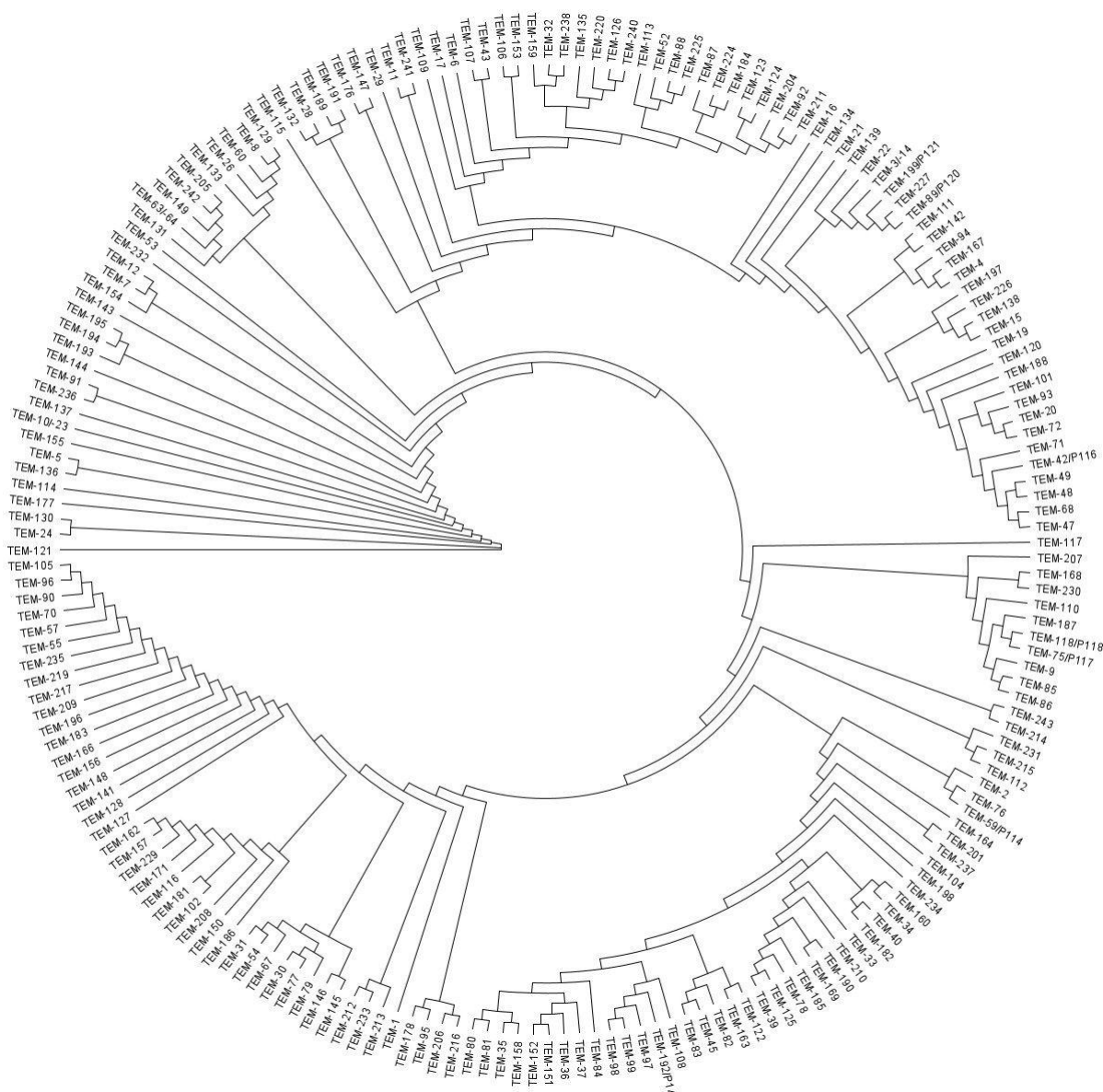
Analýzou dalších 199 sekvencí TEM enzymů byly identifikovány individuálně zachované aminokyseliny a motivy včetně serin-threonin-fenylalanin-lysin na pozici 68-71 (68-STFK-71; číslování podle TEM-1; Obr. 5). Mezi zbývající identické aminokyselinové úseky a aminokyseliny, které nejsou uvedeny na obrázku, patří methionin na pozici 1 (M1), histidin-fenylalanin-arginin-valin na pozici 5-8 (5-HFRV-8), prolin a fenylalanin na místě 12-13 (12-PF-13), alanin-alanin-fenylalanin-cystein v poloze 15-18 (15-AAFC-18), prolin-valin-fenylalanin na pozici 20-22 (20-PVF-22), prolin v poloze 25 (P25), threonin na místě 27 (T27), valin-lysin-valin na místě 29-31 (29-VKV-31), alanin a kyselina glutamová v poloze 34-35 (34-AE-35), kyselina glutamová-isoleucin-glycin na místě 277-279 (277-EIG-279), a serin-leucin-isoleucin-lysin v poloze 281-284 (281-SLIK-284).



**Obr. 5.** Porovnání 199 aminokyselinových sekvencí TEM enzymů. Analýza a tvorba obrázku byla provedena v Geneious Prime. Na obrázku jsou barevně zvýrazněny pouze stejné aminokyselinové zbytky ve všech sekvencích. Zelený panel označuje aminokyseliny, které jsou v dané poloze totožné ve všech sekvencích. Odlišné aminokyselinové zbytky jsou označeny tečkami.

Aminokyselinová shoda studovaných sekvencí TEM enzymů se nacházela v rozmezí 93,4-99,7 %. Nejnižší 93,4% aminokyselinová shoda byla zaznamenána například u TEM-178 a TEM-194, přičemž 99,7% shoda byla například mezi TEM-189 a TEM-191 (výsledky nejsou ukázány).

Pomocí fylogenetického stromu byla na základě podobnosti aminokyselinových sekvencí znázorněna příbuznost mezi členy TEM enzymů. Kořenové uspořádání stromu umožnilo pozorovat různá seskupení a identifikovat několik hlavních skupin a podskupin (Obr. 6).



**Obr. 6.** Fylogenetický strom TEM enzymů. Dendrogram získaný porovnáním 199 TEM enzymů pomocí Geneious PhyML programu.

### 4.3.2 Bodové mutace u vybraných ESBL enzymů

Studiem bodových mutací bylo potvrzeno, že nejvíce aminokyselinových změn bylo pozorováno u ESBL enzymů typu CTX-M, OXY, TEM, SHV, PER a VEB, a to v počtu 6449, 890, 534, 417, 162 a 61, v tomto pořadí (výsledky nejsou ukázány). V případě CTX-M enzymů byly zaznamenány tyto nejčastější aminokyselinové změny: S → T (271-krát, tato aminokyselinová změna byla také popsána u všech zbývajících analyzovaných ESBL enzymů), T → S (238-krát) a K → Q (217-krát). Naopak, například pouze jedenkrát byla zaznamenána změna A → I, resp. M, Q nebo R, atd. Mezi nejčastější aminokyselinové změny u zbývajících ESBL enzymů patřily: A → T (108-krát), I → V (15-krát), A → V (20-krát), E → K (82-krát), a I → V (14-krát) u OXY, PER, SHV, TEM, a VEB, v tomto pořadí.

### 4.3.3 Výskyt ESBL-pozitivních Gram-negativních bakterií v animálních vzorcích

Pouze prvních 16 párů primerů sloužících k detekci šesti členů skupiny beta-laktamáz třídy A (CTX-M, GES, PER, SHV, TEM, VEB) a jednoho člena skupiny beta-laktamáz třídy D (OXA) bylo experimentálně testováno pomocí PCR (Simplex I) s použitím různých referenčních a animálních izolátů. V případě OXA se jednalo o 4 podskupiny OXA (OXA-1-like, OXA-2-like, OXA-10-like a OXA-48-like), OXA-18 a OXA-45. Zbývajících 40 párů primerů nebylo experimentálně testováno (Tab. 1).

U pěti referenčních beta-laktamáza-pozitivních kmenů bylo všech osm přítomných genů rezistence identifikováno správně a poskytly amplikony s předpokládanými velikostmi (Tab. 1; 228–624 bp), čímž potvrdily specifičnost použitých primerů. Těmito geny byly *bla*<sub>GES-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>OXA-2-like</sub>, *bla*<sub>OXA-10-like</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>SHV-18</sub> a *bla*<sub>TEM-1</sub> (údaje nejsou uvedeny). V případě vybraných animálních izolátů byly experimentálně potvrzeny různé typy ESBL. Celkem 40 % studovaných izolátů (40 z 99; 2-krát *C. freundii*, 2-krát *E. cloacae*, 35-krát *E. coli*, a 1-krát *S. fonticola*) obsahovalo různé kombinace ESBL genů. Přičemž bylo zjištěno, že 32 ESBL-pozitivních izolátů nese geny typu CTX-M (*bla*<sub>CTX-M-1</sub>, n = 12; *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, n = 2; *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, n = 1; *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, n = 1; *bla*<sub>CTX-M-like</sub>, n = 16). Zároveň byl u pěti těchto uvedených kmenů nalezen i *bla*<sub>OXA-1-like</sub> (jednou konkrétní OXA-1) a *bla*<sub>TEM-type</sub> BSBL/ESBL gen (jednou konkrétní BSBL gen *bla*<sub>TEM-32</sub>), přičemž u dalších osmi kmenů byl zjištěn spolu s CTX-M enzymem i TEM fenotyp (CTX-M-1 a TEM-1B, n=1; CTX-M-1 a TEM-like, n=1; CTX-M-like a TEM-like, n=6). Dále byl TEM, SHV a TEM/SHV fenotyp nalezen u čtyř, jednoho a tří izolátů, v tomto pořadí (údaje nejsou uvedeny). Přítomnost dalších osmi ESBL genů (*bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>OXA-2-like</sub>, *bla*<sub>OXA-10-like</sub>, *bla*<sub>OXA-18</sub>, *bla*<sub>OXA-45</sub>,

*bla*<sub>OXA-48-like</sub>, *bla*<sub>PER</sub>, *bla*<sub>VEB</sub>) nebyla potvrzena. Pozitivní PCR amplifikace těchto genů byla provedena pomocí následujících specifických primerů: CTX-M-F1/R1, CTX-M-F2/R2, OXA(1)-F/R, SHV-F/R a TEM-F/R. Produkty PCR všech beta-laktamáza-pozitivních animálních kmenů vykazovaly amplikony predikovaných velikostí (Tab. 1; 245 – 593 bp) a následným sekvenováním byla potvrzena přítomnost těchto *bla* genů. Naopak negativní kontroly amplikony neobsahovaly. U zbývajících 59 izolátů (60 %) nebyla prostřednictvím PCR potvrzena žádná studovaná ESBL.

## 4.4 Diskuze

Za poslední desetiletí lze pozorovat celosvětově rychlý přírůstek ESBL- a karbapenemázu-produkujících bakterií u zvířat určených k produkci potravin (Dobiášová *et al.*, 2013; Poirel *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). Zdroje množení a šíření beta-laktamáz zahrnují kromě nemocničního či komunitního prostředí také papírovou měnu či mince. Příkladem je přítomnost Gram-negativního patogenu *E. cloacae* produkujícího rozšířený typ enzymu OXA-48 na povrchu alžírských mincí. Zejména současná manipulace s penězi a potravinami přispívá k šíření infekčních agens, a tedy k šíření rezistence k ATB (Bendjama *et al.*, 2020).

Zvyšující se prevalence karbapenem-rezistentních bakterií s různými karbapenemázami zdůrazňuje provádění přísných kontrolních opatření k zabránění jejich šíření. Dále se v publikacích stále více diskutuje o tom, že vznik rezistence souvisí s absorpcí rezistentních genů v celém genomu. Co se týče MDR fenotypu u *A. baumannii*, mnoho studií popisuje, že je za to zodpovědná produkce přirozených beta-laktamáz, nadměrná exprese efluxních pump a nízká permeabilita membrány (Peleg *et al.*, 2008). Dále se zjistilo, že MDR fenotyp u *A. baumannii* se významně připisoval ostrovu rezistence nesoucímu transpozony, integrony a další mobilní genetické prvky, přičemž se také objasnilo, že efluxní systémy mohou poskytnout rezistenci na konkrétní ATB v menší míře než enzymy inaktivující ATB (Adams *et al.*, 2008). Dále například infekce způsobené *P. aeruginosa* jsou stále obtížněji léčitelné, hlavně kvůli jejich přirozené rezistenci na různé druhy ATB a dezinfekční prostředky a schopnosti adaptivní rezistence. V případě bakteriální rezistence na ATB se zdá, že existuje určitá souvislost také s velikostí genomu. U *P. aeruginosa* se jeví, že to souvisí s jeho nejvyšším podílem regulačních genů (představujících 9,4 % oproti například 5,8 % v *E. coli*) a vysokým počtem genů zapojených do katabolismu, transportu a efluxu organických sloučenin, jakož i systémů chemotaxe (Stover *et al.*, 2000). Dále se uvádí, že *P. aeruginosa* má ve srovnání s *E. coli* přibližně 12- až 100-krát nižší propustnost vnější membrány (Hancock, 1998).

Dále není pochyb o tom, že používání ATB a s ním spojený selekční tlak přispívá k rozvoji rezistence získáváním genů rezistence a udržováním mutací spojených s chromozomální rezistencí (Kim *et al.*, 2018; Kolář *et al.*, 2001; Martínez and Baquero, 2000; Mladenović-Antić *et al.*, 2016). Možným řešením problému je proto omezení určitých antibakteriálních látek a příslušných tříd ATB zaměřených na omezení jejich selekčního tlaku (Zequinao *et al.*, 2020). Selekční tlak je však složitější záležitost. Například spotřebu určitých ATB je zřejmě možné snížit pouze, pokud se zvýší spotřeba jiných. Antibiotická rezistence je navíc často vícenásobná, což znamená, že selekční tlak konkrétního ATB



činidla vede ke zvýšené rezistenci na jiná ATB, například rezistence ESBL-pozitivních enterobakterií na cefalosporiny a fluorochinolony nebo rezistence MRSA na klindamycin (Falagas and Karageorgopoulos, 2009; Che Hamzah *et al.*, 2019). Dalším důležitým aspektem ovlivňujícím selekční tlak je koncentrace ATB, to znamená správné dávkování ATB a jeho distribuce v těle. Klinickému mikrobiologovi a lékaři záleží na přesném dávkování z hlediska farmakodynamických/farmakokinetických parametrů, aby bylo dosaženo uspokojivých výsledků u pacientů. Otázkou však je, jak vybrané dávkování a konečná koncentrace ATB podporuje vznik rezistentních mutantů. Fenomén bakteriální rezistence představuje komplexní problém a vznik mutantů rezistentních na ATB závisí na různých aspektech jako jsou fyziologie, genetika, historické chování populací bakterií, dynamika ATB-bakterií a další (Martínez and Baquero, 2000; Zhao and Drlica, 2002). Kromě toho jsou vznik, udržování a šíření znaků rezistence ovlivněny i sociálními a ekonomickými faktory.

Je zajímavé, že některé studie prokázaly, že nemusí existovat přímý vztah mezi podáváním vybraných ATB a bakteriální rezistencí (Ho *et al.*, 2012; Lai *et al.*, 2011). Podobně Htoutou Sedláková a kol. uváděly klesající spotřebu cefalosporinů III. generace a fluorochinolonů, ale zvyšující se rezistenci enterobakterií na tyto léky (Htoutou Sedláková *et al.*, 2014). Může to být způsobeno řadou mechanismů. Někteří autoři tvrdí, že vztah mezi spotřebou ATB a rezistencí zmizí po překročení určitého prahu rezistence, protože mobilní genetické prvky (zejména plazmidy a transpozony) cirkulují v bakteriálních populacích a pokles selekčního tlaku ATB již tento jev neovlivňuje (Barbosa and Levy, 2000). Bylo zdokumentováno, že přenosové rychlosti ESBL-plazmidů jsou nejvyšší v nepřítomnosti ATB (Händel *et al.*, 2015). Dalším vysvětlením může být kolaterální účinek ATB, což znamená, že nejen subinhibiční koncentrace ATB mohou stimulovat vznik a šíření jeho odpovídajícího rezistentního genu, ale že je možná i kolaterální stimulace jinými ATB. Například mobilní genetický prvek nesoucí gen pro rezistenci na tetracyklin je schopen prokázat 1000-násobné zvýšení své přenosové frekvence, když je vystaven subinhibičním koncentracím nejen tetracyklinů, ale i makrolidů, linkosamidů a streptograminů (Merlin, 2020).

Studium vybraných klinicky významných ESBL enzymů (CTX-M, SHV, TEM) v databázi BLDB a BLASTn odhalilo, že nejrozšířenější skupinou v rámci bakteriálních rodů byly ESBL enzymy typu TEM, které byly zjištěny u 45 rodů, následovaly CTX-M u 25 a SHV u 23. Dále bylo zjištěno, že ESBL enzymy typu CTX-M, GES, OXA (OXA-1-like, OXA-2-like, OXA-10-like), SHV, TEM a VEB se nejčastěji vyskytují u vybraných rodů

enterobakterií (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*) a GNNF tyčinek (*Acinetobacter*, *Pseudomonas*; výsledky nejsou ukázány).

V této studii bylo analyzováno celkem 37 typů ESBL genů, ve kterých bylo dohromady popsáno 1322 různých genů beta-laktamáz, z nichž jen 593 enzymů mělo ESBL fenotyp na základě BLDB databáze. Ty zahrnovaly jednoho člena rodiny beta-laktamáz třídy C (ADC), jednoho člena beta-laktamáz třídy D (4 podskupiny OXA, OXA-18 a OXA-45) a 35 členů beta-laktamáz třídy A (zbylé typy beta-laktamáz uvedených v Tab. 1). Konkrétně v případě nejpočetnějších skupin ESBL enzymů (CTX-M, SHV, TEM) bylo k dnešnímu dni celkem uvedených 216, 199 a 199 variant těchto enzymů s přístupovým kódem do Genbanku, v tomto pořadí. Enzymy CTX-M byly podle BLDB databáze subklasifikované podobností aminokyselinových sekvencí do 5 skupin (CTX-M-1-like, CTX-M-2-like, CTX-M-8-like, CTX-M-9-like a CTX-M-151-like).

V současnosti jsou nejběžněji používané molekulární metody pro detekci různých beta-laktamáz, včetně ESBL a karbapenemáz, běžné simplexní a multiplexní PCR, jakož i PCR v reálném čase (z angl. *Real-Time Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR). Například byly popsány RT-PCR metody s analýzou křivky tání na rozlišení 10 genů beta-laktamáz (*blaKPC*, *blaOXA-48*, *blaNDM*, *blaVIM*, *blaIMP*, *blaCTX-M-1+2-group*, *blaCMY*, *blaACC*, *blaSHV*, a *blaTEM*) (Singh *et al.*, 2016). Mnohé studie dále použily mikročipy na detekci různých genů beta-laktamáz u Gram-negativních bakterií, z nichž některé mohou poskytnout výsledky již za jeden den. V jedné studii se na identifikaci respiračních patogenů a na detekci přítomnosti 24 genů spojených s rezistencí na beta-laktamová ATB přímo v klinických vzorcích použila RT-PCR kombinovaná s mikročipem. Tato technika prokázala vysokou citlivost a specifitu pro detekci genů rezistence s detekčním limitem 10-100 kopií DNA (Bogaerts *et al.*, 2013). Kromě toho na detekci některých ESBL (SHV a TEM) a karbapenemáz (GES a OXA) je třeba identifikovat mutace, například pomocí Sanger sekvenování, a odlišit tak varianty, které nejsou ESBL nebo kterým chybí karbapenemázová aktivita. Navrhované primery nebo metody obecně slouží k detekci nejběžnějších beta-laktamáz a nepokrývají všechny varianty genů beta-laktamáz. Proto bylo cílem této studie navrhnout PCR test na rychlou detekci co největšího počtu ESBL genů.

V krátkosti, *in silico* analýza potvrdila, že sady primerů z Tab. 1 (prvních 16 párů primerů dohromady) mohou být použity k detekci minimálně 449 ESBL genů popsáných u různých rodů. Ostatní primery uvedené v Tab. 1 (zbývajících 40 párů primerů, které nebyly experimentálně testovány pomocí PCR) mohou specificky rozpoznávat dalších minimálně 143 ESBL podtypů nalezených u mnoha rodů. Celkově by bylo možné vytvořit sady

primerů použit pro detekci 1320 podtypů dosud popsaných beta-laktamáz (99,8 %), z nichž je 592 ESBL genů (99,8 %).

Následuje podrobnější diskuse o klinicky významných genech kódujících ESBL a jejich primery. Klinicky významné beta-laktamázy byly ty, u kterých byly hlášeny enzymy kódované plazmidem nebo ESBL. Dosud bylo popsáno celkem 216 CTX-M subtypů. Naše primery byly schopny identifikovat 215 podtypů. Jedinou výjimkou byl gen *bla*<sub>CTX-M-151</sub> (přístupové číslo do GenBank - AB916359) zjištěný u *S. enterica*, a proto bude muset být navržen nový primer, aby ho odhalil. SHV-F/R primer může sloužit k identifikaci 199 subtypů SHV enzymů. Při dvou kratších sekvencích genů *bla*<sub>SHV-39/P2</sub> a *bla*<sub>SHV-112/P3</sub> nebylo možné ověřit specifčnost tohoto primeru. Primery ADC-F/R (ADC-F1 / R1 až ADC-F5/R5) jsou použitelné pro detekci 231 subtypů *bla*<sub>ADC-like</sub> genů, ale nebyly schopny rozlišit jednu alelickou variantu (ADC-8; přístupové číslo do GenBank - AM293332), a proto bude nutné navrhnout nový pár primerů, aby ji identifikovaly. Zbývající navrhované univerzální oligonukleotidy byly schopné rozlišit všechny dosud popsané subtypy v následujících podskupinách beta-laktamáz.

V této studii bylo na přítomnost vybraných genů ESBL enzymů zkoumáno 41 izolátů enterobakterií a 58 izolátů GNNF bakterií rezistentních k cefotaximu nebo ceftazidimu. Výsledky PCR reakcí potvrdily, že 40 % studovaných animálních izolátů bylo pozitivních na geny *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> a *bla*<sub>TEM</sub>. Sekvenování ukázalo, že šlo konkrétně o tyto typy enzymů: 1) CTX-M-1/-2/-8/-15 a CTX-M-like, 2) OXA-1 a OXA-1-like, 3) SHV-like, 4) TEM-1B/-32 a TEM-like, přičemž v některých případech bude ještě třeba provést přesné dourčení. Celkově byl jen jeden ESBL fenotyp, konkrétně CTX-M, SHV a TEM, potvrzen u 19 (18-krát u *E. coli* a 1-krát u *S. fonticola*), jednoho (*E. cloacae*) a čtyř izolátů (4-krát u *E. coli*) enterobakterií, v tomto pořadí. Dále byly zjištěny ESBL fenotypy v kombinaci, konkrétně: 1) v pěti případech ESBL typu CTX-M, OXA a TEM (2-krát u *E. coli*, 2-krát *C. freundii*, a 1-krát *E. cloacae*), 2) u osmi izolátů *E. coli* ESBL typu CTX-M a TEM, a 3) ve třech případech u *E. coli* přítomnost ESBL typu SHV a TEM. Dále je třeba poznamenat, že zbývajících 59 izolátů bakterií bylo negativních v PCR screeningu určeného k detekci vybraných skupin ESBL genů. Proto nemůžeme vyloučit možnost, že tyto kmeny obsahují i jiné vzácné ESBL typy jako CARB, KLUC nebo velmi vzácné OXA varianty. Kromě toho nelze vyloučit ani další mechanismy rezistence jako je nadměrná produkce chromozomálních cefalosporináz (AmpC), zvýšená exprese efluxních pump nebo snížení propustnosti vnější membrány, přičemž nejsou vyloučeny ani nové a nepopsané mechanismy rezistence. Řešením v této oblasti se zdá být sekvenování transkriptomu, jakož

i další formy sekvenování (např. celogenomové sekvenování), které poskytnou v blízké budoucnosti nové možnosti k predikci rezistence.

Dalším cílem studie bylo srovnání aminokyselinových sekvencí zkoumaných ESBL enzymů s cílem objasnit konzervované aminokyseliny a motivy (úseky). O přítomnosti různých zachovaných motivů se píše v mnoha vědeckých člancích (Bush, 2013). V této studii se našel velký počet konzervovaných motivů a aminokyselinových zbytků u vybraných ESBL enzymů (Obr. 1, 3 a 5). Navenek menší množství zachovaných aminokyselinových zbytků a úseků v tomto případě může souviset především s použitím všech dosud popsáných variant studovaných ESBL typů. V rámci studovaných typů ESBL enzymů byla nalezena nejmenší aminokyselinová shoda u CTX-M enzymů, v rozmezí od 55,3 do 99,7 %, což koreluje i s nejvyšším počtem zjištěných bodových mutací v této skupině enzymů.

Někdy je těžké klasifikovat některé beta-laktamázy do podskupiny založené na sekvenčních a jiných vlastnostech, protože jsou značně variabilní. Byly vytvořeny fylogenetické stromy (Obr. 2, 4 a 6), které ukazují podobnost studovaných podtypů ESBL enzymů. Je zřejmé, že mezi geny kódujícími jednotlivé typy ESBL existuje široká pestrost.

## 5 Závěr

V současnosti klinicky významné bakterie stále více získávají další prvky rezistence včetně ESBL, karbapenemáz a fosfoetanolamin transferáz typu MCR (z angl. *Mobilized Colistin Resistance*) vůči karbapenemům a polymyxinům, které se staly poslední volbou ATB při léčbě multirezistentních Gram-negativních infekcí. To naznačuje, že pohyblivé DNA elementy, jako jsou integrony, inzerční sekvence, transpozony a plazmidy, mohou hrát zásadní roli při přenášení a horizontálním přenosu rezistentních genů. Avšak kromě horizontálního mezidruhového přenosu, představují i další maskovací mechanismy v rámci buňky, jako například eflux nebo ztráta porinů, změna tvaru a velikosti bakterií v přítomnosti ATB a společná exprese různých variant beta-laktamáz, hlavní překážky pro běžné fenotypové, diagnostické a molekulární přístupy. Dalším důvodem zvýšení bakteriální rezistence může být klonální šíření geneticky identických kmenů konkrétních druhů bakterií mezi pacienty.

Jedním z cílů práce byla analýza ESBL-produkujících enterobakterií a GNNF bakterií animálního původu se zaměřením na genetickou charakterizaci přítomných enzymů. Detekce těchto genů rezistence byla realizována použitím specifických párů primerů navržených prostřednictvím bioinformatického softwaru Geneious. V rámci předkládané diplomové práce bylo navrženo 56 párů oligonukleotidů, z nichž 16 párů bylo experimentálně testováno na dostupných izolátech.

Prevalence ESBL-pozitivních kmenů bakterií na kuřecích farmách a jatkách na Moravě dosáhla hodnoty 40 %, přičemž byly zaznamenány čtyři ESBL typy - CTX-M, OXA, SHV a TEM. Konkrétně šlo o tyto typy enzymů – 1) CTX-M-1/-2/-8/-15 a CTX-M-like, 2) OXA-1 a OXA-1-like, 3) SHV-like, a 4) TEM-1B/-32 a TEM-like. Nejběžnější gen byl *bla*<sub>CTX-M-like</sub> (32 %), následovaný *bla*<sub>TEM-like</sub> (20 %), *bla*<sub>OXA-1-like</sub> (5 %), a *bla*<sub>SHV-like</sub> (4 %), buď samostatně nebo v kombinaci. Nejčastěji izolovanými byly kmeny *E. coli*. Zbývajících 60 % izolátů rezistentních k cefalosporinům s rozšířeným spektrem účinku bylo ESBL negativních.

Výsledky naznačují, že navržené primery mají schopnost specificky detekovat 592 analyzovaných podtypů ESBL (99,8 %) a jsou vhodné pro detekci a epidemiologickou analýzu širokého spektra ESBL genů v různých bakteriích. Dále potvrzení přítomnosti rezistentních genů bakterií u zvířat určených k produkci potravin může představovat vysoké riziko pro lidské zdraví v důsledku jejich konzumace. Z toho důvodu se musí posuzovat nejen úloha zdravých hospodářských zvířat jako potenciálního rezervoáru na šíření rezistentních bakterií, ale musí se zvážit i jejich vliv na potravinový řetězec.

## Seznam použité literatury

- Abraham E. P., Chain E. (1940) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* **146**, 837-837.
- Adams M. D., Goglin K., Molyneaux N., Hujer K. M., Lavender H., Jamison J. J., MacDonald I. J., Martin K. M., Russo T., Campagnari A. A., Hujer A. M., Bonomo R. A., Gill S. R. (2008) Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* **190**, 8053-8064.
- Alegría Á., Arias-Temprano M., Fernández-Natal I., Rodríguez-Calleja J. M., García-López M.-L., Santos J. A. (2020) Molecular diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* from foods of animal origin and human patients. *Int J Environ Res Public Health* **17**, 1312.
- Alekshun M. N., Levy S. B. (2007) Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **128**, 1037-1050.
- Ambler R. P. (1980) The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**, 321-331.
- Apisarnthanarak A., Kiratisin P., Mundy L. M. (2005) Evaluation of *Ochrobacterium intermedium* bacteremia in a patient with bladder cancer. *Diagn Microbiol Infect Dis* **53**, 153-155.
- Arana D. M., Ortega A., González-Barberá E., Lara N., Bautista V., Gómez-Ruiz D., Sáez D., Fernández-Romero S., Aracil B., Pérez-Vázquez M., Campos J., Oteo J., Spanish Antibiotic Resistance Surveillance Programme Collaborating Group (2017) Carbapenem-resistant *Citrobacter* spp. isolated in Spain from 2013 to 2015 produced a variety of carbapenemases including VIM-1, OXA-48, KPC-2, NDM-1 and VIM-2. *J Antimicrob Chemother* **72**, 3283-3287.
- Banerjee S., Lo K., Ojkic N., Stephens R., Scherer N. F., Dinner A. R. (2021) Mechanical feedback promotes bacterial adaptation to antibiotics. *Nature Physics* **17**, 403-409.
- Barbosa T. M., Levy S. B. (2000) The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist Updat* **3**, 303-311.
- Bardoň J., Mlynářčík P., Procházková P., Röderová M., Mezerová K., Kolář M. (2018) Occurrence of bacteria with a dangerous extent of antibiotic resistance in poultry in the Central Region of Moravia. *Acta Vet Brno* **87**, 165-172.
- Barlow M., Reik R. A., Jacobs S. D., Medina M., Meyer M. P., McGowan Jr. J. E., Tenover F. C. (2008) High rate of mobilization for *bla*<sub>CTX-MS</sub>. *Emerg Infect Dis* **14**, 423-428.
- Bauernfeind A., Casellas J. M., Goldberg M., Holley M., Jungwirth R., Mangold P., Röhnisch T., Schweighart S., Wilhelm R. (1992) A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection* **20**, 158-163.
- Bell J. M., Turnidge J. D., Gales A. C., Pfaller M. A., Jones R. N. (2002) Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-99). *Diagn Microbiol Infect Dis* **42**, 193-198.
- Bendjama E., Loucif L., Chelaghma W., Attal C., Bellakh F. Z., Benaldjia R., Kahlat I., Meddour A., Rolain J.-M. (2020) First detection of an OXA-48-producing *Enterobacter cloacae* isolate from currency coins in Algeria. *J Glob Antimicrob Resist* **23**, 162-166.

- Bogaerts P., Hamels S., de Mendonca R., Huang T.-D., Roisin S., Remacle J., Markine-Goriaynoff N., de Longueville F., Plüster W., Denis O., Glupczynski Y. (2013) Analytical validation of a novel high multiplexing real-time PCR array for the identification of key pathogens causative of bacterial ventilator-associated pneumonia and their associated resistance genes. *J Antimicrob Chemother* **68**, 340-347.
- Bonnet R. (2004) Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 1-14.
- Bonomo R. A., Szabo D. (2006) Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* **43**, 49-56.
- Boral B., Unaldi Ö., Ergin A., Durmaz R., Eser Ö. K., *Acinetobacter* Study Group (2019) A prospective multicenter study on the evaluation of antimicrobial resistance and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in intensive care units with clinical and environmental features. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **18**, 19.
- Bradford P. A. (2001) Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* **14**, 933-951.
- Bradford P. A., Urban C., Jaiswal A., Mariano N., Rasmussen B. A., Projan S. J., Rahal J. J., Bush K. (1995) SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 899-905.
- Brooke J. S. (2012) *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin Microbiol Rev* **25**, 2-41.
- Bush K. (2013) The ABCD's of beta-lactamase nomenclature. *J Infect Chemother* **19**, 549-559.
- Bush K., Jacoby G. A. (2010) Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 969-976.
- Bush K., Jacoby G. A., Medeiros A. A. (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 1211-1233.
- Cantón R., Novais A., Valverde A., Machado E., Peixe L., Baquero F., Coque T. M. (2008) Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* **14**, 144-153.
- Casellas J. M., Goldberg M. (1989) Incidence of strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Argentina. *Infection* **17**, 434-436.
- Coculescu B.-I. (2009) Antimicrobial resistance induced by genetic changes. *J Med Life* **2**, 114-123.
- Davies J., Davies D. (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**, 417-433.
- Dobiášová H., Dolejšká M., Jamborová I., Brhelová E., Blažková L., Papoušek I., Kozlová M., Klimeš J., Čížek A., Literák I. (2013) Extended spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among *Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic. *FEMS Microbiol Ecol* **85**, 604-611.

- Falagas M. E., Karageorgopoulos D. E. (2009) Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect* **73**, 345-354.
- Fleming P. C., Goldner M., Glass D. G. (1963) Observations on the nature, distribution, and significance of cephalosporinase. *Lancet* **1**, 1399-1401.
- Gazouli M., Legakis N. J., Tzouveleki L. S. (1998) Effect of substitution of Asn for Arg-276 in the cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase CTX-M-4. *FEMS Microbiol Lett* **169**, 289-293.
- Gniadkowski M. (2001) Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect* **7**, 597-608.
- Guillon H., Eb F., Mammeri H. (2010) Characterization of CSP-1, a novel extended-spectrum beta-lactamase produced by a clinical isolate of *Capnocytophaga sputigena*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 2231-2234.
- Hai P. D., Hoa L. T. V., Tot N. H., Phuong L. L., Quang V. V., Thuyet B. T., Son P. N. (2020) First report of biliary tract infection caused by multidrug-resistant *Serratia fonticola*. *New Microbes New Infect* **36**, 100692.
- Hancock R. E. (1998) Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* **27**, Suppl 1: S93-99.
- Händel N., Otte S., Jonker M., Brul S., ter Kuile B. H. (2015) Factors that affect transfer of the IncII beta-lactam resistance plasmid pESBL-283 between *E. coli* strains. *PLoS One* **10**, e0123039.
- Hanson N. D., Sanders C. C. (1999) Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among *Enterobacteriaceae*. *Curr Pharm Des* **5**, 881-894.
- Heritage J., M'Zali F. H., Gascoyne-Binzi D., Hawkey P. M. (1999) Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* **44**, 309-318.
- Ho C.-M., Ho M.-W., Liu Y.-C., Toh H.-S., Lee Y.-L., Liu Y.-M., Huang C.-C., Lu P.-L., Liu C.-E., Chen Y.-H., Ko W.-C., Tang H.-J., Yu K.-W., Chen Y.-S., Chuang Y.-C., Wang J.-H., Hsueh P.-R. (2012) Correlation between carbapenem consumption and resistance to carbapenems among *Enterobacteriaceae* isolates collected from patients with intra-abdominal infections at five medical centers in Taiwan, 2006-2010. *Int J Antimicrob Agents* **40**, Suppl 1: S24-28.
- Honoré N., Nicolas M. H., Cole S. T. (1986) Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. *EMBO J* **5**, 3709-3714.
- Htoutou Sedláková M., Urbánek K., Vojtová V., Suchánková H., Imwensi P., Kolář M. (2014) Antibiotic consumption and its influence on the resistance in *Enterobacteriaceae*. *BMC Res Notes* **7**, 454.
- Husičková V., Čekanová L., Chromá M., Htoutou Sedláková M., Hricová K., Kolář M. (2012) Carriage of ESBL- and AmpC-positive *Enterobacteriaceae* in the gastrointestinal tract of community subjects and hospitalized patients in the Czech Republic. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **156**, 348-353.
- Chalachanová A. (2019) Výskyt oxacilináz u vybraných Gram-negativních bakterií. Olomouc. Univerzita Palackého. Přírodovědecká fakulta.



- Chambers H. F. (1997) Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* **10**, 781-791.
- Che Hamzah A. M., Yeo C. C., Puah S. M., Chua K. H., Rahman N. I. A., Abdullah F. H., Othman N., Chew C. H. (2019) Tigecycline and inducible clindamycin resistance in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Terengganu, Malaysia. *J Med Microbiol* **68**, 1299-1305.
- Jacobs C., Joris B., Jamin M., Klarsov K., Van Beeumen J., Mengin-Lecreulx D., Van Heijenoort J., Park J. T., Normark S., Frère J. M. (1995) AmpD, essential for both beta-lactamase regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *Mol Microbiol* **15**, 553-559.
- Jacoby G. A. (2009) AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* **22**, 161-182.
- Jeon J. H., Hong M. K., Lee J. J., Park K. S., Karim A. M., Jo J. Y., Kim J. H., Ko K. S., Kang L. W., Lee S. H. (2014) Structure of ADC-68, a novel carbapenem-hydrolyzing class C extended-spectrum beta-lactamase isolated from *Acinetobacter baumannii*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **70**, 2924-2936.
- June C. M., Vallier B. C., Bonomo R. A., Leonard D. A., Powers R. A. (2014) Structural origins of oxacillinase specificity in class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 333-341.
- Khan A. U., Maryam L., Zarrilli R. (2017) Structure, genetics and worldwide spread of New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol* **17**, 101.
- Kim B., Kim Y., Hwang H., Kim J., Kim S.-W., Bae I.-G., Choi W. S., Jung S. I., Jeong H. W., Pai H. (2018) Trends and correlation between antibiotic usage and resistance pattern among hospitalized patients at university hospitals in Korea, 2004 to 2012: A nationwide multicenter study. *Medicine (Baltimore)* **97**, e13719.
- Kliebe C., Nies B. A., Meyer J. F., Tolxdorff-Neutzling R. M., Wiedemann B. (1985) Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* **28**, 302-307.
- Kolář M., Čermák P., Hobzová L., Bogdanová K., Neradová K., Mlynářčík P., Boštík P. (2020) Antibiotic resistance in nosocomial bacteria isolated from infected wounds of hospitalized patients in Czech Republic. *Antibiotics (Basel)* **9**, 342.
- Kolář M., Htoutou Sedláková M., Urbánek K., Mlynářčík P., Röderová M., Hricová K., Mezerová K., Kučová P., Zapletalová J., Fišerová K., Kurfürst P. (2021) Implementation of antibiotic stewardship in a university hospital setting. *Antibiotics (Basel)* **10**, 93.
- Kolář M., Chromá M., Hricová K., Husičková V., Lovečková Y., Chmelařová E., Bartoníková N., Rybníkářová P. (2010) [Prevalence of ESBL-positive *Enterobacteriaceae* in large moravian hospitals (Czech Republic)]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* **16**, 152-157.
- Kolář M., Látal T., Čermák P., Bartoníková N., Chmelařová E., Sauer P., Kesselová M., Bazgerová E., Běbrová E., Bergerová T., Burgetová D., Dovalová M., Horová B., Jedličková A., Ježek P., Jirsa R., Lovečková Y., Nyč O., Puchálková B., Rumlerová M., Smolíková M., Šťastná E. (2005) [Prevalence of ESBL-positive strains of *Klebsiella pneumoniae* in the Czech Republic and their molecular biology analysis]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* **11**, 92-99.
- Kolář M., Urbánek K., Látal T. (2001) Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *Int J Antimicrob Agents* **17**, 357-363.

- Lai C.-C., Wang C.-Y., Chu C.-C., Tan C.-K., Lu C.-L., Lee Y.-C., Huang Y.-T., Lee P.-I., Hsueh P.-R. (2011) Correlation between antibiotic consumption and resistance of Gram-negative bacteria causing healthcare-associated infections at a university hospital in Taiwan from 2000 to 2009. *J Antimicrob Chemother* **66**, 1374-1382.
- Lambert P. A. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 1471-1485.
- Lamoureaux T. L., Vakulenko V., Toth M., Frase H., Vakulenko S. B. (2013) A novel extended-spectrum beta-lactamase, SGM-1, from an environmental isolate of *Shingobium* sp. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 3783-3788.
- Levy S. B., Marshall B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* **10**, 122-129.
- Li X.-Z., Nikaido H. (2009) Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* **69**, 1555-1623.
- Lister P. D., Wolter D. J., Hanson N. D. (2009) Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanism. *Clin Microbiol Rev* **22**, 582-610.
- Liu L.-H., Wang N.-Y., Wu A. Y.-Y., Lin C.-C., Lee C.-M., Liu C.-P. (2018) *Citrobacter freundii* bacteremia: risk factors of mortality and prevalence of resistance genes. *J Microbiol Immunol Infect* **51**, 565-572.
- Livermore D. M. (1995) Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* **8**, 557-584.
- Madigan M. T., Bender K. S., Buckley D. H., Sattley W. M., Stahl D. A. (2018) Brock biology of microorganisms, Fifteenth edition. Edition. Pearson, NY NY, 1-1064.
- Mahlen S. D. (2011) *Serratia* infections: from military experiments to current practice. *Clin Microbiol Rev* **24**, 755-791.
- Maraki S., Sarchianaki E., Barbagadakis S. (2012) *Myroides odoratimimus* soft tissue infection in an immunocompetent child following a pig bite: case report and literature review. *Braz J Infect Dis* **16**, 390-392.
- Martínez J. L., Baquero F. (2000) Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 1771-1777.
- Masuda N., Sakagawa E., Ohya S., Gotoh N., Tsujimoto H., Nishino T. (2000) Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 3322-3327.
- Merlin C. (2020) Reducing the consumption of antibiotics: would that be enough to slow down the dissemination of resistances in the downstream environment? *Front Microbiol* **11**, 33.
- Mladenović-Antić S., Kocić B., Veličković-Radovanović R., Dinić M., Petrović J., Randjelović G., Mitić R. (2016) Correlation between antimicrobial consumption and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting: a 10-year study. *J Clin Pharm Ther* **41**, 532-537.
- Mlynářčík P., Chalachanová A., Vagnerová I., Holý O., Zatloukalová S., Kolář M. (2020) PCR detection of oxacillinases in bacteria. *Microb Drug Resist* **26**, 1023-1037.

- Mlynářčik P., Röderová M., Kolář M. (2016) Primer evaluation for PCR and its application for detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Jundishapur J Microbiol* **9**, e29314.
- Naas T., Oueslati S., Bonnin R. A., Dabos M. L., Zavala A., Dortet L., Retailleau P., Iorga B. I. (2017) Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *J Enzyme Inhib Med Chem* **32**, 917-919.
- Naas T., Poirel L., Nordmann P. (2008) Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* **14**, 42-52.
- Nguyen Van J. C., Gutmann L. (1994) [Resistance to antibiotics caused by decrease of the permeability in gram-negative bacteria]. *Presse Med* **23**, 527-531.
- Nordmann P., Poirel L. (2002) Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* **8**, 321-331.
- Pagani L., Dell'Amico E., Migliavacca R., D'Andrea M. M., Giacobone E., Amicosante G., Romero E., Rossolini G. M. (2003) Multiple CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in Northern Italy. *J Clin Microbiol* **41**, 4264-4269.
- Paterson D. L., Bonomo R. A. (2005) Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* **18**, 657-686.
- Peirano G., Pitout J. D. D. (2019) Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: Update on molecular epidemiology and treatment options. *Drugs* **79**, 1529-1541.
- Peleg A. Y., Seifert H., Paterson D. L. (2008) *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* **21**, 538-582.
- Philippon A., Arlet G., Jacoby G. A. (2002) Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1-11.
- Philippon L. N., Naas T., Bouthors A. T., Barakett V., Nordmann P. (1997) OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamases from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 2188-2195.
- Pitout J. D. D., Nordmann P., Laupland K. B., Poirel L. (2005) Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother* **56**, 52-59.
- Poirel L., Berçot B., Millemann Y., Bonnin R. A., Pannaux G., Nordmann P. (2012) Carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. in cattle, France. *Emerg Infect Dis* **18**, 523-525.
- Poirel L., Héritier C., Podglajen I., Sougakoff W., Gutmann L., Nordmann P. (2003) Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV beta-lactamase that compromises the efficacy of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 755-758.
- Poirel L., Ortiz de la Rosa J.-M., Richard A., Aires-de-Sousa M., Nordmann P. (2019) CTX-M-33, a CTX-M-15 derivative conferring reduced susceptibility to carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* **63**, e01515-19.
- Poole K. (2004) Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2200-2223.
- Queenan A. M., Bush K. (2007) Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* **20**, 440-458.

- Quinn J. P., Miyashiro D., Sahm D., Flamm R., Bush K. (1989) Novel plasmid-mediated beta-lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **33**, 1451-1456.
- Reygaert W. C. (2018) An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol* **4**, 482-501.
- Rice L. B. (2012) Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to beta-lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. *Mayo Clin Proc* **87**, 198-208.
- Roberts L. W., Catchpole E., Jennison A. V., Bergh H., Hume A., Heney C., George N., Paterson D. L., Schembri M. A., Beatson S. A., Harris P. N. A. (2020) Genomic analysis of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Queensland reveals widespread transmission of *bla*<sub>IMP-4</sub> on an IncHI2 plasmid. *Microb Genom* **6**, e000321.
- Ryan K. J., Ray C. G., Sherris J. C. (2004) Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases, Fourth Edition. McGraw-Hill, New York, 1-979.
- Si F., Li D., Cox S. E., Sauls J. T., Azizi O., Sou C., Schwartz A. B., Erickstad M. J., Jun Y., Li X., Jun S. (2017) Invariance of initiation mass and predictability of cell size in *Escherichia coli*. *Curr Biol* **27**, 1278-1287.
- Singh P., Pfeifer Y., Mustapha A. (2016) Multiplex real-time PCR assay for the detection of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase genes using melting curve analysis. *J Microbiol Methods* **124**, 72-78.
- Singtohin S., Chanawong A., Lulitanond A., Sribenjalux P., Auncharoen A., Kaewkes W., Songsri J., Pienthaweechai K. (2010) CMY-2, CMY-8b, and DHA-1 plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from a university hospital, Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis* **68**, 271-277.
- Stover C. K., Pham X. Q., Erwin A. L., Mizoguchi S. D., Warrener P., Hickey M. J., Brinkman F. S., Hufnagle W. O., Kowalik D. J., Lagrou M., Garber R. L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L. L., Coulter S. N., Folger K. R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G. K., Wu Z., Paulsen I. T., Reizer J., Saier M. H., Hancock R. E., Lory S., Olson M. V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959-964.
- Sun J., Deng Z., Yan A. (2014) Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun* **453**, 254-267.
- Villa L., Guerra B., Schmoger S., Fischer J., Helmuth R., Zong Z., García-Fernández A., Carattoli A. (2015) IncA/C plasmid carrying *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>CMY-16</sub>, and *fosA3* in *Salmonella enterica* serovar corvallis strain isolated from a migratory wild bird in Germany. *Antimicrob Agents Chemother* **59**, 6597-6600.
- Votava M., Broukal Z., Vaněk J. (2007) Lékařská mikrobiologie pro zubní lékaře. Neptun, Brno, 1-567.
- Waley S. G. (1992) Beta-lactamase: mechanism of action. In *The Chemistry of beta-lactams*. Dordrecht: Springer Netherlands, 198-228.
- Walsh T. R. (2005) The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* **11**, 2-9.
- Walsh T. R., Toleman M. A., Poirel L., Nordmann P. (2005) Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* **18**, 306-325.

- Walther-Rasmussen J., Høiby N. (2006) OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* **57**, 373-383.
- Wang Y., Wu C., Zhang Q., Qi J., Liu H., Wang Y., He T., Ma L., Lai J., Shen Z., Liu Y., Shen J. (2012) Identification of New Delhi metallo-beta-lactamase 1 in *Acinetobacter lwoffii* of food animal origin. *PLoS One* **7**, e37152.
- Webber M. A., Piddock L. J. V. (2003) The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* **51**, 9-11.
- Weber D. A., Sanders C. C. (1990) Diverse potential of beta-lactamase inhibitors to induce class I enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 156-158.
- Wilke M. S., Lovering A. L., Strynadka N. C. J. (2005) Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol* **8**, 525-533.
- Wright G. D. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 1451-1470.
- Yong D., Toleman M. A., Giske C. G., Cho H. S., Sundman K., Lee K., Walsh T. R. (2009) Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla<sub>NDM-1</sub>*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 5046-5054.
- Zequinao T., Gasparetto J., Oliveira D. D. S., Silva G. T., Telles J. P., Tuon F. F. (2020) A broad-spectrum beta-lactam-sparing stewardship program in a middle-income country public hospital: antibiotic use and expenditure outcomes and antimicrobial susceptibility profiles. *Braz J Infect Dis* **24**, 221-230.
- Zhao X., Drlica K. (2002) Restricting the selection of antibiotic-resistant mutant bacteria: measurement and potential use of the mutant selection window. *J Infect Dis* **185**, 561-565.

#### **INTERNETOVÉ ZDROJE:**

- The European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net):** Surveillance Atlas of Infectious Diseases [online]. [cit 2021-04-05]. Dostupné z: <https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>
- Beta-lactamase DataBase (BLDB)** [online]. [cit 2021-03-29]. Dostupné z: <http://bldb.eu/>