

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2019

Bc. Andrea Chalachanová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Výskyt oxacilináz u vybraných
Gram-negativních bakterií**

Diplomová práce

Bc. Andrea Chalachanová

Študijný program: Biologie

Študijný odbor: Molekulární a buněčná biologie

Forma štúdia: Prezenční

Olomouc 2019

Vedúci práce: Mgr. Patrik Mlynářčík, Ph.D.

Prehlasujem, že som diplomovú prácu s názvom „Výskyt oxacilináz u vybraných Gram-negatívnych baktérií“ vypracovala samostatne pod vedením Mgr. Patrika Mlynárčika, Ph.D. na Ústave mikrobiológie Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a s využitím citovanej literatúry.

.....

V Olomouci dňa

.....

Bc. Andrea Chalachanová

Súhrn

Predkladaná diplomová práca sa zaoberá štúdiom oxacilináz u vybraných druhov Gram-negatívnych baktérií, a to *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* a *Acinetobacter baumannii*. Celkovo bolo analyzovaných 50 animálnych a klinických izolátov, ktoré pochádzali z kuracích fariem a bitúnkov na Morave a od pacientov hospitalizovaných na Hemato-onkologickej klinike Fakultnej nemocnice v Olomouci.

V teoretickej časti práce sú prehľadne zhrnuté doterajšie poznatky týkajúce sa riešenej problematiky. Konkrétne sa teoretická časť venuje základnej charakteristike patogénov, s dôrazom na čeľaď *Enterobacteriaceae*, základnej definícii a klasifikácii beta-laktámových antibiotík a typom obranných mechanizmov, ktoré si vytvorili baktérie v priebehu evolúcie ako zbraň v boji proti antimikrobiálnym preparátom. V rámci teoretickej časti sú taktiež popísané jednotlivé triedy beta-laktamáz (klasifikácia podľa Amblera, 1980), pričom najväčší dôraz je kladený na oxacilinázy a ich globálnu epidemiológiu.

K skríningu oxacilináz u vybraných druhov baktérií bola použitá PCR amplifikácia s využitím špecifických párov oligonukleotidov navrhnutých v rámci diplomovej práce. Celkovo bolo s využitím bioinformatického softvéru Geneious nadizajnovaných 39 párov primerov, z čoho 14 párov bolo experimentálne otestovaných v *in vitro* podmienkach. Z 50 vyšetrených bakteriálnych izolátov bola v 21 prípadoch (42%; 19-krát u *K. pneumoniae*, 1-krát u *E. cloacae* a 1-krát *A. baumannii*) potvrdená prítomnosť rôznych *bla*_{OXA} génov. Najčastejšie išlo o výskyt *bla*_{OXA-1-like} génov nachádzajúcich sa u klinických izolátov *K. pneumoniae* a *E. cloacae*. Pri ďalšom klinickom izoláte *A. baumannii* bolo zistených päť rôznych oxacilinázových podrodín - OXA-23-like, OXA-51-like, OXA-58-like, OXA-211-like a OXA-228-like. V prípade animálnych izolátov nebola zistená prítomnosť žiadnych oxacilináz. Získanými výsledkami štúdie bola potvrdená špecifickosť navrhnutých párov oligonukleotidov. Ďalej bolo zistené, že navrhnuté primery disponujú schopnosťou špecificky detegovať 90,3 % zo všetkých oxacilináz popísaných v BLDB databáze. Z daných skutočností vyplýva, že *in silico* a *in vitro* otestované primery by mohli byť použité na klasickú alebo multiplexnú PCR na skrínung prítomnosti oxacilináz u rôznych baktérií, ako aj na monitorovanie ich výskytu a šírenia. Zároveň bol *in silico* analýzou sekvencií reprezentatívnych oxacilináz potvrdený výskyt zachovaných charakteristických aminokyselín a motívov.

Summary

The submitted diploma thesis deals with the study of oxacillinases in selected species of Gram-negative bacteria, namely *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii*. A total of 50 animal and clinical isolates originated from chicken farms and slaughterhouses in Moravia and patients hospitalized at the Hemato-Oncology Clinic of University Hospital in Olomouc have been analyzed.

In the theoretical part of the thesis, there are summarized the current knowledge focused on the problems of the diploma thesis, specifically on basic characteristics of pathogens with an emphasis on *Enterobacteriaceae* family, basic definition and classification of beta-lactam antibiotics and types of defensive mechanisms which bacteria developed during evolution as a weapon in the fight against antimicrobial preparations. In theoretical part there are also described classes of beta-lactamases (classification by Ambler, 1980), while special emphasis on oxacillinases and their global epidemiology.

Screening of oxacillinases in selected bacterial species was performed by PCR amplification using specific pairs of oligonucleotides designed within diploma thesis. Overall, 39 pairs of primers have been designed using bioinformatics software Geneious, of which 14 have been experimentally tested in *in vitro* conditions. Presence of various *bla*_{OXA} genes have been found in 21 cases of the 50 tested bacterial isolates (42%; 19-times in *K. pneumoniae*, once in *E. cloacae* and once in *A. baumannii*). Most often, the occurrence of *bla*_{OXA-1-like} genes have been found in clinical isolates of *K. pneumoniae* and *E. cloacae*. Further, five different oxacillinase subfamilies have been detected in clinical isolate of *A. baumannii* - OXA-23-like, OXA-51-like, OXA-58-like, OXA-211-like and OXA-228-like. No oxacillinases were found in animal isolates. The study results confirmed the specificity of the designed oligonucleotide pairs. Furthermore, it was found that the designed primers possess the ability to specifically detect 90.3% of all oxacillinases described in the BLDB database. These facts suggest that *in silico* and *in vitro* tested primers could be used for single or multiplex PCR to screen for the presence of oxacillinases in various bacteria, as well as to monitor their occurrence and spread. At the same time, the presence of conserved characteristic amino acids and motifs was confirmed by *in silico* analysis of sequences of representative members of oxacillinases.

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som rada poďakovala svojmu školiteľovi Mgr. Patrikovi Mlynárčikovi, Ph.D. za odborné a profesionálne vedenie, za všetky cenné a praktické rady, ktoré mi poskytoval v priebehu celej doby spracovávaní mojej diplomovej práce a v neposlednom rade za jeho priateľský prístup, čas a ochotu, ktorú mi venoval. Ďalej by som chcela poďakovať svojej rodine za ich trezlivosť a nekonečnú podporu, ktorú mi v priebehu môjho štúdia venovali.

Obsah

1	Úvod	1
2	Ciele práce	3
3	Literárny prehľad	4
3.1	Patogény a rozvoj infekčného ochorenia.....	4
3.1.1	Čeľaď <i>Enterobacteriaceae</i>	4
3.1.1.1	Charakteristika <i>Escherichia coli</i>	5
3.1.1.2	Charakteristika <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
3.1.1.3	Charakteristika <i>Enterobacter cloacae</i>	6
3.1.2	Charakteristika <i>Acinetobacter baumannii</i> ako zástupcu nefermentujúcich Gram-negatívnych baktérií.....	6
3.2	Beta-laktámové antibiotiká.....	6
3.2.1	Penicilíny.....	8
3.2.2	Cefalosporíny.....	8
3.2.3	Karbapenémy.....	9
3.2.4	Monobaktámy.....	9
3.3	Bakteriálna antimikrobiálna rezistencia.....	9
3.4	Bakteriálne obranné mechanizmy.....	10
3.4.1	Modifikácia cieľového miesta.....	10
3.4.2	Zhoršený prienik antibiotika do bunky.....	11
3.4.3	Aktívne vyčerpávanie antibiotika z bunky (eflux).....	11
3.4.4	Enzymatická inaktivácia antibiotika.....	11
3.4.5	Ostatné obranné mechanizmy.....	12
3.5	Rezistencia k beta-laktámovým antibiotikám u <i>Enterobacteriaceae</i>	12
3.5.1	Beta-laktamázy.....	13
3.5.1.1	Beta-laktamázy typu <i>AmpC</i>	14
3.5.1.2	Beta-laktamázy typu <i>ESBL</i>	15
3.5.1.3	Karbapenemázy.....	15
3.5.1.4	Oxacilinázy.....	16
3.5.2	Globálna epidemiológia oxacilináz.....	17
4	Materiál a metódy	19
4.1	Bakteriálne kmene a ich kultivácia.....	19
4.2	Chemikálie a roztoky.....	22

4.3	Laboratórne vybavenie a softvéry	23
4.4	Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy.....	23
4.4.1	Porovnávanie sekvencií OXA	23
4.4.2	Dizajnovanie primerov na polymerázovú reťazovú reakciu	24
4.4.3	Izolácia bakteriálnej DNA a podmienky amplifikácie	24
4.4.4	Elektroforetická separácia produktov amplifikácie.....	30
4.4.5	Overenie OXA sekvencie získanej sekvenovaním	30
4.4.6	Konštrukcia fylogenetického stromu.....	30
5	Výsledky	32
5.1	Výskyt OXA-pozitívnych izolátov Gram-negatívnych baktérií v animálnych a klinických vzorkách	32
5.2	<i>In silico</i> analýza oxacilináz	36
6	Diskusia	41
7	Záver	51
8	Literatúra	53

Zoznam symbolov a skratiek

ATB	antibiotikum
BLDB	<i>beta-lactamase database</i>
CHDL	<i>carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamases</i>
DAEC	difúzne-adherentná <i>Escherichia coli</i>
EAEC	enteroagregatívna <i>Escherichia coli</i>
EARS-net	<i>European Antimicrobial Resistance Surveillance Network</i>
EHEC	enterohemoragická <i>Escherichia coli</i>
EIEC	enteroinvazívna <i>Escherichia coli</i>
EPEC	enteropatogénna <i>Escherichia coli</i>
ESBL	<i>extended-spectrum beta-lactamase</i>
ETEC	enterotoxická <i>Escherichia coli</i>
EUCAST	<i>The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
HGT	<i>horizontal gene transfer</i>
HOK	Hemato-onkologická klinika
MBL	metalo-beta-laktamáza/y
MIC	<i>minimal inhibitory concentration</i>
MRSA	<i>methicilin-resistant Staphylococcus aureus</i>
NSBL	<i>narrow-spectrum beta-lactamase</i>
OXA	oxacilinázy
PBP	<i>penicillin-binding protein</i>
QS	<i>quorum sensing</i>
SAM	ampicilín/sulbaktám
STEC	Shiga toxín produkujúca <i>Escherichia coli</i>
TCS	<i>two-component system</i>
UPEC	uropatogénna <i>Escherichia coli</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

Zoznam obrázkov

Obrázok 1: Rezistencia izolátov <i>K. pneumoniae</i> voči karbapenémom v roku 2017 na území Európy	13
Obrázok 2: PCR produkty získané amplifikáciou <i>bla</i> _{OXA-1-like} génov pomocou primerov OXA(3)-F/R u klinických vzoriek <i>K. pneumoniae</i>	33
Obrázok 3: Porovnanie osekvenovanej sekvencie oxacilinázy z klinického izolátu s referenčným <i>bla</i> _{OXA-1} génom (Geneious, Biomatters)	34
Obrázok 4: PCR produkty získané amplifikáciou <i>bla</i> _{OXA} génov pomocou špecifických primerov u klinického izolátu <i>A. baumannii</i>	35
Obrázok 5: Porovnanie aminokyselinových sekvencií OXA enzýmov	37
Obrázok 6: Porovnanie aminokyselinových sekvencií karbapeném-hydrolyzujúcich OXA enzýmov	38
Obrázok 7: Fylogenetický strom OXA enzýmov	39
Obrázok 8: Predikcia aminokyselín u oxacilináz zodpovedných za rezistenciu ku karbapenémom	40

Zoznam tabuliek

Tabuľka 1: Zoznam bakteriálnych izolátov	20-22
Tabuľka 2: Zloženie reakčnej zmesi na PCR reakciu.....	25
Tabuľka 3: Časové a teplotné podmienky PCR reakcie	25
Tabuľka 4: Sekvencie primerov použitých na detekciu <i>bla_{oxa}</i> génov pomocou PCR...	26-29

1 Úvod

Antibiotiká sa v súčasnosti môžu považovať za jedny z najúspešnejších liekov v histórii samotného ľudstva. Pred začatím „éry antibiotík“ sa nespočetné množstvo ľudí stalo veľmi ľahko zdolateľným cieľom pre patogény spôsobujúce rôzne závažné infekčné ochorenia. Objav antibiotík poskytol lekárom zbraň, ktorou mohli zachrániť životy nepredstaviteľnému množstvu ľudí a predĺžiť tak celkovú životnosť obyvateľstva. Aj napriek obrovskému pokroku v antibiotickej liečbe širokej škály ochorení sú v dnešnej dobe infekcie spôsobené baktériami jednou z najčastejších príčin úmrtia pacientov. Jednoduchým vysvetlením častého zlyhania liečby je alarmujúci a čoraz enormnejší výskyt rezistentných bakteriálnych kmeňov. V poslednom desaťročí spôsobilo práve nadmerné a iracionálne užívanie antibiotických preparátov rozvoj rezistencie do takej miery, že je v súčasnosti považovaná za celosvetový problém medicíny nielen z pohľadu predĺženia, predraženia a obmedzenia možností liečby, ale taktiež smrti pacienta kvôli neexistencii účinnej terapie. Pokiaľ nebudú v humánnej a veterinárnej oblasti prijaté prísne opatrenia voči iracionálnej preskripcii antibiotických prípravkov, môže podľa odhadov dôjsť v priebehu niekoľkých rokov k počiatku postantibiotickej éry, kedy dôjde k absolútnej strate funkčnosti antibiotík a aj dnes triviálne bakteriálne ochorenia sa stanú život ohrozujúcimi.

V súčasnosti sú karbapenémy a polymyxíny považované za jedny z posledných antibiotík, ktoré sú účinné pri liečbe infekcií spôsobených multirezistentnými Gram-negatívnymi baktériami. V dôsledku toho je výskyt karbapenémovej rezistencie u *Enterobacteriaceae* (napr. *Escherichia*, *Klebsiella*) a Gram-negatívnych nefermentujúcich baktérií (napr. *Acinetobacter*, *Pseudomonas*) vážnym a alarmujúcim problémom v zdravotníctve, hlavne kvôli produkcii veľkého spektra karbapenemáz, čo v konečnom dôsledku obmedzuje terapeutické možnosti ľudstva.

Baktérie sú schopné odolávať silným inhibičným účinkom antimikrobiálnych látok rôznymi genetickými a biochemickými mechanizmami, ktoré si vytvorili v priebehu evolúcie. Schopnosť vzájomnej výmeny plazmidov nesúcich gény kódujúce produkciu beta-laktamáz medzi bakteriálnymi populáciami je z terapeutického hľadiska považovaná za najzávažnejší a najobávanejší mechanizmus vedúci k rapídному nárastu rezistencie. Väčší dôraz by sa vo výskumnej sfére mal klásť na beta-laktamázy triedy D (tzv. oxacilinázy). Dôvodov je niekoľko: prvým z nich je každoročný nárast počtu novoobjavených oxacilináz, pričom ich konečný počet sa k dnešnému dňu vyšplhal až na

viac ako 725 rôznych variant s prístupovým číslom do GenBanku uvedeným v BLDB databáze (<http://www.bldb.eu>). Druhým dôvodom je obtiažnosť presnej a včasnej detekcie rezistentných kmeňov produkujúcich oxacilinázy, pretože gény kódujúce produkciu oxacilináz sú exprimované iba v prítomnosti funkčných promótorov reprezentovaných inzerčnými sekvenciami.

Predložená diplomová práca sa zaoberá 1) dizajnovaním primerov slúžiacich na detekciu širokého spektra oxacilináz, 2) detekciou *bla*_{OXA} génov kódujúcich produkciu oxacilináz u vybraných druhov Gram-negatívnych baktérií (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* a *Acinetobacter baumannii*) a 3) *in silico* analýzou oxacilináz.

2 Ciele práce

Cieľom teoretickej časti diplomovej práce bolo s využitím odbornej vedeckej literatúry zhrnúť poznatky týkajúce sa antimikrobiálnej rezistencie u vybraných druhov Gram-negatívnych baktérií – 1) z čeľade *Enterobacteriaceae*, konkrétne *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Enterobacter cloacae*, a 2) *Acinetobacter baumannii*, ako zástupcu Gram-negatívnych nefermentujúcich baktérií. Hlavný dôraz bol však kladený na mechanizmus rezistencie spočívajúci v produkcii enzýmov – oxacilináz (OXA), patriacich do skupiny beta-laktamáz.

Cieľom experimentálnej časti diplomovej práce bolo:

- 1) Analyzovať oxacilinázy v podmienkach *in silico*;
- 2) Navrhnuť s využitím bioinformatického softvéru Geneious špecifické primery slúžiace na detekciu *bla_{OXA}* génov kódujúcich produkciu oxacilináz. Jednotlivé páry oligonukleotidov navrhnuť tak, aby mohli byť použité pri klasickej alebo multiplexnej polymerázovej reťazovej reakcii (PCR) na skríning prítomnosti oxacilináz u rôznych druhov baktérií;
- 3) Detegovať s využitím PCR výskyt *bla_{OXA}* génov u vyššie spomínaných druhov baktérií pochádzajúcich z animálnej a klinickej oblasti.

3 Literárny prehľad

3.1 Patogény a rozvoj infekčného ochorenia

Termínom patogén je možné označovať mikrób, ktorý je schopný vyvolať za určitých okolností ochorenie, ktoré môže spôsobiť poškodenie makroorganizmu, teda hostiteľského organizmu. Patogény sú pomerne diverzifikovanou skupinou zahrňujúcou predovšetkým baktérie a vírusy, ale taktiež mnohé eukaryotické organizmy, ako napríklad prvoky (Votava, 2005; Willey *et al.*, 2014).

Infekčné ochorenie je výsledkom antagonistického vzťahu infekčného agens a jeho hostiteľa. Priebeh, rozsah a finálne dôsledky ochorenia závisia na základných vlastnostiach oboch aktérov. Všetky druhy patogénov musia disponovať rôznymi mechanizmami, ktoré im umožňujú nielen vstúpiť do hostiteľa prekonaním ochranných bariér, ale taktiež odolať pôsobeniu imunitného systému hostiteľa. Patogénne baktérie produkujú špecifické faktory virulencie, ktoré sprostredkujú ich interakciu s hostiteľom. Tieto proteíny pozmeňujú správanie hostiteľských buniek spôsobom, ktorý podporuje replikáciu baktérií a urýchlenie progresu ochorenia. Výsledná interakcia medzi hostiteľom a patogénom môže viesť k úmrtiu hostiteľa alebo eliminácii patogéna imunitným systémom (Alberts *et al.*, 2015).

3.1.1 Čel'ad' *Enterobacteriaceae*

Z taxonomického hľadiska je táto čel'ad' zaradená do triedy *Gammaproteobacteria*, kmeňa *Proteobacteria* a domény *Bacteria*. Čel'ad' zahŕňa 44 rodov, z ktorých najvýznamnejšie sú napríklad *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Salmonella* a *Yersinia* (Willey *et al.*, 2014). Jedná sa o Gram-negatívne fakultatívne anaeróbne, nesporulujúce rovné tyčinky s fermentatívnym typom metabolizmu, nízkou náročnosťou na výživu a vysokou odolnosťou voči rapídny zmenám teploty. Všetky enterobaktérie majú vysokú biochemickú aktivitu, ktorá spočíva v enzymatickej degradácii cukrov za súčasného uvoľňovania veľkého množstva plynu. Ďalšou významnou vlastnosťou väčšiny rodov je schopnosť pohybu pomocou peritrichálnych bičiek (výnimkou sú rody *Klebsiella*, *Shigella* a *Yersinia*, ktoré sú nepohyblivé). Najbežnejším životným prostredím enterobaktérií je črevný trakt človeka a iných stavovcov, s čím súvisí aj ich spôsob života, ktorý sa môže v rámci jednotlivých rodov odlišovať. Niektoré sa môžu vyskytovať v úlohe komenzálov alebo saprofytov, iné naopak v úlohe patogénov

spôsobujúcich vážne zdravotné komplikácie (Borman *et al.*, 1944; Votava *et al.*, 2003; Willey *et al.*, 2014).

Nasledujúce podkapitoly sú venované základnej charakteristike najvýznamnejších zástupcov z čeľade *Enterobacteriaceae*.

3.1.1.1 Charakteristika *Escherichia coli*

Baktéria *E. coli* bola pomenovaná podľa rakúskeho lekára Theodora von Eschericha, ktorý ju v roku 1885 izoloval zo stolice dieťaťa trpiaceho hnačkou (von Escherich, 1885). Kolonizuje gastrointestinálny trakt teplokrvných živočíchov, vrátane človeka, ako prirodzená súčasť fyziologickej črevnej mikroflóry, kde môže pôsobiť ako komenzál, čiastočne saprofyt, symbiont alebo podmienený patogén. Mimo črevný trakt je *E. coli* patogénna takmer vždy, zatiaľ čo v čreve dochádza k patogenéze iba v prípade, že konkrétny kmeň disponuje špecifickými faktormi virulencie. V súčasnosti sa *E. coli* rozdeľuje do niekoľkých patogénnych kmeňov: ETEC (angl. *enterotoxigenic E. coli*), EIEC (angl. *enteroinvasive E. coli*), EPEC (angl. *enteropathogenic E. coli*), EAEC (angl. *enteroaggregative E. coli*), EHEC (angl. *enterohemorrhagic E. coli*), STEC (angl. *Shiga toxin-producing E. coli*), DAEC (angl. *diffusely adhering E. coli*) a UPEC (angl. *uropathogenic E. coli*) (Votava *et al.*, 2003; Willey *et al.*, 2014).

3.1.1.2 Charakteristika *Klebsiella pneumoniae*

Baktéria *Klebsiella* sp. bola izolovaná v roku 1883 berlínskym patológom Carlom Friedländerom. Bakteriálne bunky nedisponujú bičičkami, čo znamená, že na rozdiel od *E. coli* sú nepohyblivé. V porovnaní s niektorými enterobaktériami (napr. *Enterobacter*) je lepšie prispôbena aj na život mimo tráviaceho traktu hostiteľa (Votava *et al.*, 2003). Vyskytuje sa taktiež v odpadových vodách, pitnej vode, povrchových vodách, pôde a vegetácii (Bagley, 1985).

K. pneumoniae je po *E. coli* druhým najbežnejším Gram-negatívnym podmieneným patogénom asociovaným so širokým spektrom infekcií, ako je infekcia močových ciest, pneumónia, intraabdominálna infekcia, meningitída a pyogenický absces pečene (Podschun and Ullmann, 1998). V posledných desaťročiach bol zaznamenaný dramatický nárast rezistentných *K. pneumoniae* produkujúcich beta-laktamázy typu ESBL (širokospektrálne beta-laktámazy), ktoré sú príčinou ich rezistencie k širokému spektru cefalosporínových antibiotík (ATB) (Meyer *et al.*, 1993). V súčasnosti je *K. pneumoniae*

spájaná s častým výskytom invazívnych infekcií, ktoré postihujú pacientov s vysokou komorbiditou. Úmrtnosť spôsobená spomínanou infekciou je dlhodobá a vysoká, a to aj pri nízkej prevalencii producentov ESBL (Vading *et al.*, 2018).

3.1.1.3 Charakteristika *Enterobacter cloacae*

Baktéria *E. cloacae* patrí medzi podmienené patogény kolonizujúce ako suché, tak aj vodné prostredie (voda, kanalizácia, pôda a potraviny). V črevnom trakte človeka a ostatných živočíchov sa vyskytuje ako komenzálna súčasť fyziologickej mikroflóry. Podobne, ako *E. coli* a *K. Pneumoniae*, je *E. cloacae* známym patogénom zodpovedným výhradne za infekcie spojené so zdravotnou starostlivosťou, ako je napríklad infekcia močových ciest, osteomyelitída, cholecystitída a neonatálna meningitída. Jeho schopnosť tvoriť biofilm a vylučovať rôzne cytotoxíny (enterotoxíny, hemolyzíny, toxíny tvoriace póry) je dôležitá pre podmienenie patologického procesu (Davin-Regli and Pages, 2015).

3.1.2 Charakteristika *Acinetobacter baumannii*, ako zástupcu nefermentujúcich Gram-negatívnych baktérií

A. baumannii je nefermentujúca Gram-negatívna baktéria, ktorá spôsobuje rôzne typy infekcií, vrátane pneumónií, bakteriémií, meningitídy a infekcií močových ciest. Hoci je táto baktéria klasicky opísaná ako nozokomiálny patogén u dospelých, je tiež dôležitým patogénom u novorodencov hospitalizovaných na jednotkách intenzívnej starostlivosti (von Dolinger de Brito *et al.*, 2005). Rôzne druhy rodu *Acinetobacter* sa nachádzajú bežne v prírode a sú vysoko odolné voči bežne používaným ATB.

3.2 Beta-laktámové antibiotiká

Beta-laktámové ATB predstavujú heterogénnu skupinu látok, ktoré majú spoločnú charakteristickú štvorčlennú štruktúru, a to tzv. beta-laktámový kruh pozostávajúci z troch atómov uhlíka a jedného atómu dusíka. Prítomnosť beta-laktámového kruhu je nevyhnutná pre ich biologickú aktivitu. Medzi hlavné skupiny beta-laktámových ATB patria penicilíny, cefalosporíny, karbapenémy a monobaktámy. Jednotlivé typy ATB sa od seba líšia zložením štruktúrnych jednotiek pripojených na beta-laktámové jadro (Votava, 2005; Willey *et al.*, 2014). Samostatnú skupinu tvoria inhibítory beta-laktamázy (kyselina klavulanová, sulbaktám, tazobaktám), ktoré majú len veľmi slabý až zanedbateľný antibiotický účinok. V kombinácii s klasickými beta-laktámovými ATB (napr. amoxicilín-

kyselina klavulánová, ampicilín-sulbaktám a pod.) sa ich spektrum účinnosti výrazne zvyšuje (Patrick, 2013; Papp-Wallace and Bonomo, 2016).

Mechanizmus účinku spočíva v inhibícii syntézy bunkovej steny. Všetky baktérie, s minimálnym počtom výnimiek, majú bunkovú stenu spevnenú priečnymi väzbami. Vytvorenie priečných väzieb medzi polymérmi peptidoglykánu (= najdôležitejšia štruktúrna súčasť bunkovej steny) predstavuje posledný krok v procese biosyntézy bunkovej steny. Ide o enzymatickú reakciu katalyzovanú transpeptidázami, ktoré patria do rodiny enzýmov nazývaných PBP (z angl. *Penicillin-Binding Protein*). Penicilíny a ostatné beta-laktámové ATB sú baktericídne činidlá, ktoré disponujú schopnosťou viazať sa na PBPs, ktoré sú ich cieľovým miestom (Lee *et al.*, 2001; Willey *et al.*, 2014; Bush and Bradford, 2016). Schopnosť väzby je daná štruktúrnou podobnosťou beta-laktámového kruhu a terminálneho D-alanyl-D-alanínu, ktorý sa nachádza na peptidovom bočnom reťazci peptidoglykánovej podjednotky (Tipper and Strominger, 1965). Väzba beta-laktámu na PBPs spôsobí ireverzibilnú acyláciu a inhibíciu týchto enzýmov katalyzujúcich transpeptidačnú reakciu tvorby peptidoglykánových priečných väzieb. Tým je syntéza kompletnej bunkovej steny zablokovaná, čo vedie k osmotickej lýze bakteriálnej bunky (Lee *et al.*, 2001; Willey *et al.*, 2014).

V súčasnosti ide o najčastejšie používanú skupinu antimikrobiálnych látok (v USA až 65% všetkých klinicky používaných ATB). Silný baktericídny účinok, nízka toxicita, výhodné farmakokinetické vlastnosti a možnosť obnovenia alebo zvýšenia ich aktivity chemickou manipuláciou sú vnímané ako najväčšie výhody pri ich použití v liečbe širokej škály infekčných ochorení (Bush and Bradford, 2016). Beta-laktámy patria medzi antibiotiká, ktorých účinok je závislý na čase, čo znamená, že účinok je vyšší, čím dlhšie je jeho hladina v plazme nad hodnotou minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC). Väčšina týchto látok sa však veľmi rýchlo vylučuje obličkami, teda polčas eliminácie liečiva nie je zvyčajne dlhší než 3 hodiny. Z toho vyplýva nutnosť neustále udržiavať hladinu ATB v krvi nad hodnotou MIC. Najvhodnejšou stratégiou je v tomto prípade pravidelné podávanie liečiva v kratších intervaloch po celú dobu trvania liečby (väčšinou každých 6 až 8 hodín). Výnimkou je napríklad ceftriaxón, ktorý je dávkovaný každých 24 hodín kvôli dlhšiemu biologickému polčasu (7 až 8 hodín) (McKenzie, 2011).

3.2.1 Penicilíny

Väčšina penicilínov sú deriváty kyseliny 6-aminopenicilánovej, kde je základným štruktúrnym kameňom beta-laktámový kruh konjugovaný s thiazolidinovým kruhom.

Prirodzené penicilíny majú úzke spektrum účinku. Penicilín G (syn. benzylpenicilín) je účinný na Gram-pozitívne streptokoky a stafylokoky rovnako dobre, ako na Gram-negatívne baktérie spôsobujúce kvapavku (*Neisseria gonorrhoeae*) a meningitídu (*Neisseria meningitidis*). Proti baktériám produkujúcich beta-laktamázy nevykazuje žiadny účinok. Penicilín V (syn. fenoxymetylpenicilín) má spektrum účinku veľmi podobné benzylpenicilínu.

Semisyntetické penicilíny (aminopenicilíny, karboxypenicilíny a ureidopenicilíny) majú pomerne široký rozsah účinku. Aminopenicilíny (ampicilín a amoxicilín) sú ATB účinné proti Gram-negatívnym baktériám ako *Haemophilus* (infekcie stredného ucha), *Salmonella* (gastroenteritída) a *Shigella* (úplavica). Ich spektrum účinku je zvýšené pri súčasnej aplikácii s kyselinou klavulánovou. Karboxypenicilíny (karbenicilín a tikarcilín) majú silný účinok na baktérie rodu *Pseudomonas* a *Proteus* (infekcie rán a dýchacích ciest). Ureidopenicilíny (azlocilín, mezlocilín a piperacilín) sú používané v liečbe infekcií spôsobených streptokokmi a baktériami rodu *Haemophilus* a *Pseudomonas*. Pri septických stavoch u pacientov s leukémiou je často používaná kombinácia piperacilínu s tazobaktámom (Wright, 1999; Patrick, 2013; Willey *et al.*, 2014).

3.2.2 Cefalosporíny

Cefalosporíny sú semisyntetické ATB odvodené od cefalosporínu C, ktorý bol získaný z huby *Cephalosporium acremonium*. Štruktúrnym základom cefalosporínových ATB je kyselina 7-aminocefalosporánová. Ide o širokospektrálne baktericídne ATB, ktoré sa rozdeľujú do piatich generácií na základe antimikrobiálneho spektra, rozsahu rezistencie a farmakologických vlastností.

Cefalosporíny prvej generácie (cefalotín, cefaloridín, cefalexín a cefazolín) sú účinné proti Gram-pozitívnym baktériám, predovšetkým streptokokom a stafylokokom. Meticilín rezistentné stafylokoky a penicilín rezistentné pneumokoky sú k týmto antibiotickým preparátom zvyčajne rezistentné. Cefalosporíny druhej generácie (cefuroxím, cefoxitín, cefproxil) majú spektrum účinku rozšírené aj na Gram-negatívne baktérie. Cefalosporíny tretej generácie (cefotaxím, ceftriaxón, ceftazidím, cefoperazón, ceftizoxím) sa vyznačujú vysokou účinnosťou na Gram-negatívne baktérie. Niektoré antibiotické preparáty

(ceftazidím a cefoperazón) pôsobia aj na pseudomonády (napr. *Pseudomonas aeruginosa*) (Sykes *et al.*, 1985; Votava, 2005; Patrick, 2013). Cefalosporíny štvrtej generácie (cefepím) sú účinné na Gram-pozitívne koky, mnohé druhy enterobaktérií a široké spektrum Gram-negatívnych baktérií, vrátane *P. aeruginosa*. Cefalosporíny piatej generácie (ceftarolín, ceftobiprol) vykazujú vysokú účinnosť na enterokoky, meticilín rezistentné kmene *Staphylococcus aureus* (MRSA) a penicilín rezistentné pneumokoky (Goldstein *et al.*, 2006).

3.2.3 Karbapenémy

Zo stoviek známych beta-laktámových ATB majú karbapenémy najširšie antibakteriálne spektrum. Účinkujú na streptokoky, stafylokoky, anaeróby a väčšinu aeróbných Gram-negatívnych nozokomiálnych patogénov, vrátane *P. aeruginosa*. Nie sú účinné na MRSA a vankomycín rezistentné enterokoky.

Karbapenémy sú deriváty thienamycínu, ktorý je produktom pôdneho mikroorganizmu *Streptomyces cattleya* (Lochmann, 1994; Hellinger and Brewer, 1999). Klinicky používanými zástupcami tejto skupiny ATB sú imipeném, meropeném, ertapeném a doripeném. Karbapenémy vykazujú vysoký stupeň odolnosti voči beta-laktamázam (Bush and Bradford, 2016).

3.2.4 Monobaktámy

Jediným komerčne dostupným zástupcom monocyklických beta-laktámov je aztreonam, ktorý bol získaný z baktérie *Chromobacterium violaceum*. Aztreonam sa primárne používa na liečbu infekcií spôsobených aeróbnymi Gram-negatívnymi baktériami (napr. *P. aeruginosa* a *Providencia*). Jeho účinok na Gram-pozitívne baktérie a anaeróby je takmer zanedbateľný. Terapeutické indikácie lieku sú infekcie dolných dýchacích ciest a močového traktu, intraabdominálne, gynekologické a kožné infekcie (Hellinger and Brewer, 1999; Patrick, 2013).

3.3 Bakteriálna antimikrobiálna rezistencia

Antimikrobiálna rezistencia je podľa Svetovej zdravotníckej organizácie (angl. *World Health Organization – WHO*) definovaná ako schopnosť bakteriálnej populácie prežiť účinok inhibičnej koncentrácie konkrétnej skupiny antimikrobiálnych preparátov. Ide o prirodzený biologický jav, ktorý je v 21. storočí považovaný za jeden z najväznejších

problémov verejného zdravia poháňaný nadmerným a iracionálnym užívaním ATB. Časté užívanie tejto skupiny liekov vedie k zvýšeniu selektívneho tlaku v bakteriálnej populácii, čoho výsledkom môže byť rapídne rozšírenie rezistentných kmeňov za súčasnej eliminácie senzitívnych kmeňov. Problematika bakteriálnej rezistencie nabrala na vážnosti hlavne v posledných desaťročiach, v priebehu ktorých došlo k drastickému poklesu vývoja nových antibiotických prípravkov (Kolar *et al.*, 2003; Meek *et al.*, 2015).

Za pôvodom bakteriálnej rezistencie môžu stáť rôzne prirodzené alebo získané mechanizmy. Na základe toho sa definujú dva typy rezistencie. V prvom prípade ide o primárnu (prirodzenú) rezistenciu – geneticky podmienenú necitlivosť alebo zníženú citlivosť bakteriálneho druhu k určitej skupine ATB. Prirodzená odolnosť mikrobiálnych druhov môže vznikáť zmenou alebo neprítomnosťou cieľového miesta pre ATB (napr. modifikácia PBPs), zhoršeným prienikom liečiva do cieľovej bunky, aktívnym vyčerpávaním lieku z bunky pomocou tzv. efluxných púmp alebo produkciou enzýmov inaktivujúcich účinkov ATB (Dudley, 1995; Votava, 2005). Druhým typom je získaná (sekundárna) rezistencia, ktorá predstavuje z terapeutického hľadiska oveľa vážnejší problém. Chromozómové mutácie bunkových génov alebo horizontálny prenos genetickej informácie (HGT) z inej baktérie vďaka plazmidom, bakteriofágom, transpozónom a iným mobilným genetickým elementom môže spôsobiť, že primárne citlivý kmeň mikrobiálneho druhu sa stane rezistentným (Dudley, 1995; Alekshun and Levy, 2007).

3.4 Bakteriálne obranné mechanizmy

Existuje niekoľko rôznych biochemických a genetických mechanizmov, ktoré umožňujú baktériám odolávať silnému účinku antimikrobiálnych látok. Základné mechanizmy sú v krátkosti uvedené a definované v nasledujúcich podkapitolách.

3.4.1 Modifikácia cieľového miesta

Pozmenenie štruktúry cieľového miesta a jeho následné zablokovanie pre väzbu ATB môže byť výsledkom spontánnej mutácie bakteriálneho génu na chromozóme a selekciou v prítomnosti ATB. Vďaka týmto udalostiam získava bakteriálna bunka odolnosť voči antimikrobiálnemu účinku liečiva. Príkladom môže byť rezistencia *Mycobacterium tuberculosis* k rifampicínu, ktorá vzniká mutáciou génu *rpoB* kódujúceho funkčnú podjednotku RNA polymerázy, ktorá je cieľovým miestom pre spomínané ATB. Ďalším spôsobom vzniku rezistencie môže byť horizontálny prenos génu, ktorý kóduje

cieľové miesto. Podmienkou však je, aby malo dané cieľové miesto zníženú afinitu ku konkrétnemu ATB. Príkladom tohto mechanizmu môže byť získanie *van* génov kódujúcich rezistenciu rodu *Enterococcus* na glykopeptidy (Lambert, 2005).

3.4.2 Zhoršený prienik antibiotika do bunky

Gram-negatívne baktérie sú jedinými baktériami, ktoré môžu odolávať účinku ATB mechanizmom zníženej permeability ich vonkajšej membrány. Hydrofóbná vonkajšia membrána disponuje veľkým množstvom transmembránových proteínov, tzv. porínov, ktoré tvoria vodné kanály pre malé hydrofilné molekuly ATB. Vďaka porínom je umožnený ich vstup do bakteriálnej bunky. Zmeny v absolútnom počte funkčných kanálov alebo v ich kvalitatívnej funkcii do značnej miery obmedzujú difúziu ATB do bunky, čím sa bunka stáva odolnou voči účinku antimikrobiálnych látok. Príkladom môže byť rezistencia *P. aeruginosa* na imipeném, ktorá vzniká zníženou permeabilitou membrány v dôsledku deficitu proteínu D2 (OprD) (Nguyen Van and Gutmann, 1994).

3.4.3 Aktívne vyčerpávanie antibiotika z bunky (efflux)

Efluxné pumpy sú transportné proteíny so širokou substrátovou špecifitou vyskytujúce sa u baktérií. Za normálnych okolností sa podieľajú na vylučovaní toxických substrátov (vrátane takmer všetkých ATB) z bunky do vonkajšieho prostredia. V mnohých prípadoch sú gény kódujúce efluxnú pumpu súčasťou operónu s regulačným génom, ktorého funkciou je kontrola expsie daného transportného proteínu. Zvýšená expresia je asociovaná so vznikom rezistencie voči rôznym substrátom. Zvýšená expresia spomínaných proteínov môže byť výsledkom mutácií v lokálnych represorových génoch alebo aktiváciou regulónu, ktorý je pod kontrolou globálnych transkripčných regulátorov (Webber and Piddock, 2003). Príkladom môže byť rezistencia *E. coli* na žlčové soli a široké spektrum ATB podmienená zvýšenou expresiou génu *acrAB* (Thanassi *et al.*, 1997).

3.4.4 Enzymatická inaktivácia antibiotika

Najznámejším príkladom je inaktivácia penicilínových ATB hydrolýzou beta-laktámového kruhu pôsobením penicilináz a ostatných beta-laktamáz (Willey *et al.*, 2014). Detailnejšia charakteristika a klasifikácia beta-laktamáz je uvedená nižšie.

3.4.5 Ostatné obranné mechanizmy

Quorum sensing (QS) je typ chemickej komunikácie používanej medzi spoločenstvami baktérií k monitorovaniu hustoty populácie, synchronizácie ich správania a spoločenských interakcií. Baktérie produkujú malé organické molekuly alebo peptidy vo funkcii „signálov“, ktoré sú schopné vyvolať špecifické „odpovede“ v ostatných bakteriálnych bunkách. QS zároveň zohráva dôležitú úlohu v prenose génov rezistencie z jednej baktérie na ostatné v rámci kolónie (Singh *et al.*, 2013).

3.5 Rezistencia k beta-laktámovým antibiotikám u *Enterobacteriaceae*

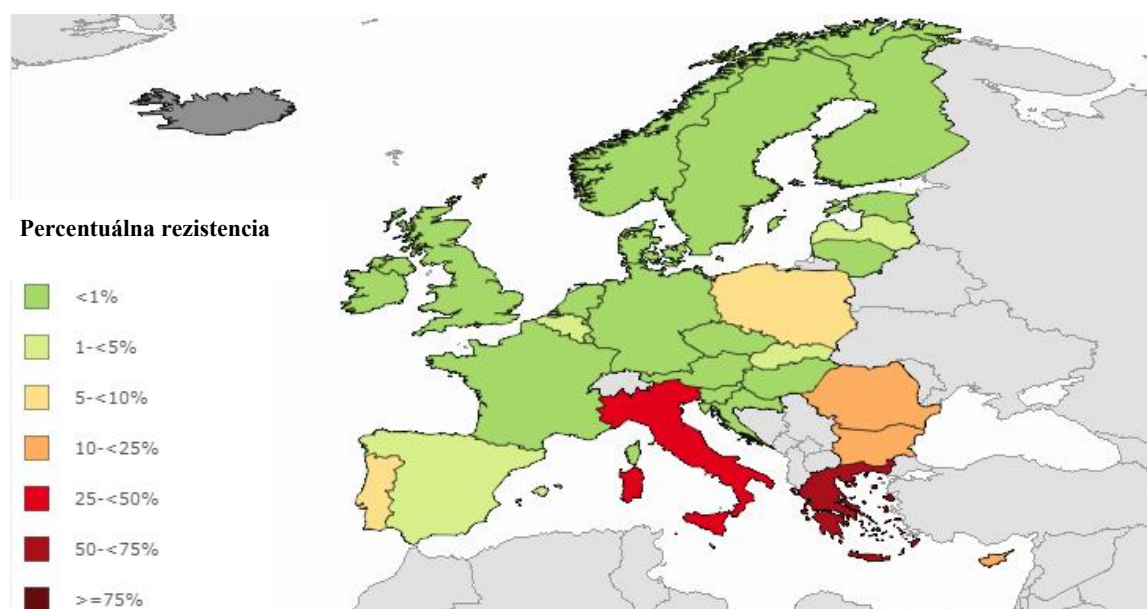
Rezistencia zástupcov z čeľade *Enterobacteriaceae* na ATB, obzvlášť na beta-laktámy, je spôsobená predovšetkým rýchlou a efektívnou mobilizáciou kontinuálne exprimovaných génov kódujúcich beta-laktamázy pomocou plazmidov medzi jednotlivými bakteriálnymi populáciami. Práve bezprecedentné cestovanie a migrácia ľudí prispieva do značnej miery k šíreniu rezistencie medzi kontinentmi neustálym prenosom bakteriálnych plazmidov a klonov (Carattoli *et al.*, 2006; Hawkey and Jones, 2009).

Nedávno sa ukázalo, že niektoré dvojzložkové systémy (TCS) regulujú produkciu beta-laktamáz v rôznych druhoch *Enterobacteriaceae*. Dvojzložkový systém je tvorený senzorm s histidínkinázovou aktivitou a regulátorom odpovede, ktorým je najčastejšie transkripčný faktor. Úlohou senzoru je zachytávať vonkajšie signály, čo vedie k jeho autofosforylácii a následnému prenosu fosforylu do regulátora odpovede, ktorý zvyčajne po ukončení fosforylácie reguluje expresiu génov. Príkladom môže byť enterický patogén *Vibrio parahaemolyticus*, v ktorom bol identifikovaný dvojzložkový systém VbrK/VbrR, ktorý riadi expresiu beta-laktamázy. Mutanty, ktorým chýbal VbrK alebo VbrR, nevytvárali beta-laktamázu, a teda neboli rezistentné na beta-laktámové ATB (Li *et al.*, 2016).

E. cloacae vykazuje prirodzenú rezistenciu voči ampicilínu, amoxicilínu, cefalosporínom prvej generácie a cefoxitínu, ktorá je výsledkom vysokej produkcie beta-laktamáz typu AmpC. Nadmerná produkcia AmpC je spôsobená derepresiou chromozomálneho génu alebo získaním prenosného *ampC* génu z plazmidov alebo iných mobilných elementov (Davin-Regli and Pages, 2015).

Súčasný stav rezistencie bakteriálnych izolátov voči beta-laktámovým ATB je možné zhodnotiť pomocou údajov uvedených v databáze EARS-net (medzinárodná sieť národných systémov surveillance antibiotickej rezistencie invazívnych baktérií na území

Európy). *K. pneumoniae*, ktorá je v súčasnosti považovaná za najčastejšieho patogéna spôsobujúceho infekcie spojené so zdravotnou starostlivosťou, vykazovala v roku 2017 v Českej republike 0,4% rezistenciu ku karbapenémom, pričom na Slovensku dosiahla viac ako 4,4 % (vid' Obrázok 1). Dôležité je podotknúť, že v Českej republike v roku 2016 činila rezistencia voči karbapenémom u *K. pneumoniae* 0 % a na Slovensku iba 2,5 %. V priebehu roka sa výskyt rezistentných izolátov zvýšil (na Slovensku takmer o polovicu), na základe čoho je možné usúdiť, že problematika rezistencie každoročne naberá na vážnosti v celosvetovom meradle, o čom svedčia aj nasledujúce číselné údaje. Situácia rezistencie ku karbapenémom u *K. pneumoniae* je v súčasnosti najkritickejšia v nasledujúcich krajinách: Grécko (64,7%), Taliansko (29,7%) a Rumunsko (22,5%) (vid' Obrázok 1).



Obrázok 1: Rezistencia izolátov *K. pneumoniae* voči karbapenémom v roku 2017 na území Európy (prevzaté a upravené z EARS-net; <https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>)

V prípade *E. coli* činila rezistencia voči karbapenémom v roku 2017 na území Českej a Slovenskej republiky 0 %. V ostatných krajinách boli hodnoty v rozmedzí od 0 % – 1,6 % (dáta čerpané z databázy EARS-net).

3.5.1 Beta-laktamázy

Účinok enzýmov spočíva v interakcii a následnej inaktivácii beta-laktámových ATB hydrolytickým štiepením C-N väzby štvorčlenného beta-laktámového kruhu, čoho

výsledkom sú antimikrobiálne inertné zlúčeniny. Ide o enzýmy výhradne bakteriálneho pôvodu, ktoré sú najbežnejšou príčinou rozvoja rezistencie u klinicky významných Gram-negatívnych baktérií. Gény kódujúce beta-laktamázy môžu byť lokalizované na chromozómoch alebo na mobilných genetických elementoch, najčastejšie plazmidoch (Medeiros, 1997; Majiduddin *et al.*, 2002). Beta-laktamázy fungujú na dvoch princípoch, a to buď využitím katalyticky aktívneho serínového rezídua v aktívnom mieste alebo vyžadujú k ich katalytickej aktivite zinok, najčastejšie vo forme Zn^{2+} (Wang *et al.*, 1999; Majiduddin *et al.*, 2002).

Podľa Bush-Jacoby-Medeirosovej schémy klasifikácie sa beta-laktamázy rozdeľujú do troch skupín (1-3) a ďalších podskupín (a-f) na základe ich substrátovej špecificity a citlivosti k inhibítorom (Bush *et al.*, 1995). V súčasnosti sa používa Amblerova klasifikačná schéma, ktorá rozdeľuje beta-laktamázy do štyroch skupín (A-D) podľa ich aminokyselinovej sekvencie (Ambler, 1980).

3.5.1.1 Beta-laktamázy typu AmpC

Cefalosporinázy, inak nazývané aj AmpC beta-laktamázy, sú podľa Bush-Jacoby-Medeirosovej klasifikačnej schémy zaradené do skupiny 1 a podľa Amblerovej schémy klasifikácie do skupiny C (Ambler, 1980; Bush *et al.*, 1995). Ich hydrolyzačné spektrum zasahuje penicilíny, cefalosporíny (vrátane oxyimino-cefalosporíny), monobaktámy a taktiež cefamycíny. Baktérie produkujúce tento typ enzýmov majú zachovanú citlivosť na karbapenémy a vo väčšine prípadov aj na cefalosporíny štvrtej generácie. Klasické inhibítory beta-laktamáz (kyselina klavulánová, sulbaktám a tazobaktám) s vysokým účinkom na beta-laktamázy typu ESBL majú v prípade tejto skupiny nulový účinok. Vyskytujú sa u väčšiny zástupcov čeľade *Enterobacteriaceae* (predovšetkým *E. coli* a *Enterobacter* spp.), ako chromozomálne kódované enzýmy. Medzi bakteriálnymi populáciami môžu byť gény kódujúce enzýmy prenášané aj pomocou mobilných genetických elementov – plazmidov.

V mnohých *Enterobacteriaceae* je expresia AmpC pomerne nízka, avšak indukovateľná účinkom niektorých beta-laktámových ATB (Hanson, 2003; Poole, 2004). Rezistencia klinických Gram-negatívnych bakteriálnych izolátov, sprostredkovaná nadmernou expresiou AmpC beta-laktamáz, je najčastejšie výsledkom mutácie štruktúrneho génu *ampD*. V dôsledku mutácie dochádza k zvýšeniu MIC beta-laktámových ATB u organizmov s indukibilným génom *ampC* (Schmidtke and Hanson, 2006).

3.5.1.2 *Beta-laktamázy typu ESBL*

Beta-laktamázy typu ESBL sú skupinou plazmidovo-kódovaných, rôznorodých, komplexných a rýchlo sa vyvíjajúcich enzýmov, ktoré v súčasnosti predstavujú hlavnú terapeutickú výzvu v liečbe hospitalizovaných pacientov (Rawat and Nair, 2010). Hlavný problém spočíva v ich schopnosti hydrolyzovať všetky oxyimino-cefalosporíny a monobaktámy. Na α -metoxy-cefalosporíny (cefamycíny) a karbapenémy nemajú žiadny účinok (Giamarellou, 2005). Avšak v niektorých prípadoch môže dôjsť k vzniku rezistencie voči cefamycínom v dôsledku straty porínového proteínu vonkajšej membrány (Pangon *et al.*, 1989). Patria do skupiny 2be podľa Bush-Jacoby-Medeirosovej klasifikačnej schémy a triedy A podľa Amblerovej klasifikačnej schémy (Ambler, 1980; Bush *et al.*, 1995). Hlavnými ESBL-produkujúcimi organizmami sú zástupcovia čeľade *Enterobacteriaceae*, a to predovšetkým *K. pneumoniae* a *E. coli* (Rawat and Nair, 2010). Väčšina ESBL enzýmov vzniklo bodovými mutáciami, konkrétne substitúciami aminokyselín plazmidovo-kódovaných beta-laktamáz skupiny TEM a SHV (Tasli and Bahar, 2005). Najrozšírenejšími skupinami ESBL sú teda TEM, SHV a CTX-M (Jorgensen *et al.*, 2010).

3.5.1.3 *Karbapenemázy*

Karbapenemázy patria medzi rôznorodé širokospektrálne beta-laktamázy, ktoré sa rozdeľujú do dvoch hlavných molekulárnych skupín charakterizovaných na základe mechanizmu hydrolýzy v aktívnom mieste enzýmu. Neskoršie vedecké práce ukázali, že karbapenemázy je možné označovať aj ako tzv. metalo-beta-laktamázy (MBL) kvôli tomu, že obsahujú najmenej jeden atóm zinku v aktívnom mieste, vďaka ktorému sú schopné hydrolyzovať bicyklický beta-laktámový kruh takmer všetkých beta-laktámov (s výnimkou monobaktámov), vrátane karbapenémov (Frere *et al.*, 2005). Postupom času bolo zistené, že karbapeném-hydrolyzujúce beta-laktamázy patria nielen do triedy B/skupiny 3 (metalo-beta-laktamázy - napr. IMP, VIM, NDM, GIM), ale taktiež do triedy A/skupiny 2f (serínové karbapenemázy – napr. KPC, IMI, SME) a triedy D/skupiny 2d (oxacilinázy – napr. OXA-23 a OXA-48) (Ambler, 1980; Bush *et al.*, 1995; Villegas *et al.*, 2007). Gény kódujúce produkciu karbapenemáz môžu byť lokalizované na chromozómoch alebo plazmidoch, čím sa môžu veľmi rýchlo medzidruhovo prenášať (Queenan and Bush, 2007).

3.5.1.4 Oxacilinázy

Beta-laktamázy typu OXA patria do skupiny 2d podľa Bush-Jacoby-Medeirosovej klasifikačnej schémy a triedy D podľa Amblerovej klasifikačnej schémy (Ambler, 1980; Bush *et al.*, 1995). Podobnosť OXA s triedou A a triedou C je definovaná prítomnosťou molekuly serínu v ich aktívnom mieste, zatiaľ čo štruktúra aminokyselín určuje ich odlišnosť (Mossakowska *et al.*, 1989). Všetky beta laktamázy triedy D obsahujú vysoko konzervatívne aminokyselinové motívy – S-T-F-K (pozícia 70-73), (F/Y)-G-N (pozícia 144-146) a K-T-G (pozícia 216-218), ktoré sú pre túto klasifikačnú triedu charakteristické (Docquier *et al.*, 2010).

Beta-laktamázy triedy D boli pôvodne definované ako beta-laktamázy, hydrolyzujúce izoxazyl-penicilíny (oxacilíny, meticilíny) rýchlejšie, než benzylpenicilín (Bush *et al.*, 1995). V súčasnosti sa už táto definícia nepovažuje za adekvátnu, pretože k dnešnému dňu bolo charakterizovaných vyše 725 enzýmov typu OXA (<http://www.bldb.eu/BLDB.php?prot=D#OXA>), ktoré vykazujú značnú diverzitu v profiloch selektivity voči substrátom. Na základe týchto profilov sú rozdelené do troch podrodín: (i) enzýmy s úzkym spektrom hydrolyzy (napr. OXA-1) inaktivujú penicilíny, ako ampicilíny a oxacilíny; (ii) ESBL disponujú schopnosťou hydrolyzovať okrem penicilínov aj cefalosporíny vyšších generácií (napr. OXA-14) a (iii) karbapeném-hydrolyzujúce beta-laktamázy triedy D (CHDL) sú schopné hydrolyzovať všetky typy beta-laktámových ATB s výnimkou aztreonamu (napr. OXA-24/40, OXA-23 a OXA-48) (Naas and Nordmann, 1999; June *et al.*, 2014).

Ďalšou charakteristickou vlastnosťou pre túto skupinu enzýmov je minimálna citlivosť voči inhibičnému účinku kyseliny klavulánovej, tazobaktámu a sulbaktámu. Ich aktivita môže byť úplne inhibovaná *in vitro* pôsobením chloridu sodného (NaCl) už pri koncentrácií 100 mM (Heritier *et al.*, 2003).

Väčšina oxacilinázových génov (*bla*_{OXA}) je súčasťou génových kaziet v integrónoch triedy 1, zatiaľ čo CHDL gény vykazujú vysokú genetickú variabilitu. Napríklad gény *bla*_{OXA-23} sú spájané s transpozónmi (*ISAbal*) alebo kompozitnými transpozónmi (*ISAb4*) (Corvec *et al.*, 2007). Gény *bla*_{OXA-40-like} sú zvyčajne lokalizované na chromozómoch, avšak u *Acinetobacter* spp. a *Pseudomonas* spp. bola zistená ich lokalizácia aj na plazmidoch, čo indukuje možnosť šírenia týchto génov medzi nepríbuznými druhmi Gram-negatívnych baktérií (Lolans *et al.*, 2006; Sevillano *et al.*, 2009). Expresia *bla*_{OXA-58} génov je vo väčšine prípadov regulovaná promótorovými sekvenciami, ktoré sú

poskytované špecifickými inzerčnými sekvenciami (napr. ISAbal, ISAbal2, ISAbal3) (Poirel and Nordmann, 2006).

Inzerčné sekvencie kódujúce transpozázu zohrávajú často veľmi dôležitú úlohu pri mobilizácii a regulácii expresie *bla*_{OXA} génov. Najrozšírenejšou je inzerčná sekvencia ISAbal, ktorá bola v Spojenom kráľovstve detegovaná takmer vo všetkých rozšírených klonoch *A. baumannii*. Je spájaná s veľkým množstvom podrodín OXA enzýmov, ako napríklad OXA-23-like, OXA-51-like a OXA-58-like. ISAbal lokalizovaná „upstream“ od *bla*_{OXA} génov je zodpovedná za ich zvýšenú expresiu až na hladiny, ktoré vedú k zvýšeniu rezistencie voči karbapenémom. Na základe toho je možné tvrdiť, že ISAbal poskytuje účinný promótor *bla*_{OXA-23-like} a *bla*_{OXA-51-like} génom, vďaka ktorému je ich expresia zvýšená až niekoľkonásobne (Turton *et al.*, 2006).

3.5.2 Globálna epidemiológia oxacilináz

Do roku 1998 bol zaznamenaný výskyt beta-laktamáz hydrolyzujúcich karbapenémy u izolátov *Acinetobacter* spp. v celosvetovom meradle (Afzal-Shah and Livermore, 1998). Napríklad OXA-23 bola identifikovaná pri vypuknutí infekcií spojených so zdravotnou starostlivosťou zapríčinených karbapeném-rezistentným *Acinetobacter* v Brazílii (Dalla-Costa *et al.*, 2003), Spojenom kráľovstve (Turton *et al.*, 2005) a Kórei (Jeon *et al.*, 2005). Varianty OXA-24 a OXA-40, ktoré sa líšia dvomi aminokyselinami, boli izolované v klinických izolátoch *Acinetobacter* spp. v Španielsku (Lopez-Otsoa *et al.*, 2002) a Portugalsku (Da Silva *et al.*, 2004). OXA-40 bola taktiež prvá karbapeném-hydrolyzujúca oxacilináza popísaná v Spojenom kráľovstve (Lolans *et al.*, 2006).

Rezistencia *A. baumannii* na karbapenémy spojená s výskytom OXA beta-laktamáz bola v Českej republike prvýkrát zaznamenaná v roku 2008, kedy boli u pacientov hospitalizovaných na jednotkách intenzívnej starostlivosti detegované OXA-58-like a OXA-24-like enzýmy (Nemec *et al.*, 2008). V roku 2011 bol v Českej republike detegovaný multirezistentný kmeň *A. baumannii*, ktorý bol nositeľom génu kódujúceho produkciu OXA-23. Avšak tento kmeň bol izolovaný z pacienta po návrate zo zahraničia (Krizova *et al.*, 2012). O dva roky neskôr bol detegovaný kmeň *A. baumannii* produkujúci OXA-23 u pacienta trvalo pretrvávajúceho na území Českej republiky (Senkyrikova *et al.*, 2013).

V roku 2017 boli v Českej republike identifikované dva druhy z rodu *Acinetobacter*, *Acinetobacter lwoffii* a *Acinetobacter schindleri*, pravdepodobne živočíšneho pôvodu,

ktoré boli pozitívne na OXA-134-like beta-laktamázy. Pomenované boli ako OXA-496 a OXA-537 (Mlynarcik *et al.*, 2018).

Na území Slovenskej republiky bolo v priebehu roka 2015 testovaných 18 kmeňov *Campylobacter* spp. rezistentných voči SAM na prítomnosť enzýmu OXA-61. Vo viac než polovici testovaných kmeňov bol potvrdený výskyt spomínanej varianty oxacilinázy, čo môže súvisieť s tým, že SAM sa veľmi často používa v liečbe detí a tehotných žien (Hanzen *et al.*, 2016).

Epidemiologický výskum v Nemecku viedol k identifikácii nového enzýmu OXA-162, ktorý je považovaný za jednobodovú mutantnú formu OXA-48. Štúdium viedlo k potvrdeniu výskytu karbapeném-rezistentných *Enterobacteriaceae* produkujúcich OXA-162 a OXA-48 u ôsmich pacientov z piatich nemeckých nemocničných zariadení (Pfeifer *et al.*, 2012). Aj napriek tomu, že pred nedávnom bolo odhalené rozšírenie OXA-48 v mnohých stredomorských krajinách a krajinách západnej Európy, Turecko naďalej ostáva hlavným rezervoárom tejto varianty enzýmov (Carrer *et al.*, 2010; Kalpoe *et al.*, 2011). Vzhľadom na vysokú frekvenciu migrácie ľudskej populácie medzi Nemeckom a Tureckom vznikla idea, že niektoré z rezistentných izolátov, ktoré sa v súčasnosti v Nemecku vyskytujú, môžu pochádzať z Turecka (Pfeifer *et al.*, 2012).

4 Materiál a metódy

4.1 Bakteriálne kmene a ich kultivácia

V experimentálnej časti diplomovej práce boli použité vybrané druhy Gram-negatívnych baktérií pochádzajúcich z bakteriálnej zbierky v Ústave mikrobiológie Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Konkrétne bolo použitých 50 bakteriálnych izolátov (23 kmeňov *E. coli*, 25 kmeňov *K. pneumoniae*, 1 izolát *E. cloacae* a 1 izolát *A. baumannii*).

Izoláty *E. coli* boli získané z hydínárskeho prostredia a slepých čriev (lat. *intestinum caecum*) brojlerov na Morave. Vzorky boli nazbierané na farmách a bitúnkoch z domácich kurčiat (*Gallus gallus*). Viac informácií o zbere a spracovaní vzoriek, identifikácii druhov, ako aj ich fenotypovej rezistencii na antibiotiká, je popísaných v práci z roku 2018 (Bardon *et al.*, 2018). Citlivosť enterobaktérií k vybraným antibiotikám bola stanovená použitím mikrodilučnej metódy. V 17 izolátoch boli potvrdené beta-laktamázy s rozšíreným spektrom účinku (z angl. *Extended-spectrum beta-lactamases* – ESBL fenotyp), najčastejšie išlo o CTX-M enzýmy, pričom zvyšných 6 izolátov bolo pozitívnych na beta-laktamázu typu AmpC.

Izoláty *K. pneumoniae* (láskavý dar od Dr. Holého) pochádzali z klinických vzoriek od pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou a akútnou lymfoblastickou leukémiou, ktorí boli hospitalizovaní v Hemato-onkologickej klinike (HOK) Fakultnej nemocnice v Olomouci. Pre viac informácií viď (Zatloukalova *et al.*, 2018). Vyšetrovaný materiál zahŕňal výter z krku, moč, perianálny ster a stolicu. Z celkového počtu vyšetrovaných vzoriek bol ESBL fenotyp potvrdený v 21 prípadoch, z čoho jedna vzorka bola ESBL a AmpC pozitívna. Zvyšné štyri izoláty boli producentami enzýmov s úzkym spektrom účinku (NSBL fenotyp).

Kmeň *E. cloacae* bol izolovaný z moču pacienta hospitalizovaného v HOK a preukázal karbapenemázový fenotyp. Kvantitatívna citlivosť na antibiotiká bola stanovená použitím dilučnej bujónovej mikrometódy. Izolát bol rezistentný na ampicilín (MIC >64 mg/l), cefuroxím (>64 mg/l), kotrimoxazol (>256 mg/l), ofloxacín (>8 mg/l), piperacilín/tazobaktám (16 mg/l), ceftazidím (>16 mg/l), meropeném (>16 mg/l), tigecyklín (4 mg/l), amikacín (16 mg/l), ampicilín/sulbaktám (SAM; 32 mg/l), gentamycín (>32 mg/l), chloramfenikol (>64 mg/l), piperacilín (128 mg/l), cefotaxím (>16 mg/l), cefepím (8 mg/l), ciprofloxacín (>16 mg/l) a tobramycín (>16 mg/l). Citlivosť bola

zaznamenaná len na kolistín (0,5 mg/l) a nitrofurantóin (16 mg/l), ale ten sa podľa EUCAST pre tento bakteriálny druh neinterpretuje. Genotyp preukázal prítomnosť dvoch beta-laktamáz – SHV a IMP.

Izolát *A. baumannii* bol získaný z výteru rany pacienta hospitalizovaného v HOK a tiež preukázal karbapenemázový fenotyp. Stanovenie citlivosti na antibiotiká použitím dilučnej bujónovej mikrometódy potvrdilo rezistenciu na ampicilín (MIC >64 mg/l), cefuroxím (>64 mg/l), kotrimoxazol (>128 mg/l), aztreonam (>16 mg/l), piperacilín/tazobaktám (>128 mg/l), ceftazidím (>32 mg/l), meropeném (>16 mg/l), amikacín (>64 mg/l), SAM (16 mg/l), gentamycín (>32 mg/l), piperacilín (>256 mg/l), cefotaxím (>16 mg/l), cefepím (>16 mg/l), ciprofloxacín (>16 mg/l) a tobramycín (>32 mg/l). Citlivosť bola zaznamenaná len na tigecyklín (0,250 mg/l), kolistín (2 mg/l) a nitrofurantóin (16 mg/l), ale ten sa podľa EUCAST pre tento bakteriálny druh neinterpretuje. Genotyp preukázal prítomnosť dvoch beta-laktamáz – ADC a TEM.

Ako pozitívna kontrola boli použité dva referenčné kmene (OXA-produkujúce izoláty) – (i) OXA-23 (NCTC 13301) produkujúci *A. baumannii* a (ii) OXA-48 pozitívna *K. pneumoniae* (NCTC 13442). Vybrané druhy enterobaktérií boli konzervované na –80°C použitím ITEST Kryobanky B (ITEST plus). Jednotlivé vzorky mikroorganizmov boli naočkované pomocou sterilných jednorazových inokulačných kľučiek (1 µl; Biologix) na povrch krvného agaru (Columbia). Kultivácia baktérií prebiehala v termostate (Incucell; BMT) pri teplote 37°C po dobu 24 hodín.

Tabuľka 1 (prvá časť): Zoznam bakteriálnych izolátov

Bakteriálny druh	Zbierkové číslo	Označenie izolátov	Fenotyp	Genotyp
<i>Escherichia coli</i>	CAM19	1	ESBL	SHV
	CAM431	2	ESBL	SHV, CTX-M
	S314	3	AmpC	CIT-typ
	S337	4	ESBL	TEM, CTX-M
	S338	5	ESBL	CTX-M
	S346	6	ESBL	CTX-M
	S401	7	ESBL	CTX-M
	S409	8	ESBL	CTX-M
	S410	9	ESBL	CTX-M
	S434	10	AmpC	CIT-typ

Tabuľka 1 (druhá časť): Zoznam bakteriálnych izolátov

Bakteriálny druh	Zbierkové číslo	Označenie izolátov	Fenotyp	Genotyp
<i>Escherichia coli</i>	S463	11	ESBL	TEM, CTX-M
	S465	12	ESBL	TEM, CTX-M
	S467	13	ESBL	TEM, CTX-M
	S5049	14	ESBL	CTX-M
	S5075	15	AmpC	CIT-typ
	S5104	16	AmpC	CIT-typ
	S5105	17	AmpC	CIT-typ
	S5107	18	AmpC	CIT-typ
	S5109	19	ESBL	SHV, CTX-M
	S5113	20	ESBL	CTX-M
	S5115	21	ESBL	CTX-M
	S5134	22	ESBL	TEM, SHV
	S5135	23	ESBL	TEM, SHV
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7143	24	NSBL	SHV
	7653	25	NSBL	SHV
	7772	26	ESBL	CTX-M, SHV, TEM
	7774	27	ESBL	CTX-M, SHV, TEM
	7775	28	ESBL	CTX-M, SHV
	7998	29	NSBL	SHV
	8348	30	ESBL	CTX-M, SHV, TEM
	8406	31	ESBL	SHV, TEM
	8507	32	ESBL	CTX-M, SHV, TEM
	8739	33	ESBL	CTX-M, SHV, TEM
	8740	34	ESBL	CTX-M, SHV, TEM
	9006	35	ESBL	CTX-M, SHV, TEM
	9337	36	ESBL	CTX-M, SHV, TEM
	9612	37	ESBL	CTX-M, SHV, TEM
	9802	38	ESBL	CTX-M, SHV, TEM
	9803	39	ESBL	CTX-M, SHV, TEM
	9821	40	ESBL	CTX-M, SHV, TEM
	9824	41	ESBL	CTX-M, SHV, TEM
	10147	42	ESBL	CTX-M, SHV
10356	43	ESBL	CTX-M, SHV, TEM	
10472	44	ESBL	CTX-M, SHV	

Tabuľka 1 (tretia časť): Zoznam bakteriálnych izolátov

Bakteriálny druh	Zbierkové číslo	Označenie izolátov	Fenotyp	Genotyp
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10920	45	NSBL	SHV
	12511	46	ESBL, AmpC	CTX-M, SHV, DHA
	12516	47	ESBL	CTX-M, SHV, TEM
	12634	48	ESBL	CTX-M, SHV
<i>Enterobacter cloacae</i>	15963	49	CARBA	SHV, IMP
<i>Acinetobacter baumannii</i>	11069	50	CARBA	ADC, TEM

NSBL: beta-laktamáza s úzkym spektrom účinku; ESBL: beta-laktamáza s rozšíreným spektrom účinku; CARBA: karbapenemáza; CIT-typ: komplex obsahujúci AmpC enzýmy, ako napríklad CMY-2/-3/-4, LAT-1/-2 a BIL-1

4.2 Chemikálie a roztoky

Použité chemikálie

- Agaróza pre elektroforézu DNA (SERVA, Nemecko; kat. č. 11404.07)
- Destilovaná voda (dH₂O)
- DNA marker molekulovej hmotnosti o veľkosti 200-1500 bp (Top-Bio, ČR; kat. č. D110)
- dNTP mix (10mM; Promega; USA; kat. č. C1141)
- Farbivo SYBR® Safe DNA Gel Stain (400 µl; Invitrogen, USA; kat. č. S33102)
- Nanášací pufo (PCR loading buffer; Top-Bio, ČR; kat. č. P048)
- PCR H₂O (Top-Bio, ČR; kat. č. P242)
- PCR reakčný pufo (10x; PCR Blue Buffer; Top-Bio, ČR; kat. č. T058)
- *Taq* DNA polymeráza (5U/µl; Unis; Top-Bio, ČR; kat. č. T037)

Použité roztoky a ich príprava

- 10x TBE pufo (Tris-Borate-EDTA; pH 8,3; Bio-Rad, USA; kat. č. 1610770)
- 1x TBE pufo (Tris-Borate-EDTA): 70 ml zásobného roztoku 10x TBE pufru zriediť v 630 ml dH₂O
- 70% etanol: 700 ml zásobného roztoku 96% etanolu zriediť v 300 ml dH₂O

Použité súpravy

- ITEST Kryobanka B (ITEST plus s.r.o., kat. č. PP64)
- krvný agar (Columbia): kat. č. 98025 KA (BioVendor)

4.3 Laboratórne vybavenie a softvéry

- Analytické váhy (Boeco)
- Automatické pipety v rozmedzí objemov od 0,5 µl do 1000 µl (Thermo Scientific)
- Centrifuga (Centrifuge EBA 12 R; Hettich)
- Corbett Rotor-Gene 6000 Application Software, verzia 1.7 (Corbett Life Science, Qiagen)
- Elektroforetická komora (EASY-CAST; Owl Scientific)
- Geneious (Biomatters)
- Hlbokomraziaci box (-80°C) (MDF-U53V; Sanyo)
- Inokulačné kľučky (1 µl; gamma sterilized; Biologix)
- Laminárny box (MSC-Advantage; Thermo Fisher Scientific)
- Mikrovlnná rúra (Daewoo)
- Minicentrifuga (Cleaver Scientific)
- Nanodrop (Nanodrop Technologies)
- PCR termocyklér (RotorGene™ 6000; Corbett Research)
- Pipetovací nástavec (Pipetus; Hirschmann)
- Sterilné špičky (0,5–5 µl; 2–20 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl; Biotix)
- Termoblok (Dry-block type 16500; Thermolyne)
- Termostat (37°C) (Incucell; BMT)
- UV transiluminátor (Ultra-Lum, Inc.)
- Vortex (Vortex-Genie 2; Scientific Industries, Inc.)
- Zdroj jednosmerného elektrického napätia (MP-300 V; Major Science)

4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy

4.4.1 Porovnávanie sekvencií OXA

Sekvencie génov kódujúcich oxacilinázy, ktoré boli doteraz popísané (<http://www.bldb.eu/BLDB.php?prot=D#OXA>, naposledy navštívený v marci 2019), boli stiahnuté z databázy GenBank. Porovnanie nukleotidových a aminokyselinových sekvencií

bolo vykonané použitím bioinformatického softvéru Geneious (Biomatters).

4.4.2 Dizajnovanie primerov na polymerázovú reťazovú reakciu

Homologické oblasti pri porovnaní nukleotidových sekvencií poslúžili na dizajnovanie primerov pomocou programu Primer3 (Geneious, Biomatters). Primery boli syntetizované firmou East Port Praha (Česká republika). Sledované izoláty boli testované pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) na prítomnosť *bla_{OXa}* génov. Podrobné špecifikácie použitých primerov sú uvedené v Tabuľke 4. Úroveň expície *bla_{OXa}* génov nebola skúmaná.

4.4.3 Izolácia bakteriálnej DNA a podmienky amplifikácie

Po ukončení kultivácie boli dve až tri bakteriálne kolónie z každej vzorky odobraté sterilnou bakteriologickou kľučkou a dôkladne resuspendované v 100 µl vody. Následne boli inkubované v termobloku (Dry-block type 16500; Thermolyne) pri 95°C po dobu 10 minút. Pre zvýšenie efektívnosti uvoľnenia DNA z bakteriálnych buniek boli všetky vzorky podrobené tzv. teplotnému šoku, ktorého podstatou bola rapidná zmena teploty pôsobiaca na bakteriálne bunky. To znamená, že po inkubácii pri 95°C boli vzorky na 2 minúty prenesené do hlbokomraziaceho boxu (-80°C) (MDF-U53V; Sanyo) a následne opäť prenesené do termobloku, kde boli po dobu 2 minút zahriate na 95°C.

Centrifugáciou (13 000 g; 5 minút) bol získaný supernatant obsahujúci uvoľnenú bakteriálnu DNA, ktorá bola v ďalšom postupe použitá ako templátová DNA pre PCR.

Koncentrácia genomickej DNA bola meraná pomocou spektrofotometru Nanodrop (Nanodrop Technologies).

Reakčné prostredie PCR reakcie (25 µl) zahrňovalo nasledujúce komponenty: reakčný pufor (PCR Blue Buffer) obsahujúci horečnaté ióny, zmes deoxyribonukleotidov (dNTP), primery (forward/reverse) (vid' Tabuľka 4), termostabilnú DNA polymerázu (*Taq* DNA polymeráza Unis), templátovú DNA a vodu pre PCR (vid' Tabuľka 2). Príprava samotnej PCR reakcie prebiehala nasledovne: ako prvé bola pripravená reakčná zmes obsahujúca všetky reagenty nevyhnutné pre priebeh syntetickej reakcie. Celkový objem reakčnej zmesi závisel na počte testovaných vzoriek templátovej DNA. V tabuľke 2 sú uvedené objemy jednotlivých zložiek pre jednu PCR reakciu. Reakčná zmes bola následne rozpipetovaná po 24 µl do pripravených PCR mikroskúmaviek (0,2 ml; uložené v chladenom stojane na skúmavky), do ktorých bola taktiež pridaná templátová bakteriálna

DNA v objeme 1 μ l. Zmes bola dôkladne stočená na minicentrifuge (Clever Scientific) a vložená do termocykléru RotorGeneTM 6000 (Corbett Research) pri vopred nastavenom časovom a teplotnom profile (viď Tabuľka 3), kde prebiehala samotná amplifikačná reakcia. K overeniu správnosti priebehu PCR reakcie bola pri experimentoch použitá pozitívna a negatívna kontrola.

Tabuľka 2: Zloženie reakčnej zmesi na PCR reakciu

PCR reagentie	Objem na jednu reakciu [μ l]
PCR voda (Top-Bio, ČR)	20,4
10x PCR reakčný pufo (750 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C); 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1% Tween 20, 25 mM MgCl ₂ (Top-Bio, ČR)	2,5
dNTP mix (10mM) (Promega, USA)	0,5
Forward primer (50 μ M)	0,2
Reverse primer (50 μ M)	0,2
<i>Taq</i> DNA polymeráza Unis (Top-Bio, ČR)	0,2
Templátová DNA (100 ng)	1

Tabuľka 3: Časové a teplotné podmienky PCR reakcie

Krok reakcie	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
Úvodná denaturácia	94	3 min.	1
Denaturácia	94	30 sek.	30
Nasadnutie primerov	52-56	30 sek.	
Extenzia	72	45-60 sek.	
Finálna extenzia	72	10 min.	1
Chladienie	4		

Tabuľka 4 (prvá časť): Sekvencie primerov použitých na detekciu *bla*_{OXA} génov pomocou PCR

Označenie PCR	Názov primeru	Nukleotidová sekvencia (smer 5' → 3') ^a	Cieľové miesto (podtypy)	Dĺžka (počet báz)	Veľkosť amplikónu (bp)	T _m (°C)	Referencie
<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , sekvenovanie	OXA(3)-F/R	TCTGTTGTTTGGGTTTCGC, TCTATGGTGTTTTCTATGGCTG	OXA-1-like (11)	19/22	245	52	Táto štúdia
<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i>	OXA(18)-F/R	ACGGAAAGCCAAGAGCCAT, CCCACACCAGAAAAACCAGT	OXA-10-like (32)	19/20	358	53	Mlynarcik <i>et al.</i> , 2016
<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>A.</i> <i>baumannii</i>	OXA(19)-F/R	ATTTCAAGCCAAAGGCACGA, GCCACTCAACCCATCCTACC	OXA-2-like (19)	20/20	569	52	Táto štúdia
<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>A.</i> <i>baumannii</i>	OXA(22)-F/R	ACTTGCTATGTGGTTGCTTCTC, ACCTTTTCTCGCCCTTCCAT	OXA-23-like (27)	22/20	310	54	Mlynarcik <i>et al.</i> , 2018
<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>A.</i> <i>baumannii</i>	OXA(31)-F/R	AACGGGCGAACCAAGCATTTT, TGAGCACTTCTTTTGTGATGGCT	OXA-48-like (27)	21/23	597	56	Táto štúdia
<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i>	OXA(33)-F/R	CTACGTGGGAATTGAAGCC, GTTATTGTCCCGAAGCCAG	OXA-9-like (1)	19/19	410	53	Táto štúdia
<i>A. baumannii</i>	OXA(20)-F/R	TGTACCTGCTTCGACCTTCA, TCCCAACCACTTTTTGCGT	OXA-51-like (255)	20/20	436	54	Mlynarcik <i>et al.</i> , 2016
<i>A. baumannii</i>	OXA(23)-F/R	ATRTCCCGCCTCTACCTTT, YATCCCATCCCAACCRCTT	OXA-213-like (38)	20/20	444	52	Táto štúdia
<i>A. baumannii</i>	OXA(32)-F/R	CCTCTCAAATCACTTCAACTCAATCT, GCTGCAAAACTGCGCTTCTT	OXA-134-like (8)	26/20	253	54	Mlynarcik <i>et al.</i> , 2018
<i>A. baumannii</i>	OXA(34)-F/R	CTACGGCAATGACTTGAGCC, CCTGATAAACGGGAACGGCA	OXA-211-like (7)	20/20	209	56	Táto štúdia

Tabuľka 4 (druhá časť): Sekvencie primerov použitých na detekciu *bla_{oxa}* génov pomocou PCR

Označenie PCR	Názov primeru	Nukleotidová sekvencia (smer 5' → 3') ^a	Cieľové miesto (podtypy)	Dĺžka (počet báz)	Veľkosť amplikónu (bp)	T _m (°C)	Referencie
<i>A. baumannii</i>	OXA(35)-F/R	ACGAGCACATACAGAATATGTCCC, CCATTAGATTTTTCTACCCAACCTGT	OXA-143-like (7)	24/26	510	59	Mlynarcik <i>et al.</i> , 2018
<i>A. baumannii</i>	OXA(36)-F/R	GCGTGAAGAAGTGAAGCGTGT, TCAACATCCATTCCCCAACCCAC	OXA-228-like (8)	21/22	243	57	Táto štúdia
<i>A. baumannii</i>	OXA(37)-F/R	TAGACCGAGCAAAAACAGC, CAATTGCCCTTGGGCTAAA	OXA-58-like (7)	19/19	365	52	Táto štúdia
<i>A. baumannii</i>	OXA(38)-F/R	GCAGAAAGAAGTAAAGCGGG, CCAACCAGTCAACCAACCT	OXA-24-like (8)	20/19	271	53	Mlynarcik <i>et al.</i> , 2018
^b PCR	OXA(1)-F/R	CGCCGTTCGTGATGAGTTCC, CACCAGCCAAACCTGCCTTC	OXA-46-like (5)	20/20	402	59	Táto štúdia
	OXA(2)-F/R	TCGTGTGGTATTTCGCAGC, GAGCATCTTGCCGAGGAA	OXA-42-like (4)	18/18	194	52	Táto štúdia
	OXA(4)-F/R	ACTGCGTATATCCCAGCAT, AGCGATCACTTTTCCGTTT	OXA-214-like (4)	19/19	513	52	Táto štúdia
	OXA(5)-F/R	ATTAAGCGAGGGCAAACAG, TGCGACAATTTCTCCTTGT	OXA-213-like (9)	19/19	567	52	Táto štúdia
	OXA(6)-F/R	GCCTCGACCTTCAAGCT, ATSCGCAGCGACGAGWTGA	OXA-114a-like (5) a OXA-243-like (7)	17/19	314	52	Táto štúdia
	OXA(7)-F/R	AGCAATGCTGAAGGAACAT, ACCAACCAATAGGCTCAGT	OXA-63-like (14)	19/19	566	52	Táto štúdia
	OXA(8)-F/R	TCTCCCGCTTCCACTTTTA, TGCTTGTTCTTTAGCGCTT	OXA-61-like (46)	19/19	312	52	Táto štúdia

Tabuľka 4 (tretia časť): Sekvencie primerov použitých na detekciu *bla_{oxa}* génov pomocou PCR

Označenie PCR	Názov primeru	Nukleotidová sekvencia (smer 5' → 3') ^a	Cieľové miesto (podtypy)	Dĺžka (počet báz)	Veľkosť amplikónu (bp)	T _m (°C)	Referencie
^b PCR	OXA(9)-F/R	AACCTATCAGGCCTACGAC, CCGAAATCTGCAGACTGTC	OXA-62-like (3)	19/19	341	53	Táto štúdia
	OXA(10)-F/R	GGCAGGTTTTCAAATGGGA, TGGATTTTCTTGACGGCAA	OXA-5-like (2)	19/19	498	52	Táto štúdia
	OXA(11)-F/R	GACAGCCTGCAGATTTTCG, CTTCAGATCCTTGAGCACG	OXA-156-like (3)	18/19	309	52	Táto štúdia
	OXA(12)-F/R	GATCACCTCGTCGCTGA, CTTGTCGTCCTGGATCAG	OXA-22-like (4) a OXA-60-like (1)	17/18	310	52	Táto štúdia
	OXA(13)-F/R	CAAACCGAGATCGCTTCTT, AATCATCGACTTGCGTTCC	OXA-279-like (3)	19/19	382	52	Táto štúdia
	OXA(14)-F/R	ATGGGATGGYAAAAAGCGG, RCCATTTGGCTGTTCAATC	OXA-286-like (4)	19/19	412	52	Táto štúdia
	OXA(15)-F/R	MTTAGCTGAGGCRATGCAG, YYTTGCCATTTGCTTGCTC	OXA-286-like (4)	19/19	368	52	Táto štúdia
	OXA(16)-F/R	ATGGGATGGACAGAARCGG, ACATCCATKCCCCAWCCACT	OXA-294-like (4)	19/20	363	53	Táto štúdia
	OXA(17)-F/R	GGTGTATAAAGAGTTCGCTTC, CAACATAACCAACATACCAACC	OXA-464-like (3)	22/22	306	54	Táto štúdia
	OXA(21)-F/R	CCCGTTTCATCTCTCCCATCTCA, CTGCGTTTCTTGCCATCCCA	OXA-134-like (2)	23/20	251	60	Táto štúdia
	OXA(24)-F/R	TCGACTCAAGCCATTGCCCA, TCCACATCCATGCCCAACC	OXA-134-like (5)	20/20	566	56	Táto štúdia

Tabuľka 4 (štvrtá časť): Sekvencie primerov použitých na detekciu *bla_{oxa}* génov pomocou PCR

Označenie PCR	Názov primeru	Nukleotidová sekvencia (smer 5' → 3') ^a	Cieľové miesto (podtypy)	Dĺžka (počet báz)	Veľkosť amplikónu (bp)	T _m (°C)	Referencie
^b PCR	OXA(25)-F/R	ATGTCCTCACTGTTAGCGT, GCGGGCAAACCTTTGATAG	OXA-548-like (6)	19/19	426	52	Táto štúdia
	OXA(26)-F/R	GGCCTTGAGCACCATAAG, CCCAACCACTTTTTGCGTA	OXA-51-like (11)	18/19	394	52	Táto štúdia
	OXA(27)-F/R	CGACGAGGTTCTTCCCTAT, GTATCCCGAGAGCCTTGAG	OXA-50-like (7)	19/19	527	53	Táto štúdia
	OXA(28)-F/R	CCTTCGTGCTGATGGAYAT, GCGGCATRTCGATGTTTCAG	OXA-60-like (4)	19/19	600	52	Táto štúdia
	OXA(29)-F/R	GACTACAATACAAGCGGAGT, TCCAACCAAAAAGGTATCGAT	OXA-184-like (14)	20/20	362	52	Táto štúdia
	OXA(30)-F/R	AAACAARCCTTTTCTCCTGCT, ACRAATCCAACAATCCAAGCT	OXA-184-like (18)	21/21	485	52	Táto štúdia
	OXA(39)-F/R	TCCACCTTCAAGATCCCG, GACGAACCAGCCGATCT	OXA-12-like (6)	18/17	510	52	Táto štúdia

^aPre degenerované primery: R = A alebo G; S = G alebo C; Y = C alebo T. ^bNavrhnuté primery, ale netestované.

4.4.4 Elektroforetická separácia produktov amplifikácie

Výsledné PCR produkty boli separované pomocou horizontálnej gélovej elektroforézy v 1% agarózovom géle. Agarózový gél bol pripravený nasledovne: 0,6 g agarózy (SERVA) bolo zahriatím rozpustených v 54 ml destilovanej vody a 6 ml 10x TBE pufru (Bio-Rad). Zmes bola následne ochladená na teplotu približne 50°C. Vizualizácia DNA v agarózovom géle bola umožnená pridaním 5 µl farbiva SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). Pripravený 1% agarózový gél bol naliaty do pripravenej elektroforetickej vane (EASY-CAST; Owl Scientific), kde v priebehu času dochádzalo k jeho fyzikálnemu tuhnutiu.

Agarózový gél bol po stuhnutí preliaty 1x TBE pufrom tak, aby boli elektródy elektroforetickej komory ponorené. Do prvej jamky na géle bolo aplikovaných 5 µl DNA markeru molekulovej hmotnosti o veľkosti 200-1500 bp (Top-Bio). Do ostatných jamiek boli v objeme 10 µl postupne aplikované produkty PCR reakcie. Nielen jednotlivé vzorky, ale aj marker molekulovej hmotnosti bol na gél nanášaný vždy spolu s nanášacím pufrom (2 µl; PCR loading buffer; Top-Bio) obsahujúcim brómfenolovú a xylenovú modrú.

Elektroforetická separácia produktov amplifikácie prebiehala po zapojení elektród do zdroja jednosmerného elektrického napätia (MP-300 V; Major Science) pri 100 V po dobu 60 minút. Po ukončení separácie bol gél vizualizovaný pomocou UV transiluminátora (Ultra-Lum, Inc.) a veľkosti jednotlivých produktov boli určené pomocou DNA markeru molekulovej hmotnosti.

4.4.5 Overenie OXA sekvencie získanej sekvenovaním

V prípade pozitívneho izolátu produkujúceho oxacilinázu bolo vykonané DNA sekvenovanie amplifikovaného PCR produktu. Z osekvenovanej sekvencie boli odstránené oblasti s nízkou kvalitou. Výsledná sekvencia bola porovnaná so všetkými doposiaľ popísanými génmi kódujúcimi oxacilinázy použitím databázy BLAST.

4.4.6 Konštrukcia fylogenetického stromu

Fylogenetický strom bol vytvorený softvérom Geneious (Biomatters) použitím PhyML na základe Le and Gascuel modelu. Celkovo bolo použitých 55 oxacilináz (48 oxacilináz zastupujúcich jednotlivé podskupiny a 7 oxacilináz bez podskupinovej klasifikácie), ktoré sa použili na porovnanie sekvencií a rekonštrukciu fylogenetického stromu. Prístupové čísla jednotlivých (i) členov OXA podskupín zahŕňali HQ170510

(OXA-1, člen podskupiny OXA-1-like), DQ112222 (OXA-2, OXA-2-like), DQ288250 (OXA-10, OXA-10-like), U10251 (OXA-12, OXA-12-like), AY307114 (OXA-20, OXA-20-like), AF064820 (OXA-22, OXA-22-like), AY795964 (OXA-23, OXA-23-like), AF201826 (OXA-25, OXA-24-like), AJ488302 (OXA-42, OXA-42-like), AF317511 (OXA-46, OXA-46-like), LN864820 (OXA-48, OXA-48-like), AY306130 (OXA-50, OXA-50-like), DQ385606 (OXA-51, OXA-51-like), AY343493 (OXA-55, OXA-55-like), AY665723 (OXA-58, OXA-58-like), AF525303 (OXA-60, OXA-60-like), JOUN01000022 (OXA-61, OXA-61-like), AY423074 (OXA-62, OXA-62-like), AY619003 (OXA-63, OXA-63-like), AY227054 (OXA-85, OXA-85-like), CYTX01000006 (OXA-114a, OXA-114a-like), HQ122933 (OXA-134, OXA-134-like), GQ861437 (OXA-143, OXA-143-like), KP771981 (OXA-153, OXA-153-like), KP771982 (OXA-154, OXA-154-like), KP771984 (OXA-156, OXA-156-like), JQ396378 (OXA-184, OXA-184-like), HQ634775 (OXA-198, OXA-198-like), JF268688 (OXA-209, OXA-209-like), JN861779 (OXA-211, OXA-211-like), JN861781 (OXA-213, OXA-213-like), JN861782 (OXA-214, OXA-214-like), JQ422053 (OXA-228, OXA-228-like), AFRQ01000031 (OXA-243, OXA-243-like), HE614014 (OXA-258, OXA-258-like), APPO01000008 (OXA-266, OXA-266-like), APOS01000038 (OXA-274, OXA-274-like), APOM01000058 (OXA-279, OXA-279-like), APRL01000010 (OXA-291, OXA-286-like), APPC01000015 (OXA-294, OXA-294-like), APOH01000009 (OXA-296, OXA-296-like), APQD01000016 (OXA-299, OXA-299-like), KJ746496 (OXA-372, OXA-372-like), KU721146 (OXA-464, OXA-464-like), KU739135 (OXA-493, OXA-493-like), KY682750 (OXA-548, OXA-548-like), CP024011 (OXA-568, OXA-568-like), MH085550 (OXA-576, OXA-576-like), a (ii) OXA sekvencií bez podskupinovej klasifikácie - U85514 (OXA-18), AJ400619 (OXA-29), AJ519683 (OXA-45), KP771985 (OXA-157), APPN01000080 (OXA-308), ACWG01000053 (OXA-347) a KY646155 (OXA-542).

5 Výsledky

Cieľom experimentálnej časti diplomovej práce bolo navrhnúť s využitím bioinformatického softvéru Geneious sadu špecifických primerov schopných s čo najvyššou presnosťou detegovať pomocou PCR výskyt *bla*_{OXA} génov kódujúcich oxacilinázy u vybraných druhov Gram-negatívnych baktérií (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* a *A. baumannii*). Výsledky boli získané a vyhodnotené podľa postupu, detailne popísaného v predchádzajúcej kapitole (viď Materiál a metódy).

5.1 Výskyt OXA-pozitívnych izolátov Gram-negatívnych baktérií v animálnych a klinických vzorkách

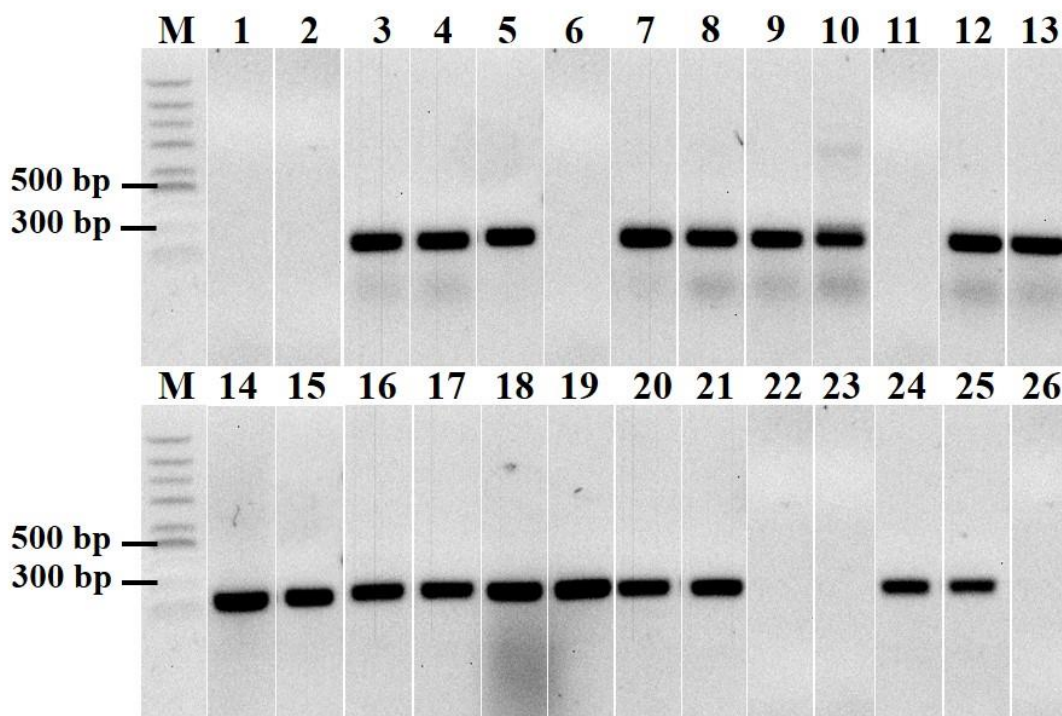
S využitím programu Primer3 (Geneious, Biomatters) bolo na detekciu oxacilináz nadizajnovaných celkovo 39 špecifických párov oligonukleotidov, z čoho 14 párov primerov bolo otestovaných na klinických a animálnych izolátoch použitím PCR. Experimentálne nebolo otestovaných zvyšných 25 párov oligonukleotidov (viď Materiál a metódy - Tabuľka 4).

V konečnom súbte bolo vyšetrených 50 bakteriálnych izolátov (23 kmeňov *E. coli*, 25 kmeňov *K. pneumoniae*, 1 kmeň *E. cloacae* a 1 kmeň *A. baumannii*). Prostredníctvom PCR bolo u enterobaktérií preskúmaných 6 podskupín oxacilináz, konkrétne OXA-1-like, OXA-2-like, OXA-9-like, OXA-10-like, OXA-23-like a OXA-48-like. Izolát *A. baumannii* bol otestovaný na prítomnosť 11 rôznych podskupín oxacilináz, a to OXA-2-like, OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-48-like, OXA-51-like, OXA-58-like, OXA-134-like, OXA-143-like, OXA-211-like, OXA-213-like a OXA-228-like.

Z celkovo šiestich podskupín oxacilináz nebola u enterobaktérií experimentálne potvrdená prítomnosť piatich podskupín oxacilináz, a to konkrétne OXA-2-like, OXA-9-like, OXA-10-like, OXA-23-like a OXA-48-like. K detekcii spomínaných enzýmov boli použité oligonukleotidy (viď Materiál a metódy - Tabuľka 4, prvá časť), v tomto poradí: OXA(19)-F/R, OXA(33)-F/R, OXA(18)-F/R, OXA(22)-F/R a OXA(31)-F/R (výsledky nie sú zobrazené).

PCR reakcia bola negatívna aj na detekciu OXA-1-like enzýmov v prípade testovania izolátov *E. coli*, ktoré pochádzali z animálnej oblasti (výsledky nie sú zobrazené). Naopak, v prípade detekcie *bla*_{OXA-1-like} génu u klinických vzoriek *K. pneumoniae* bolo použitím primerov OXA(3)-F/R (viď Materiál a metódy - Tabuľka 4,

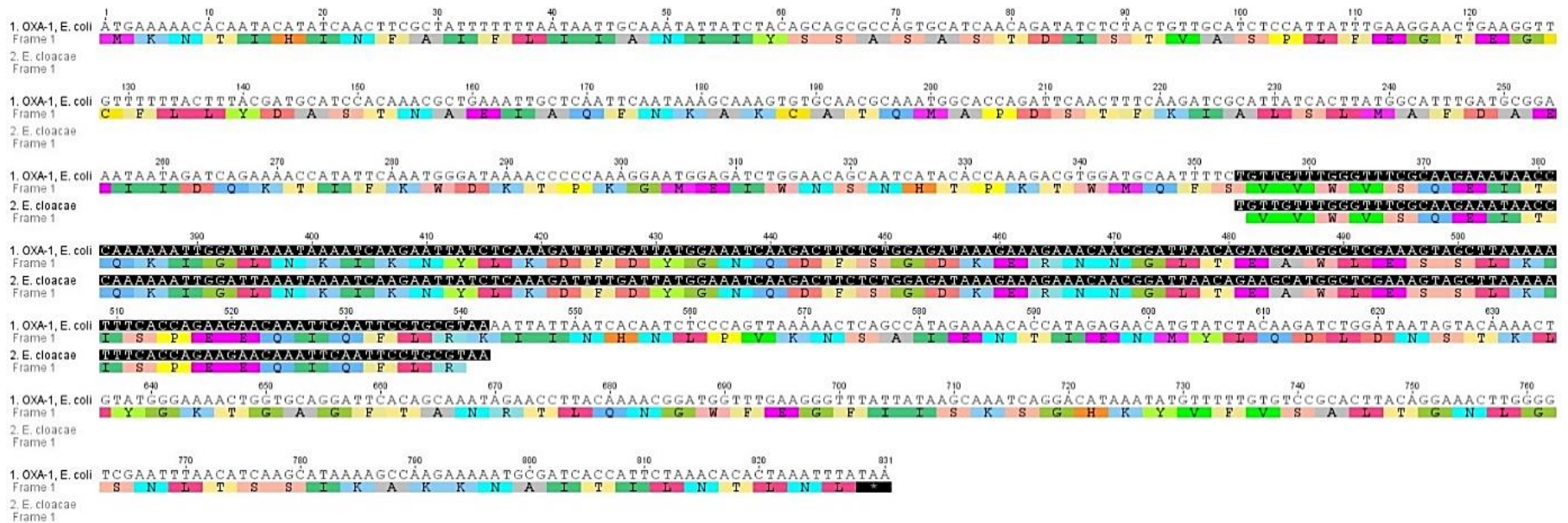
prvá časť) pozitívnych 19 izolátov z celkového počtu 25 kmeňov. Všetky pozitívne klinické izoláty poskytli amplikóny s predpokladanými veľkosťami (245 bp) a potvrdili špecifickosť použitých primerov (viď Obrázok 2). Sekvenovanie získaných amplikónov nebolo doposiaľ vykonané a bude predmetom ďalšieho štúdia.



Obrázok 2: PCR produkty získané amplifikáciou *bla*_{OXA-1-like} génov pomocou primerov OXA(3)-F/R u klinických vzoriek *K. pneumoniae*

Legenda: Dráha 1 až 25 – izoláty *K. pneumoniae* č. 24 až 48 (viď Materiál a metódy – Tabuľka 1, druhá a tretia časť); dráha 26 – negatívna kontrola; M – marker molekulovej hmotnosti (200-1500 bp DNA marker; Top-Bio, ČR; kat. č. D110).

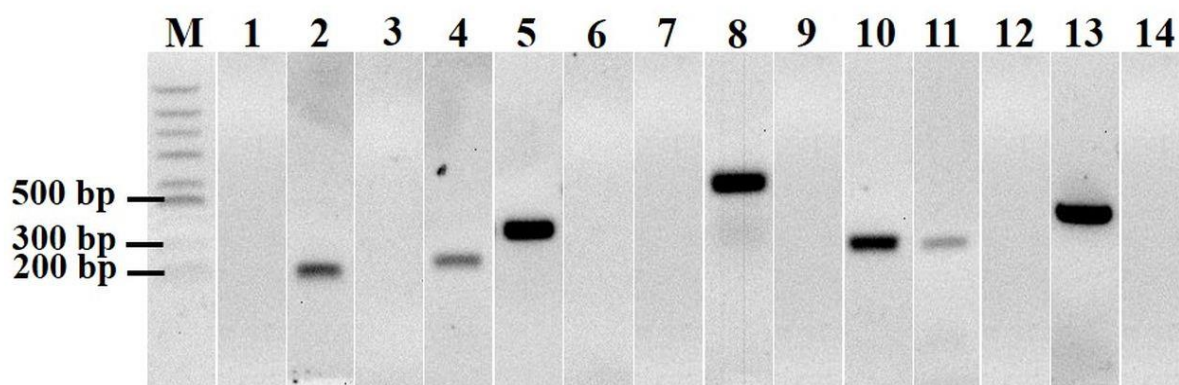
V prípade klinického izolátu *E. cloacae* bola taktiež potvrdená prítomnosť *bla*_{OXA-1-like} génu. PCR produkt preukázal po elektroforetickej separácii a farbení pomocou SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA; kat. č. S33102) požadovanú veľkosť - 245 bp (výsledok nie je zobrazený). Následne bol daný PCR produkt osekvenovaný použitím primerov OXA(3)-F/R. Sekvenčná analýza daného amplikónu potvrdila prítomnosť *bla*_{OXA-1} génu (nukleotidová a aminokyselinová zhoda s enzýmom OXA-1 predstavovala 100% zhodu, viď Obrázok 3). Výsledná osekvenovaná sekvencia mala dĺžku 190 bp.



Obrázok 3: Porovnanie osekvenovanej sekvencie oxacilinázy z klinického izolátu s referenčným *bla*_{OXA-1} génom (Geneious, Biomatters)

Legenda: Čiernou farbou sú označené rovnaké nukleotidy študovanej oxacilinázy pochádzajúcej z klinického kmeňa *E. cloacae* a známeho *bla*_{OXA-1} génu u *E. coli*. Farebnými rámečkmi sú označené prislúchajúce aminokyseliny.

V prípade klinického kmeňa *A. baumannii* bola potvrdená prítomnosť piatich rôznych podskupín oxacilináz, z celkového počtu 11 otestovaných podskupín uvedených vyššie. PCR reakcia bola pozitívna na prítomnosť génov *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-211-like} a *bla*_{OXA-228-like} použitím oligonukleotidov v tomto poradí: OXA(22)-F/R, OXA(20)-F/R, OXA(37)-F/R, OXA(34)-F/R a OXA(36)-F/R (viď Obrázok 4). Rezistentné gény (*bla*_{OXA-23} u *A. baumannii* a *bla*_{OXA-48} u *K. pneumoniae*) u pozitívnych kontrolných kmeňov boli správne určené. To značí, že PCR produkty preukázali po elektroforetickej separácii požadovanú veľkosť - 310 bp (pre OXA-23) a 597 bp (pre OXA-48). Všetky ostatné produkty PCR amplifikácie poskytli amplikóny s predpokladanými veľkosťami a potvrdili špecifickosť použitých primerov (presnosť 100%, viď Obrázok 4). Sekvenovanie PCR produktov nebolo zatiaľ vykonané a bude predmetom ďalšieho štúdia.



Obrázok 4: PCR produkty získané amplifikáciou *bla*_{OXA} génov pomocou špecifických primerov u klinického izolátu *A. baumannii*

Legenda: Dráha 1 – *bla*_{OXA-134-like}; dráha 2 – *bla*_{OXA-211-like}; dráha 3 – *bla*_{OXA-143-like}; dráha 4 – *bla*_{OXA-228-like}; dráha 5 – *bla*_{OXA-58-like}; dráha 6 – *bla*_{OXA-24-like}; dráha 7 – *bla*_{OXA-2-like}; dráha 8 – pozitívna kontrola *bla*_{OXA-48}; dráha 9 – *bla*_{OXA-48-like}; dráha 10 – pozitívna kontrola *bla*_{OXA-23}; dráha 11 – *bla*_{OXA-23-like}; dráha 12 – *bla*_{OXA-213-like}; dráha 13 – *bla*_{OXA-51-like}; dráha 14 – negatívna kontrola. M – marker molekulovej hmotnosti (200-1500 bp DNA marker; Top-Bio, ČR; kat. č. D110).

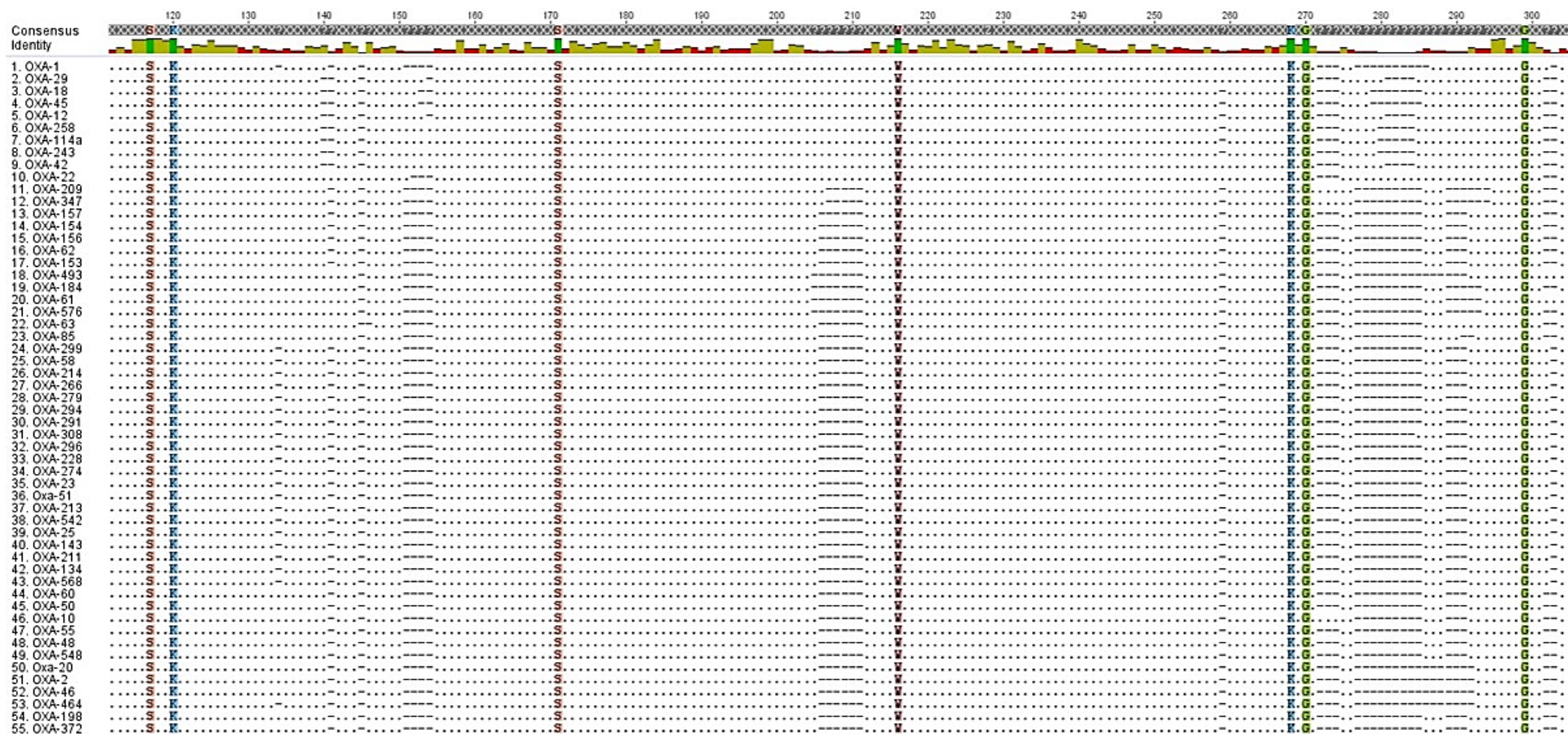
Okrem experimentálne testovaných primerov bolo navrhnutých ďalších 25 párov špecifických oligonukleotidov určených na detekciu OXA-pozitívnych baktérií, ktoré však neboli experimentálne overené prostredníctvom PCR (viď Materiál a metódy - Tabuľka 4; druhá až štvrtá časť). Navrhnuté primery by mohli slúžiť na detekciu ďalších OXA podtypov z 23 OXA podskupín (OXA-5-like, OXA-12-like, OXA-22-like, OXA-42-like, OXA-46-like, OXA-50-like, OXA-51-like, OXA-60-like, OXA-61-like, OXA-62-like, OXA-63-like, OXA-114a-like, OXA-134-like, OXA-156-like, OXA-184-like, OXA-213-

like, OXA-214-like, OXA-243-like, OXA-279-like, OXA-286-like, OXA-294-like, OXA-464-like a OXA-548-like).

5.2 *In silico* analýza oxacilináz

In silico analýza OXA enzýmov bola použitá na detekciu prítomnosti rôznych zachovaných aminokyselín a motívov. V rámci študovaných enzýmov bolo identifikovaných niekoľko zachovaných aminokyselinových zvyškov, ako napríklad serín-x-x-lyzín na pozícii 81-84 (81-SXXX-84; číslovanie podľa OXA-143) a lyzín-x-glycín na pozícii 218-220 (218-KXG-220). Ďalšie príklady vysoko konzervatívnych aminokyselinových zvyškov predstavujú serín na pozícii 128 (S128), tryptofán na pozícii 167 (W167) a glycín na pozícii 234 (G234) (viď Obrázok 5).

Porovnanie aminokyselinových sekvencií sledovaných oxacilináz ukázalo rovnakú (približne 14-87%) sekvenčnú identitu medzi nimi. Napríklad OXA-42 a OXA-134 mali len 14% aminokyselinovú zhodu, zatiaľ čo v prípade OXA-243 a OXA-114a to bola 87% identita (výsledky nie sú ukázané).

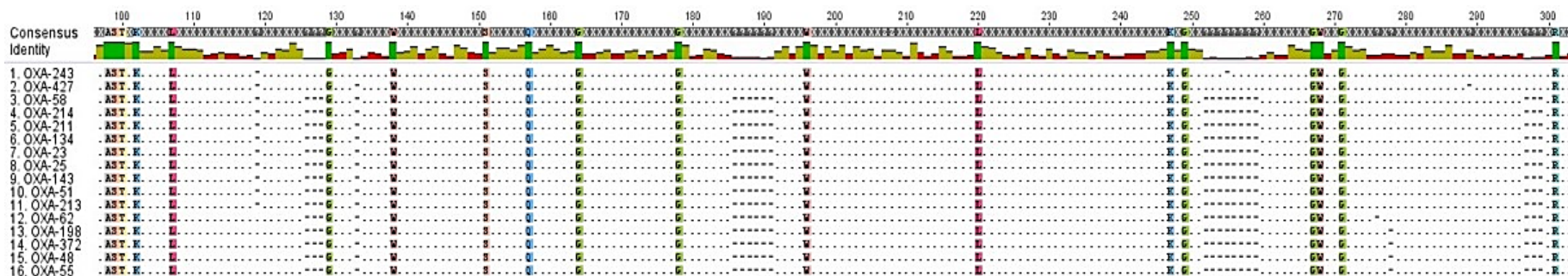


Obrázok 5: Porovnanie aminokyselinových sekvencií OXA enzýmov

Legenda: Porovnanie 55 sekvencií reprezentatívnych zástupcov oxacilináz. Analýza a tvorba obrázku bola vykonaná pomocou Geneious v8.1.9 (Biomatters Ltd., Nový Zéland). Na obrázku sú zvýraznené len identické aminokyselinové zvyšky vo všetkých sekvenciách a na všetkých pozíciách. Zelený rámček v sekcii identita znamená, že aminokyselina v danej pozícii je rovnaká vo všetkých sekvenciách. Bodkami sú zvýraznené rozdielne aminokyseliny pozdĺž jednotlivých sekvencií.

Porovnaním sekvencií 16 karbapeném-hydrolyzujúcich OXA enzýmov boli identifikované individuálne zachované motívy aktívnych miest, vrátane alanín-serín-treonín-x-lyzín na pozícii 80-84 (80-ASTXK-84), leucín na pozícii 89 (L89), glycín na pozícii 107 (G107), tryptofán na pozícii 115 (W115), serín na pozícii 128 (S128), glutamín na pozícii 134 (Q134), glycín na pozícii 141 (G141), glycín na pozícii 155 (G155), tryptofán na pozícii 167 (W167), leucín na pozícii 191 (L191), lyzín-x-glycín na pozícii 218-220 (218-KXG-220), glycín-tryptofán-x-x-glycín na pozícii 230-234 (230-GWXXG-234) a arginín na pozícii 261 (R261) (viď Obrázok 6).

Porovnanie aminokyselinových sekvencií sledovaných karbapeném-hydrolyzujúcich oxacilináz ukázalo rovnakú (približne 17-87%) sekvenčnú identitu medzi nimi. Napríklad OXA-214 a OXA-243 mali 17% aminokyselinovú zhodu, zatiaľ čo v prípade OXA-25 a OXA-143 to bolo 87 % (výsledky nie sú ukázané).

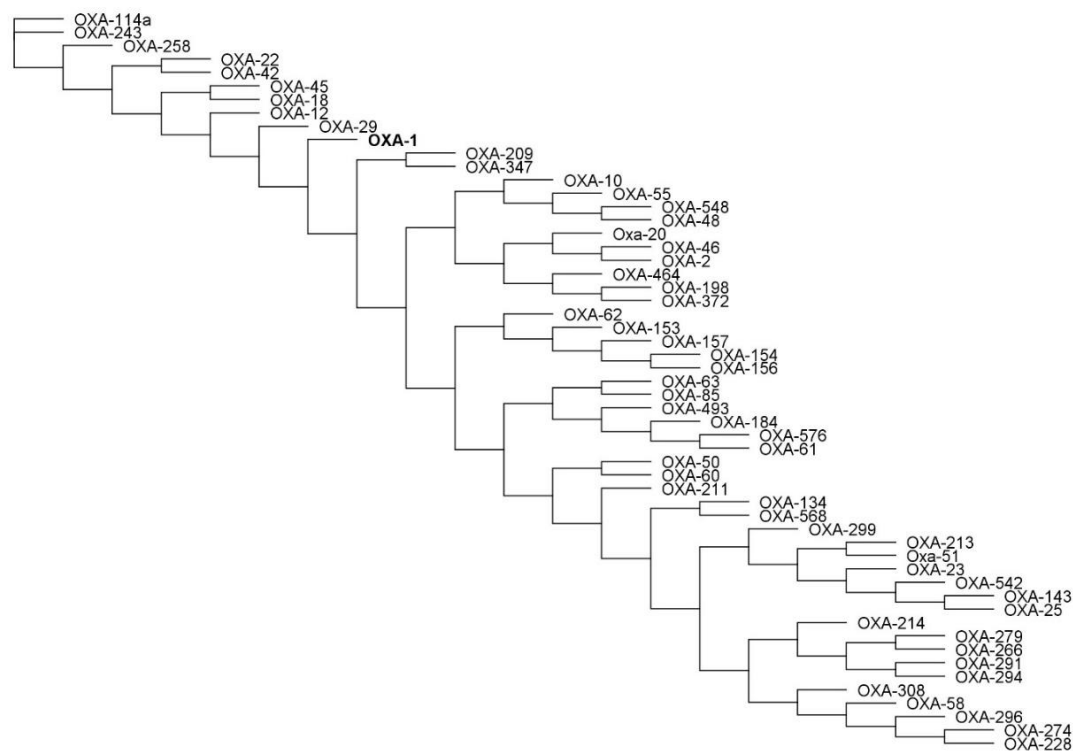


Obrázok 6: Porovnanie aminokyselinových sekvencií karbapeném-hydrolyzujúcich OXA enzýmov

Legenda: Identické aminokyselinové zvyšky pozdĺž všetkých sekvencií sú zvýraznené farebnými rámečkami a na všetkých pozíciách. Zelený obdĺžnik v sekcii identita znamená, že aminokyselina v danej pozícii je rovnaká vo všetkých sekvenciách. Bodkami sú zvýraznené rozdielne aminokyseliny pozdĺž jednotlivých sekvencií.

Fylogenetická rekonštrukcia aminokyselinových sekvencií OXA enzýmov v strome umožnila sledovať príbuznosť jednotlivých enzýmov. Do analýzy bolo zahrnutých 55 typov rôznych oxacilináz, vrátane OXA-1 enzýmu. Koreňové usporiadanie stromu umožnilo rozlíšiť rôzne zoskupenia a identifikovať viacero hlavných skupín a podskupín (viď Obrázok 7).

Porovnanie aminokyselinových sekvencií ukázalo, že napríklad OXA-1 je vzdialene príbuzný s inými oxacilinázami s maximálnou 34% zhodou s OXA-29 a minimálnou 17% zhodou s OXA-154 (výsledky nie sú ukázané).

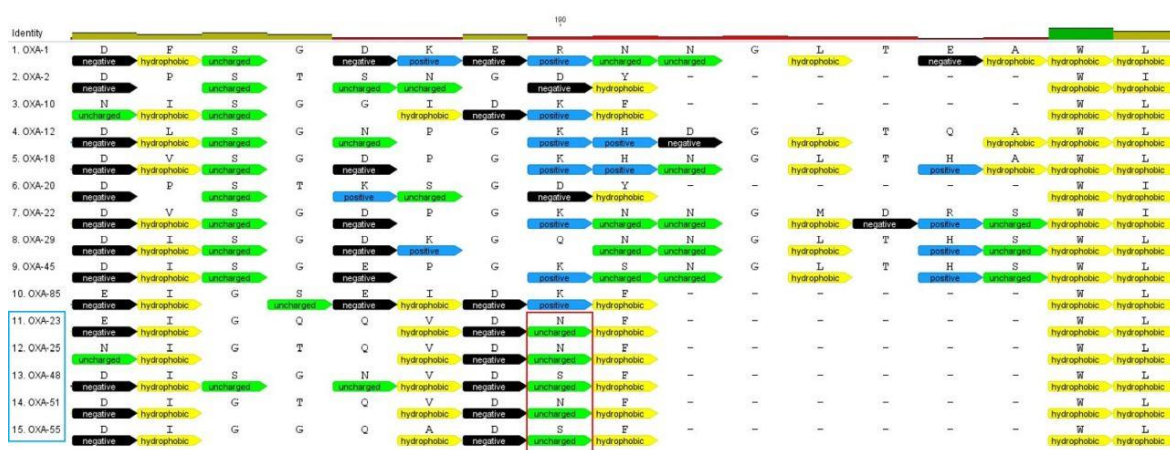


Obrázok 7: Fylogenetický strom OXA enzýmov

Legenda: Dendrogram získaný z 55 oxacilináz použitím Geneious PhyML programu (Geneious Pro 8.1.9). OXA-1 enzým je zvýraznený tučným písmom.

Obrázok 8 ilustruje porovnanie aminokyselinových sekvencií na krátkom úseku (183AA-198AA) u troch skupín oxacilináz (NSBL, ESBL, karbapenemázy). Len v prípade karbapenemáz boli zistené významné aminokyselinové zmeny [zmena aminokyselín za asparagín (Asn, N) alebo serín (Ser, S) na pozícii 190].

Ďalej bol pozorovaný úsek zahrňujúci aminokyseliny v rozmedzí 188-191 (tzv. I/VDN/SF región). Táto oblasť obsahuje štyri aminokyselinové zvyšky (Val188/Ala188 - hydrofóbný; Asp189 - negatívne nabitý; Asn190/Ser190 – nenabitý (neutrálny) a Phe191 - hydrofóbný). Porovnanie hydrofóbných, ako aj nabitých aminokyselín pozdĺž celej sekvencie študovaných sekvencií neukázalo žiadne ďalšie významné aminokyselinové zmeny (výsledok nie je zobrazený).



Obrázok 8: Predikcia aminokyselín u oxacilináz zodpovedných za rezistenciu ku karbapenémom

Legenda: Porovnanie aminokyselinových sekvencií u troch skupín oxacilináz – NSBL (OXA-20/-22/-85/-12/-29), ESBL (OXA-18/-45/-1/-2/-10) a karbapenemázy (OXA-23/-25/-48/-51/-55; modrý rámček). Červený rámček naznačuje predpokladané dôležité aminokyselinové zmeny na asparagín (N) a serín (S) na pozícii 190. Zelenou farbou sú označené nenabité (neutrálne), žltou hydrofóbné, čiernou negatívne nabité a modrou pozitívne nabité aminokyseliny.

6 Diskusia

Rezistentné patogény čeľade *Enterobacteriaceae*, pôvodcovia komunitných infekcií a infekcií spojených so zdravotnou starostlivosťou, predstavujú v súčasnosti čoraz väčšiu výzvu pre nemocničné zariadenia, a to tak v klinickej liečbe pacientov, ako aj pri prevencii proti ich krížovému prenosu. Antimikrobiálna rezistencia sa u týchto baktérií šíri enormnou rýchlosťou a v 21. storočí je považovaná za krízu na globálnej úrovni (Hidron *et al.*, 2008). Dôležité je podotknúť, že neustály nárast prevalencie Gram-negatívnych baktérií rezistentných na beta-laktámové antibiotiká je výsledkom horizontálneho transferu génov kódujúcich rôzne triedy beta-laktamáz (napr. ESBL, karbapenemázy a pod.) (Vaidya, 2011).

Väčšina klinických mikrobiologických laboratórií využíva na stanovenie citlivosti/rezistencie klasické fenotypové metódy, ktoré sú uprednostňované z ekonomického hľadiska a taktiež kvôli jednoduchosti ich praktického prevedenia. Tieto techniky však so sebou prinášajú mnoho obmedzení. Ide predovšetkým o časovú náročnosť a nízku pravdepodobnosť rýchlej a jednoduchej detekcie mnohých beta-laktamáz produkovaných zástupcami čeľade *Enterobacteriaceae*, obzvlášť ESBL a karbapenemáz, a to kvôli variabilným hladinám ich expzie a slabej špecificite niektorých kombinácií inhibítorov (Livermore *et al.*, 2012).

Práve tieto obmedzenia dali podnet na to, aby boli postupom času vyvinuté rôzne genetické metódy, ktorých cieľom bolo zvýšiť presnosť detekcie konkrétneho bakteriálneho obranného mechanizmu a znásobiť rýchlosť analýzy, čo zohrávalo kľúčovú úlohu hlavne u ťažko chorých pacientov. Rýchla detekcia mobilných génov, kódujúcich terapeuticky významné beta-laktamázy, umožňuje zlepšiť nielen surveillance štúdie, ale taktiež opatrenia na kontrolu multirezistentných infekcií, ktoré môžu v konečnom dôsledku prispieť k minimalizácii šírenia rezistentných bakteriálnych kmeňov (Okeke *et al.*, 2011). Celosvetovo najčastejšie používanou molekulovou metódou skríningu prítomnosti beta-laktamázových génov (*bla*) je ich amplifikácia pomocou PCR reakcie. V klinickej praxi je často kvôli vysokým požiadavkám na rýchlosť, cenu a spoľahlivosť identifikácie *bla* génov aplikovaná metóda multiplex PCR. Pri oboch spomínaných technikách je nadizajnovanie špecifických párov oligonukleotidov za prísne definovaných podmienok hlavným kľúčom k úspešnej detekcii génov rezistencie. Jedným z cieľov predloženej diplomovej práce bolo navrhnúť špecifické primery s využitím softvéru Primer3 (Geneious, Biomatters), ktoré by boli schopné zachytávať čo najväčší počet podtypov OXA enzýmov. Prevažná časť

laboratórií v rámci celého sveta taktiež využíva k detekcii *bla* génov primery navrhnuté inými špecializovanými pracoviskami, respektíve si páry špecifických primerov navrhuje sama s využitím širokej škály dostupných softvérov. Ako príklad je možné uviesť štúdium zamerané na sledovanie rozšírenia *bla*_{OXA-48} a *bla*_{OXA-244} medzi bakteriálnymi druhmi *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis* a *Enterobacter* spp. izolovaných z pacientov hospitalizovaných v Moskve (Fursova *et al.*, 2015). Vedeckí pracovníci v Kórei použili pri štúdiu prevalencie OXA-23-produkujúeho *A. baumannii* izolovaného z pacientov hospitalizovaných na rôznych oddeleniach nemocničného zariadenia vlastné oligonukleotidy navrhnuté pomocou softvéru Primer3 (Jeon *et al.*, 2005). Dallenne *et al.* navrhli špecifické primery k skríningu najčastejšie sa vyskytujúcich beta-laktamázových génov kódujúcich OXA-1-like enzýmy, beta-laktamázy typu AmpC, ESBL a karbapenemázy triedy A, B a D v kmeňoch *Enterobacteriaceae* izolovaných z pacientov hospitalizovaných v nemocniciach v Paríži (Dallenne *et al.*, 2010).

Medzi pomerne nové metódy využívané k detekcii génov rezistencie patrí multiplex PCR v reálnom čase, ktorú je možné v prípade potreby kombinovať s analýzou krivky topenia alebo determináciou molekulovej veľkosti amplicónu pomocou gélovej elektroforézy. Swayne *et al.* vyvinuli na detekciu génov kódujúcich päť typov serínových karbapenemáz (OXA-48, GES, KPC, SME a IMI/NMC) veľmi špecifickú a citlivú metódu založenú na dizajnovaní primerov a fluorescenčne značených TaqMan sônd (Swayne *et al.*, 2011). Ďalej boli popísané rôzne multiplex PCR reakcie na detekciu *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{NDM} a *bla*_{KPC} génov (Dallenne *et al.*, 2010; Kaase *et al.*, 2012; Szekely *et al.*, 2013), avšak v mnohých prípadoch mali používané primery nižší detekčný rozsah (mnoho homológov bolo vynechaných). Napríklad kvantitatívna real-time PCR popísaná v publikácii Nijhuis *et al.* bola zameraná na detekciu IMP, OXA-48-like typov (OXA-48/-162/-163/-181/-204/-232/-244/-245/-370) a ďalších karbapenemáz (Nijhuis *et al.*, 2013). Primery uvedené v tejto štúdii umožnili detekciu 33,3% variant IMP (14/42) a neboli schopné odhaliť ďalšie karbapenemázy OXA-23 a OXA-247. Viac informácií je dostupných v (Mlynarcik *et al.*, 2016). Podľa BLDB databázy bolo dodnes popísaných viac ako 725 typov OXA enzýmov. To naznačuje, že špecifickosť mnohých primerov môže byť znížená v dôsledku početných variácií v rámci daného génu rezistencie.

Prednedávnom predstavila spoločnosť BioMérieux (La Balme-les-Grottes) kit Rapidec[®] Carba NP (*carbapenemase Nordmann-Poirel*) určený k detekcii karbapenemáz triedy A, B a D produkovaných bakteriálnymi kolóniami (*Enterobacteriaceae*,

P. aeruginosa a *A. baumannii*) kultivovanými na odporúčaných selektívnych alebo neselektívnych agarových platniach. Test Rapidec® Carba NP je založený na priamom rozpoznaní hydrolýzy karbapenému baktériami produkujúcimi karbapenemázu, čo sa prejaví farebnou zmenou pH indikátora, ktorý je súčasťou kitu. Súprava teda umožňuje veľmi rýchlo odhaliť prenosnú rezistenciu bakteriálnych kmeňov voči karbapenému. Kit má veľmi vysokú hodnotu pre akékoľvek laboratórium v rámci celého sveta, pretože predstavuje ekonomicky efektívne riešenie typu „všetko v jednom“, ktoré poskytuje rýchle výsledky – od 30 minút do 2 hodín. Vďaka vysokej špecifickosti a citlivosti (97,8%) môže dokonca prispieť k lepšej kontrole šírenia infekcií spojených so zdravotnou starostlivosťou. V roku 2015 bola vyhodnotená účinnosť kitu, pričom testované boli kmene celosvetového pôvodu izolované z odlišných klinických vzoriek (Dortet *et al.*, 2015; Poirel and Nordmann, 2015).

V skupine oxacilináz patriacej medzi beta-laktamázy triedy D je možné podľa spektra účinku rozlíšiť NSBL, ESBL a karbapenemázy. OXA enzýmy tvoria rýchlo rastúcu rodinu, ktorá obsahuje >725 enzýmov s prístupovým kódom uvedeným v BLDB databáze. Z hľadiska sekvencie sú oxacilinázy veľmi rôznorodou skupinou enzýmov. Medzi karbapenemázy sa v rámci danej skupiny oxacilináz zaraďujú napríklad zástupcovia nasledujúcich podskupín: OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-48-like, OXA-51-like, OXA-58-like, OXA-134-like, OXA-143-like, OXA-211-like, OXA-213-like, OXA-214-like a OXA-228-like.

Mnoho génov kódujúcich produkciu oxacilináz bolo identifikovaných v rôznych druhoch Gram-negatívnych baktérií ako zdroj získanej rezistencie. Mnohé ďalšie štúdie však ukazujú, že oxacilinázy sa častokrát vyskytujú prirodzene u klinicky relevantných patogénov a environmentálnych druhov. Napríklad boli popísané mnohé chromozomálne kódované a prirodzene sa vyskytujúce oxacilinázy, ako je OXA-12, OXA-22, OXA-29, OXA-42, OXA-50, OXA-54 a OXA-61 u *Aeromonas jandaei*, *Ralstonia pickettii*, *Legionella gormanii*, *Burkholderia pseudomallei*, *P. aeruginosa*, *Shewanella oneidensis* a *Campylobacter jejuni* (pozn. v tomto poradí), hoci ich úloha vo fenotypovej rezistencii je pomerne malá (Poirel *et al.*, 2010). Získané oxacilinázy (napr. OXA-1, OXA-3, OXA-14, OXA-15, OXA-OXA-23 a OXA-48) môžu mať v niektorých prípadoch úzke spektrum alebo rozšírené spektrum hydrolýzy beta-laktámových antibiotík, vrátane karbapenémov (napr. imipeném). Varianty s úzkym spektrom sú schopné vytvárať rezistenciu proti najstaršej generácii penicilínov a cefalosporínov. Avšak varianty s rozšíreným spektrom sú

účinnéjšie proti neskoršej generácii cefalosporínov (napr. cefepímu). Oxacilinázy sú jednými z najrozšírenejších karpapenemáz u *A. baumannii*, pričom OXA-48 je hlavným enzýmom izolovaným na celom svete, vrátane Českej republiky (Hrabak *et al.*, 2015).

Je známe, že miera hydrolýzy samotných karpapenemáz typu OXA je slabá. Bolo však zistené, že gény kódujúce OXA enzýmy tento nedostatok prekonávajú tým, že majú účinné promótoary, ktoré im umožňujú nadmerne sa exprimovať a zvýšiť tým rezistenciu voči karpapenémom (Turton *et al.*, 2016). Preto je v konečnom dôsledku ťažké odhadnúť ich vplyv na výslednú antibiotickú rezistenciu.

Za posledné desaťročie sú čoraz častejšie popisované narastajúce obavy z prenosu ESBL- a karpapenemázy-produkujúcich baktérií u zvierat určených na výrobu potravín (hovädzí dobytok, ošípané, kone a kurčatá) v mnohých krajinách Európy a Ázie (Poirel *et al.*, 2012; Smet *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). Boli charakterizované rôzne kmene *Enterobacteriaceae* produkujúce ESBL (napr. CTX-M, SHV, TEM) v surovom kravskom mlieku, hydine, zvieratách zoologických záhrad a klinických izolátoch (Hrabak *et al.*, 2009; Kolar *et al.*, 2010; Dobiasova *et al.*, 2013; Skockova *et al.*, 2015). Prítomnosť rezistentných génov u baktérií kolonizujúcich zvieratá určené na produkciu potravín môže predstavovať vysoké riziko pre ľudské zdravie v dôsledku ich konzumácie. Kvôli tomu musí byť posudzovaná nielen úloha zdravých hospodárskych zvierat, ako potenciálneho rezervoáru na šírenie baktérií rezistentných na antibiotiká, ale taktiež musí byť zohľadňovaný ich vplyv na potravinový reťazec.

V rámci diplomovej práce boli všetky vyšetované izoláty enterobaktérií (*E. coli*, *K. pneumoniae* a *E. cloacae*) a *A. baumannii* so známou fenotypovou rezistenciou podrobené skríningu na prítomnosť vybraných *bla*_{OXA} génov, pretože v súčasnosti je problematika oxacilináz študovaná relatívne málo.

Na základe BLDB databázy bolo zistené, že najčastejšie sa u enterobaktérií (*Aeromonas*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia*) nachádzajú OXA enzýmy podskupiny OXA-1-like, OXA-2-like, OXA-5-like, OXA-9-like, OXA-10-like, OXA-12-like, OXA-23-like, OXA-48-like a OXA-372-like. Zo všetkých spomínaných podskupín nebola súčasťou diplomovej práce detekcia troch konkrétnych podskupín, a to OXA-5-like, OXA-12-like a OXA-372-like, nakoľko tieto podskupiny oxacilináz sú najčastejšie popisované u rodov *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Morganella* a *Salmonella*.

PCR reakcie vykonané použitím rôznych kombinácií primerov (viď Tabuľka 4, prvá časť) nepotvrdili u animálnych izolátov *E. coli* prítomnosť žiadnych vyšetovaných bla_{OXA} génov ($bla_{OXA-1-like}$, $bla_{OXA-2-like}$, $bla_{OXA-9-like}$, $bla_{OXA-10-like}$, $bla_{OXA-23-like}$, $bla_{OXA-48-like}$ a $bla_{OXA-372-like}$). Naopak, u klinických izolátov enterobaktérií a jediného zástupcu Gram-negatívnych nefermentujúcich baktérií, *A. baumannii*, bola potvrdená prítomnosť rôznych bla_{OXA} génov. Konkrétne u 19 kmeňov *K. pneumoniae*, pričom všetky boli producentami NSBL alebo ESBL, bola potvrdená prítomnosť $bla_{OXA-1-like}$ génov (viď Obrázok 2). Určenie presného typu OXA enzýmu bude predmetom ďalšieho štúdia. Výsledky PCR reakcií ďalej potvrdili, že klinický izolát *E. cloacae* bol pozitívny na $bla_{OXA-1-like}$ gén, pričom sekvenovanie ukázalo, že sa jedná konkrétne o gén bla_{OXA-1} . V tomto prípade bol osekvenovaný 190 bp úsek v rámci kódujúcej sekvencie (viď Obrázok 3) a na sekvenovanie bol použitý primer OXA(3)-F/R (viď Tabuľka 4, prvá časť). Osekvenovaná sekvencia enzýmu nezahŕňala oblasť pred Start kodónom, a preto nebolo možné určiť prítomnosť inzerčnej sekvencie, ktorá poskytuje silnú promótorovú sekvenciu.

Získané výsledky sú v zhode s ostatnými štúdiami, ktoré taktiež popisujú výskyt oxacilináz spoločne s ďalšími ESBL. Pfeifer *et al.* popísali u vybraných druhov enterobaktérií prítomnosť rôznych beta-laktamáz – (i) TEM-1, SHV-11, CTX-M-15 a OXA-9 boli prítomné v izolátoch *K. pneumoniae* obsahujúcich OXA-48, (ii) TEM-1 a OXA-1 boli detegované v *E. coli* nesúcej súčasne i OXA-162 a OXA-48, (iii) SHV-5 bol stanovený v *Citrobacter freundii*, ktorý bol súčasne nositeľom OXA-162 a (iv) TEM-1 a CTX-M-15 boli prítomné v *E. cloacae*, ktorý obsahoval aj OXA-48 (Pfeifer *et al.*, 2012). Okrem toho boli detekované izoláty *E. coli* a *K. pneumoniae* produkujúce CTX-M-2 a CTX-M-92 a izolát *K. pneumoniae* produkujúci CTX-M-3, z ktorých každý obsahoval aj beta-laktamázu typu OXA-2 (Seputiene *et al.*, 2010). V tejto súvislosti bolo nedávno ukázané, že enzýmy OXA-2 a OXA-10 sú v skutočnosti karbapeném hydrolyzujúce beta-laktamázy zo skupiny D (Antunes *et al.*, 2014). Tieto zistenia sú v nesúlade s klasifikáciou enzýmov OXA-2 a OXA-10 ako ESBL (viď BLDB databáza) a naznačujú, že aj iné enzýmy skupiny D, ktoré sa v súčasnosti považujú za nekarbapenemázy, môžu byť v skutočnosti karbapenemázami.

V diplomovej práci bol na detekciu OXA-1-like enzýmov použitý primer OXA(3)-F/R (viď Tabuľka 4, prvá časť). Použitý primer bol špecifický na detekciu 11 podtypov oxacilináz (OXA-1, OXA-4, OXA-30, OXA-31, OXA-33, OXA-47, OXA-224, OXA-320, OXA-392, OXA-534 a OXA-675). Sledované enzýmy sú na základe

údajov uvedených v BLDB databáze popísané u rôznych enterobaktérií (napr. *Escherichia*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Klebsiella*) a Gram-negatívnych nefermentujúcich baktérií (napr. *Pseudomonas*). Ďalší primer OXA(18)-F/R bol použitý na sledovanie prítomnosti OXA-10-like enzýmov. Primer bol určený na detekciu všetkých 31 podtypov oxacilináz patriacich do podskupiny OXA-10-like, ktoré sú na základe BLDB databázy popísané u nasledujúcich rodov – *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Delftia*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* a *Pseudomonas*. Okrem toho bol daný primer schopný rozpoznať aj OXA-436 popísaný u *C. freundii* patriaci do podskupiny OXA-48-like. Primer OXA(19)-F/R bol navrhnutý na detekciu prítomnosti OXA-2-like enzýmov. Jeho špecificita spočívala v detekcii 19 podtypov oxacilináz, pričom primer nebol schopný rozlíšiť z danej podskupiny dva podtypy oxacilináz (OXA-53 a OXA-732 popísané u rodu *Salmonella* a *Pseudomonas*, v tomto poradí). Na ich detekciu bude potrebné navrhnuť nové páry oligonukleotidov. OXA-2-like enzýmy sú podľa údajov v BDLDB databáze charakteristické pre rody *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella* a *Stenotrophomonas*. Na detekciu enzýmov podskupiny OXA-23-like bol použitý primer OXA(22)-F/R, ktorý bol schopný rozlíšiť prítomnosť 27 podtypov *bla*_{OXA-23-like} génov. Na základe BLDB databázy a odbornej literatúry (Osterblad *et al.*, 2016) sú sledované enzýmy zaznamenané u rodov *Acinetobacter*, *Proteus* a *Klebsiella*. Primer OXA(31)-F/R bol navrhnutý na detekciu OXA-48-like enzýmov. V BLDB databáze a odbornej literatúre (Mathlouthi *et al.*, 2015) je popísaných 30 podtypov daných enzýmov, ktoré sa vyskytujú u nasledujúcich rodov *Citrobacter*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Shewanella* a *Acinetobacter*. Nami navrhnutý primer bol schopný z daného počtu zachytiť 27 podtypov, pričom nedetegoval enzýmy OXA-54 a OXA-535 popísané u rodu *Shewanella*. Na ich detekciu bude potrebné navrhnuť nové páry oligonukleotidov. Zvyšná oxacilináza, OXA-436, patriaca do sledovanej podskupiny môže byť detegovaná použitím primeru OXA(18)-F/R, ako je uvedené vyššie. Enzým OXA-9-like popísaný u rodu *Klebsiella* (vid' BLDB databáza) bol detegovaný použitím primeru OXA(33)-F/R, ktorý bol špecifický na detekciu jediného enzýmu (OXA-9) patriaceho do danej podskupiny.

Výsledky PCR reakcií vykonaných u *A. baumannii* potvrdili prítomnosť piatich *bla*_{OXA} génov - *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-211-like} a *bla*_{OXA-228-like} (vid' Obrázok 4). Presný typ oxacilináz bude zistený po osekvenovaní PCR produktov, ktoré bude predmetom ďalšieho štúdia.

Na základe BLDB databázy a odbornej literatúry bolo zistené, že v rámci rodu *Acinetobacter* bolo popísaných 22 podskupín oxacilináz (OXA-2-like, OXA-20-like, OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-48-like, OXA-51-like, OXA-58-like, OXA-134-like, OXA-143-like, OXA-211-like, OXA-213-like, OXA-214-like, OXA-228-like, OXA-266-like, OXA-274-like, OXA-279-like, OXA-286-like, OXA-294-like, OXA-296-like, OXA-299-like, OXA-568-like a OXA-664-like), pričom ďalšie 4 enzýmy (OXA-308, OXA-542, OXA-679 a OXA-730) nemali uvedenú podskupinovú klasifikáciu (Mathlouthi *et al.*, 2015). V prípade *A. Baumannii*, ako zástupcu Gram-negatívnych nefermentujúcich baktérií, bola analyzovaná prítomnosť 11 rôznych podskupín oxacilináz, konkrétne OXA-2-like, OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-48-like, OXA-51-like, OXA-58-like, OXA-134-like, OXA-143-like, OXA-211-like, OXA-213-like a OXA-228-like. Špecifita primerov určených na detekciu podskupín OXA-2-like, OXA-23-like a OXA-48-like je popísaná vyššie. Čo sa týka ďalších primerov, tak oligonukleotid OXA(38)-F/R bol určený na detekciu OXA-24-like enzýmov. Na základe BLDB databázy je známych 8 podtypov daných enzýmov (OXA-24 až OXA-26, OXA-72, OXA-139, OXA-160, OXA-207 a OXA-437), ktoré boli popísané u rodu *Acinetobacter*, pričom nami navrhnutý primer bol schopný zachytiť všetky podtypy. Primer OXA(20)-F/R bol zameraný na detekciu 255 podtypov *bla*_{OXA-51-like} génov u rodu *Acinetobacter*. V BLDB databáze bolo doposiaľ popísaných spolu 273 podtypov OXA-51-like enzýmov, pričom všetky boli popísané u rodu *Acinetobacter*. Ďalších 11 špecifických OXA-51-like podtypov (OXA-263, OXA-343, OXA-379, OXA-425, OXA-525, OXA-527, OXA-530, OXA-554, OXA-692, OXA-759, OXA-767) by mohlo byť otestovaných použitím OXA(26)-F/R primerov (vid' Tabuľka 4, štvrtá časť). Zvyšných 7 podtypov *bla*_{OXA-51-like} génov (OXA-104, OXA-693, OXA-699, OXA-704, OXA-707, OXA-708 a OXA-746), ktoré nie sú detegovateľné použitím primerov OXA(20)-F/R a OXA(26)-F/R, by mohlo byť overených použitím novo dizajnových primerov. Na potvrdenie prítomnosti *bla*_{OXA-58-like} génov bol použitý primer OXA(37)-F/R, ktorý slúžil na detekciu všetkých 7 rôznych podtypov (*bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-96}, *bla*_{OXA-97}, *bla*_{OXA-164}, *bla*_{OXA-397}, *bla*_{OXA-420} a *bla*_{OXA-512}), ktoré boli uvedené v databáze. Oligonukleotid OXA(32)-F/R bol použitý na detekciu *bla*_{OXA-134-like} génov. V BLDB databáze je popísaných 18 podtypov OXA-134-like enzýmov, pričom nami navrhnutý primer bol schopný zachytiť 8 podtypov (OXA-235 až OXA-237, OXA-276 až OXA-278, OXA-360 a OXA-537). Na detekciu ďalších 7 OXA podtypov by mohol byť použitý primer OXA(24)-F/R špecifický pre enzýmy OXA-282, OXA-284,

OXA-361 až OXA-363 a primer OXA(21)-F/R špecifický pre enzýmy OXA-134 a OXA-335. Na tri zostávajúce OXA-134-like enzýmy (OXA-283, OXA-285 a OXA-496) neboli doposiaľ navrhnuté špecifické primery. Primer OXA(35)-F/R bol využitý pri detekcii *bla*_{OXA-143-like} génov. V BLDB databáze je uvedených 7 podtypov OXA-143-like enzýmov (OXA-143, OXA-182, OXA-231, OXA-253, OXA-255, OXA-499 a OXA-649), pričom nami navrhnutý primer bol schopný zachytiť všetky spomínané podtypy. Na potvrdenie prítomnosti *bla*_{OXA-211-like} (doposiaľ bolo popísaných 11 podtypov) génov bol použitý primer OXA(34)-F/R, ktorého špecificita spočívala v detekcii 7 *bla*_{OXA} génov (*bla*_{OXA-211}, *bla*_{OXA-212}, *bla*_{OXA-281}, *bla*_{OXA-309}, *bla*_{OXA-333}, *bla*_{OXA-334} a *bla*_{OXA-662}). Z danej podskupiny oxacilináz nebol navrhnutý primer schopný detegovať 4 ďalšie *bla*_{OXA} podtypy (*bla*_{OXA-280}, *bla*_{OXA-373}, *bla*_{OXA-651} a *bla*_{OXA-652}). V tomto prípade bude nevyhnuté navrhnuť nový primer na detekciu spomínaných *bla*_{OXA-211-like} génov. Detekcia *bla*_{OXA-213-like} génov spočívala v použití primerov OXA(23)-F/R. Daný primer bol určený na potvrdenie prítomnosti 38 podtypov OXA enzýmov (celkovo bolo popísaných 47 podtypov), pričom na detekciu ďalších OXA-213-like enzýmov (OXA-213, OXA-267, OXA-349, OXA-350, OXA-357 a OXA-359) by mohol byť použitý primer OXA(5)-F/R. Na zvyšné tri *bla*_{OXA-213-like} gény (*bla*_{OXA-269}, *bla*_{OXA-270} a *bla*_{OXA-678}) bude potrebné navrhnuť nové špecifické primery. Oligonukleotid OXA(36)-F/R bol zameraný na detekciu *bla*_{OXA-228-like} génov. Navrhnutý primer bol schopný rozlíšiť 8 podtypov *bla*_{OXA} génov uvedených v BLDB databáze (*bla*_{OXA-228} až *bla*_{OXA-230}, *bla*_{OXA-257}, *bla*_{OXA-300}, *bla*_{OXA-301}, *bla*_{OXA-355} a *bla*_{OXA-356}), avšak nebol schopný rozpoznať *bla*_{OXA-418} gén, a preto bude potrebné na jeho detekciu navrhnuť nový primer.

V predkladanej štúdií bola časť izolátov (40%) stanovená ako pozitívna na výskyt *bla*_{OXA-1-like} enzýmov. Okrem toho bolo zistené, že jeden izolát (2%) nesie 5 rôznych *bla*_{OXA} génov (*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-211-like} a *bla*_{OXA-228-like}). Niekoľko ďalších štúdií ukazuje, že gén *bla*_{OXA-23-like} u *A. baumannii* bol preukázaný u 31 % až 100 % izolátov na celom svete, zatiaľ čo gén *bla*_{OXA-58-like} bol zistený v 2 % až 84,92 % kmeňov v rôznych častiach sveta (Shoja *et al.*, 2017).

V marci 2019 bolo v BLDB databáze popísaných 725 podtypov oxacilináz, ktoré mali uvedený prístupový kód. Sady primerov z prvej a druhej časti Tabuľky 4 (dokopy 14 párov oligonukleotidov) môžu byť použité na detekciu 456 podtypov oxacilináz popísaných u rodov *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Delftia*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shewanella*,

Shigella a *Stenotrophomonas*. Na detekciu ďalších OXA podtypov môžu byť použité primery uvedené v druhej až štvrtej časti Tabuľky 4 (dokopy 25 párov oligonukleotidov), ktoré neboli experimentálne otestované prostredníctvom PCR. Táto skupina primerov je schopná špecificky rozpoznať ďalších 199 podtypov oxacilináz popísaných u rodov *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Achromobacter*, *Acrobacter*, *Brachyspira*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Pandoraea*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Salmonella* a *Shewanella*. Navrhnuté oligonukleotidy by mohli byť použité na detekciu rôznych podtypov jednotlivých OXA podskupín uvedených v BLDB databáze (napr. OXA-46-like, OXA-42-like, OXA-213-like, OXA-214-like a ďalšie). Kvôli obmedzenému rozsahu diplomovej práce nebolo možné uviesť všetky možné podtypy oxacilináz, ktoré by mohli zvyšné navrhnuté primery zachytávať (viď Tabuľka 4, druhá až štvrtá časť).

Ďalším cieľom diplomovej práce bolo porovnanie aminokyselinovej sekvencie oxacilináz za účelom objasnenia zachovaných aminokyselín a motívov (úsekov) u všetkých doposiaľ popísaných zástupcov, nakoľko v prípade týchto enzýmov je pozorovaný výrazný každoročný prírastok nových podtypov. V mnohých vedeckých prácach bola popísaná prítomnosť rôznych zachovaných motívov (Toleman *et al.*, 2003; Higgins *et al.*, 2013). V rámci tejto štúdie bolo zistených len niekoľko zachovaných motívov, ako sú napríklad SXXK a KXG (81-84, 218-220; číslovanie podľa OXA-143). Ďalšie príklady vysoko konzervatívnych aminokyselinových zvyškov predstavujú S128, W167 a G234 (viď Obrázok 5). Menšie množstvo zachovaných aminokyselín v tomto prípade súviselo predovšetkým s použitím širokej škály oxacilináz. Konkrétne išlo o porovnanie všetkých reprezentatívnych zástupcov OXA podskupín, pričom do analýzy boli zahrnuté aj oxacilinázy bez podskupinovej klasifikácie. Naopak, porovnaním sekvencií 16 karbapeném-hydrolyzujúcich OXA-podtypov beta-laktamáz triedy D boli odhalené individuálne zachované motívy aktívnych miest, vrátane 80-ASTXK-84, 89-L, 107-G, 115-W, 128-S, 134-Q, 141-G, 155-G, 167-W, 191-L, 218-KXG-220, 230-GWXXG-234 a 261-R (viď Obrázok 6). Mnohé z týchto zistení sú v súlade s inými štúdiami (Toleman *et al.*, 2003; Higgins *et al.*, 2013).

Oxacilinázy sa niekedy ťažko klasifikujú do určitej podskupiny na základe sekvenčných a iných vlastností v dôsledku toho, že sú značne variabilné. Bol vytvorený fylogenetický strom (viď Obrázok 7) znázorňujúci podobnosť OXA podtypov beta-laktamáz, ktorých sekvencie boli získané z BLDB databázy. Do analýzy boli zahrnutí reprezentatívni zástupcovia oxacilináz. Je zrejmé, že existuje široká rozmanitosť medzi

génmi kódujúcimi oxacilinázy. Porovnaním aminokyselinových sekvencií študovaných enzýmov bolo zistené, že ich percentuálna zhoda vykazovala občasne veľmi nízke hodnoty (približne 15 %). Tieto skutočnosti naznačujú, že analyzované gény nemajú spoločnú evolučnú históriu aj napriek tomu, že vykazovali podobnú enzymatickú aktivitu proti rovnakej triede antibiotík s viac alebo menej rovnakou účinnosťou. Za zmienku stojí taktiež spomenúť, že niektoré beta-laktamázy boli špecificky popísané vždy len u konkrétneho druhu, zatiaľ čo niektoré ďalšie enzýmy sú často popisované u viacerých druhov. Príkladom toho je napríklad výskyt karbapenemázy OXA-25, ktorá bola vždy špecificky prítomná len u *A. baumannii*. Na druhej strane karbapenemáza OXA-372 bola popísaná u *C. freundii* a *Morganella morganii*. To zdôrazňuje špecifické rozšírenie niektorých génov beta-laktamáz len medzi niektorými druhmi, a taktiež medzidruhovou disperziu týchto génov u Gram-negatívnych baktérií. Preto nie je možné navrhnúť univerzálne molekulárne nástroje na detekciu všetkých génov kódujúcich beta-laktamázy.

Ďalej bolo popísané, že na proteín-ligand interakciách sa podieľajú hydrofóbne interakcie, vodíkové väzby a elektrostatické interakcie (Nussinov and Schreiber, 2009). Okrem toho bolo zistené, že na toto prepojenie majú vplyv hydrofóbne, arginínové a fosforylované aminokyselinové zvyšky (Lo Conte *et al.*, 1999; Karve and Cheema, 2011). Porovnanie aminokyselinových zmien v GES beta-laktamázach ukázalo, že substitúcia aminokyselín v GES-2 a GES-4 (glycín na asparagín a na serín na pozícii 170) v porovnaní so sekvenciou GES-1 (ESBL) má za následok zvýšenie hydrolytickej aktivity proti imipenému (Poirel *et al.*, 2001; Wachino *et al.*, 2004). Na základe uvedených skutočností bol porovnaním aminokyselinových zmien u zvolených troch skupín oxacilináz (NSBL, ESBL a karbapenemázy) definovaný záver, že aminokyselinové zmeny [zmena aminokyselín za asparagín (Asn, N), alebo serín (Ser, S) na pozícii 190] by mohli byť zodpovedné za rezistenciu ku karbapenémom. V tomto prípade išlo o zmenu negatívne alebo pozitívne nabitých aminokyselín (Arg, R; Asp, D; Lys, K) za neutrálne aminokyseliny (Asn, N a Ser, S). U OXA-29 sa na pozícii 190 tiež nachádzala neutrálna aminokyselina glutamín (Gln, Q), avšak v tomto prípade nebol pozorovaný zachovaný motív (hydrofóbna-negatívna-neutrálna-hydrofóbna aminokyselina), a preto je možné predpokladať, že celý úsek v rozmedzí 188-191 (tzv. I/VDN/SF región) je rozhodujúci pri karbapenemázovej aktivite (viď Obrázok 8). Žiadne ďalšie významné aminokyselinové zmeny alebo motívy neboli pozorované pozdĺž zvyšnej aminokyselinovej sekvencie študovaných oxacilináz.

7 Záver

Narastajúca karbapenémová rezistencia u baktérií predstavuje skutočný klinický problém zapríčinený produkciou karbapenemáz, ktorá sa nedá ľahko odvodit' z profilov antimikrobiálnej rezistencie, a tak šírenie týchto enzýmov medzi nozokomiálnymi patogénmi (napr. *Enterobacteriaceae*) je hrozbou pre verejné zdravie a musí byť dôkladne sledované použitím rôznych fenotypových a genotypových testov. Okrem toho oneskorená detekcia multirezistentných baktérií vedie k dlhším hospitalizáciám a zvýšeným nákladom na zdravotnú starostlivosť.

V experimentálnej časti diplomovej práce bol metódou PCR amplifikácie detegovaný výskyt génov kódujúcich produkciu oxacilináz (*bla_{OXA}*) u vybraných druhov enterobaktérií a Gram-negatívnych nefermentujúcich baktérií pochádzajúcich z bakteriálnej zbierky v Ústave mikrobiológie Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Konkrétne išlo o súbor 50 bakteriálnych izolátov získaných z klinických vzoriek pacientov hospitalizovaných v Hemato-onkologickej klinike Fakultnej nemocnice v Olomouci a animálnych vzoriek pochádzajúcich z bitúnkov a kuracích fariem na Morave.

Detekcia spomínaných génov rezistencie bola umožnená použitím špecifických párov primerov navrhnutých podľa prísne definovaných kritérií a s využitím bioinformatického softvéru Geneious. V rámci predkladanej diplomovej práce bolo navrhnutých 39 párov oligonukleotidov (viď Materiál a metódy – Tabuľka 4), z čoho 14 párov bolo experimentálne otestovaných na dostupných izolátoch.

Kombinácia párov primerov prezentovaných v diplomovej práci môže pokryť vedecké štúdium a detekciu väčšiny známych oxacilináz, ktoré sa nachádzajú u rôznych druhov baktérií. Vďaka tomu môže monitorovanie a minimalizácia šírenia baktérií prispieť ku kontrole prenosu týchto mikroorganizmov. Spoločne boli navrhnuté primery schopné detegovať 655 typov oxacilináz, čo predstavuje 90,3% z celkového počtu popísaných oxacilináz v BLDB databáze. Detegované boli podskupiny ako napríklad OXA-10-like, OXA-23-like, OXA-48-like a ďalšie. Na zostávajúcich 70 podtypov oxacilináz (napr. OXA-153 až OXA-155 u rodu *Pandoraea*; OXA-616 až -618, OXA-622, OXA-624 a OXA-634 u *C. jejuni*; OXA-651 a OXA-652 u *Acinetobacter johnsonii*) popísaných u rodov *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Fusobacterium*, *Legionella*, *Morganella*, *Pandoraea*, *Pseudomonas*, *Riemerella*, *Salmonella* a *Shewanella* bude potrebné navrhnuť nové špecifické primery. Z daných skutočností vyplýva, že

in silico a *in vitro* otestované primery by mohli byť použité pri klasickej alebo multiplexnej PCR na skríning prítomnosti oxacilináz u rôznych baktérií, ako aj na monitorovanie ich výskytu a šírenia, nakoľko včasná detekcia prítomnosti génov spôsobujúcich rezistenciu baktérií na dostupné beta-laktámové antibiotiká je hlavným kľúčom k úspešnej liečbe bakteriálnych infekcií.

Zo získaných výsledkov experimentálnej časti diplomovej práce vyplývajú nasledujúce závery:

- 1. Pomocou PCR s použitím sady navrhnutých primerov bola potvrdená prítomnosť OXA-produkujúcich bakteriálnych izolátov:**
 - a) V prípade klinických izolátov *K. pneumoniae* bola potvrdená prítomnosť *bla*_{OXA-1-like} génov, zatiaľ čo v prípade *E. cloacae* to bol konkrétne *bla*_{OXA-1} gén patriaci do podrodiny OXA-1-like;
 - b) Klinický izolát *A. baumannii* bol pozitívny na prítomnosť piatich *bla*_{OXA} génov - *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-211-like} a *bla*_{OXA-228-like};
 - c) V prípade animálnych izolátov nebola zistená prítomnosť žiadnej oxacilinázy.
- 2. Ziskom pozitívnych výsledkov (vid' bod 1.) bola potvrdená špecifickosť navrhnutých párov oligonukleotidov.**
- 3. *In silico* analýza OXA sekvencií potvrdila výskyt zachovaných aminokyselín a motívov charakteristických pre túto triedu beta-laktamáz.**

8 Literatúra

- Afzal-Shah M, Livermore DM;** 1998. Worldwide emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 41: 576-7.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P;** 2015. Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition. *Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition*. 1-1342.
- Alekshun MN, Levy SB;** 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 128: 1037-50.
- Ambler RP;** 1980. The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*. 289: 321-31.
- Antunes NT, Lamoureaux TL, Toth M, Stewart NK, Frase H, Vakulenko SB;** 2014. Class D beta-lactamases: Are they all carbapenemases? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58: 2119-25.
- Bagley ST;** 1985. Habitat association of *Klebsiella* species. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 6: 52-8.
- Bardon J, Mlynarcik P, Prochazkova P, Roderova M, Mezerova K, Kolar M;** 2018. Occurrence of bacteria with a dangerous extent of antibiotic resistance in poultry in the Central Region of Moravia. *Acta Veterinaria Brno*. 87: 165-72.
- Borman EK, Stuart CA, Wheeler KM;** 1944. Taxonomy of the family *Enterobacteriaceae*. *Journal of Bacteriology*. 48: 351-67.
- Bush K, Bradford PA;** 2016. Beta-lactams and beta-lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 6.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA;** 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular-structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39: 1211-33.
- Carattoli A, Miriagou V, Bertini A, Loli A, Colion C, Villa L, Whichard JM, Rossolini GM;** 2006. Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer beta-lactams. *Emerging Infectious Diseases*. 12: 1145-8.
- Carrer A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, Matar G, Honderlick P, Nordmann P;** 2010. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54: 1369-73.
- Corvec S, Poirel L, Naas T, Drugeon H, Nordmann P;** 2007. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene bla(OXA-23) in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51: 1530-3.
- Da Silva GJ, Quinteira S, Bertolo E, Sousa JC, Gallego L, Duarte A, Peixe L, Grp PRS;** 2004. Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54: 255-8.
- Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Bragagnolo KL, Rea-Neto A, Pentead-Filho SR, Livermore DM, Woodford N;** 2003. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 3403-6.

- Dallenne C, Da Costa A, Decre D, Favier C, Arlet G;** 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 65: 490-5.
- Davin-Regli A, Pages JM;** 2015. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*. 6.
- Dobiasova H, Dolejska M, Jamborova I, Brhelova E, Blazkova L, Papousek I, Kozlova M, Klimes J, Cizek A, Literak I;** 2013. Extended spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among *Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic. *FEMS Microbiology Ecology*. 85: 604-11.
- Docquier JD, Benvenuti M, Calderone V, Giuliani F, Kapetis D, De Luca F, Rossolini GM, Mangani S;** 2010. Crystal structure of the narrow-spectrum OXA-46 class D beta-lactamase: relationship between active-site lysine carbamylation and inhibition by polycarboxylates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54: 2167-74.
- Dortet L, Agathine A, Naas T, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P;** 2015. Evaluation of the RAPIDEC (R) CARBA NP, the Rapid CARB Screen (R) and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 70: 3014-22.
- Dudley M;** 1995. Bacterial resistance mechanisms to beta-lactam antibiotics: assessment of management strategies. *Pharmacotherapy*. 15: 9S-14S.
- Frere JM, Galleni M, Bush K, Dideberg O;** 2005. Is it necessary to change the classification of beta-lactamases? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 55: 1051-3.
- Fursova NK, Astashkin EI, Knyazeva AI, Kartsev NN, Leonova ES, Ershova ON, Alexandrova IA, Kurdyumova NV, Sazikina SY, Volozhantsev NV, Svetoch EA, Dyatlov IA;** 2015. The spread of *bla*(OXA-48) and *bla*(OXA-244) carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 14.
- Giamarellou H;** 2005. Multidrug resistance in gram-negative bacteria that produce extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). *Clinical Microbiology and Infection*. 11: 1-16.
- Goldstein EJC, Citron DM, Merriam CV, Warren YA, Tyrrell KL, Fernandez HT;** 2006. In vitro activity of ceftobiprole against aerobic and anaerobic strains isolated from diabetic foot infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50: 3959-62.
- Hanson ND;** 2003. AmpC beta-lactamases: what do we need to know for the future? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52: 2-4.
- Hanzen J, Chokova J, Kmet V;** 2016. Antimicrobial resistance and molecular characterisation of human campylobacters from Slovakia. *Biologia*. 71: 117-20.
- Hawkey PM, Jones AM;** 2009. The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 64: 3-10.
- Hellinger WC, Brewer NS;** 1999. Carbapenems and monobactams: Imipenem, meropenem, and aztreonam. *Mayo Clinic Proceedings*. 74: 420-34.
- Heritier C, Poirel L, Aubert D, Nordmann P;** 2003. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47: 268-73.

- Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK, National Healthcare Safety Network T, Participating National Healthcare Safety Network F;** 2008. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 29: 996-1011.
- Higgins PG, Perez-Llarena FJ, Zander E, Fernandez A, Bou G, Seifert H;** 2013. OXA-235, a Novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57: 2121-6.
- Hrabak J, Empel J, Bergerova T, Fajfrlik K, Urbaskova P, Kern-Zdanowicz I, Hryniewicz W, Gniadkowski M;** 2009. International clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases in a Czech Hospital. *Journal of Clinical Microbiology*. 47: 3353-7.
- Hrabak J, Studentova V, Jakubu V, Adamkova V, Dvorakova L, Balejova M, Bergerova T, Chmelarova E, Jezek P, Kabelikova P, Kolar M, Paterova P, Tejkalova R, Papagiannitsis C, Zemlickova H;** 2015. Prevalence study on carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Czech hospitals-results from Czech part of European survey on carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE). *Epidemiology, Microbiology, and Immunology*. 64: 87-91.
- Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Young D, Lee JH, Song JS, Lee SH;** 2005. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in Korea. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 2241-5.
- Jorgensen JH, McElmeel ML, Fulcher LC, Zimmer BL;** 2010. Detection of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBLs) by testing with MicroScan overnight and ESBL confirmation panels. *Journal of Clinical Microbiology*. 48: 120-3.
- June CM, Vallier BC, Bonomo RA, Leonard DA, Powers RA;** 2014. Structural origins of oxacillinase specificity in class D beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58: 333-41.
- Kaase M, Szabados F, Wassill L, Gatermann SG;** 2012. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* by a commercial multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 50: 3115-8.
- Kalpoë JS, Al Naiemi N, Poirel L, Nordmann P;** 2011. Detection of an Ambler class D OXA-48-type beta-lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* strain in the Netherlands. *Journal of Medical Microbiology*. 60: 677-8.
- Karve TM, Cheema AK;** 2011. Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease. *Journal of Amino Acids*. 2011: 207691.
- Kolar M, Bardon J, Chroma M, Hricova K, Stosova T, Sauer P, Koukalova D;** 2010. ESBL and AmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in poultry in the Czech Republic. *Veterinarni Medicina*. 55: 119-24.
- Kolar M, Urbanek K, Cekanova L;** 2003. Podklady pro racionální antibiotickou léčbu komunitních bakteriálních infekcí. *Klinická Farmakologie a Farmacie*. 1: 22-24.

- Krizova L, Bonnin RA, Nordmann P, Nemeč A, Poirel L;** 2012. Characterization of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain carrying the *bla*(NDM-1) and *bla*(OXA-23) carbapenemase genes from the Czech Republic. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 67: 1550-2.
- Lambert PA;** 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57: 1471-85.
- Lee W, McDonough MA, Kotra L, Li ZH, Silvaggi NR, Takeda Y, Kelly JA, Mobashery S;** 2001. A 1.2-Å snapshot of the final step of bacterial cell wall biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98: 1427-31.
- Li L, Wang QY, Zhang H, Yang MJ, Khan MI, Zhou XH;** 2016. Sensor histidine kinase is a beta-lactam receptor and induces resistance to beta-lactam antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113: 1648-53.
- Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM, Ho PL, Keness Y, Doi Y, Paterson D, Woodford N;** 2012. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 67: 1569-77.
- Lo Conte L, Chothia C, Janin J;** 1999. The atomic structure of protein-protein recognition sites. *Journal of Molecular Biology*. 285: 2177-98.
- Lochmann O;** 1994. *Základy antimikrobní terapie*. Triton, Praha. 175 s.
- Lolans K, Rice TW, Munoz-Price LS, Quinn JP;** 2006. Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50: 2941-5.
- Lopez-Otsoa F, Gallego L, Towner KJ, Tysall L, Woodford N, Livermore DM;** 2002. Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in northern Spain. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 4741-3.
- Majiduddin FK, Materon IC, Palzkill TG;** 2002. Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *International Journal of Medical Microbiology*. 292: 127-37.
- Mathlouthi N, Areig Z, Al Bayssari C, Bakour S, El Salabi AA, Ben Gwierif S, Zorgani AA, Ben Slama K, Chouchani C, Rolain JM;** 2015. Emergence of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates collected from some Libyan hospitals. *Microbial Drug Resistance*. 21: 335-41.
- McKenzie C;** 2011. Antibiotic dosing in critical illness. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 66 Suppl 2: ii25-31.
- Medeiros AA;** 1997. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*. 24: S19-S45.
- Meek RW, Vyas H, Piddock LJ;** 2015. Nonmedical uses of antibiotics: time to restrict their use? *PLOS Biology*. 13: e1002266.
- Meyer KS, Urban C, Eagan JA, Berger BJ, Rahal JJ;** 1993. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Annals of Internal Medicine*. 119: 353-8.

- Mlynarcik P, Bardon J, Htoutou Sedlakova M, Prochazkova P, Kolar M;** 2018. Identification of novel OXA-134-like beta-lactamases in *Acinetobacter lwoffii* and *Acinetobacter schindleri* isolated from chicken litter. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky. DOI 10.5507/bp.2018.037.
- Mlynarcik P, Roderova M, Kolar M;** 2016. Primer evaluation for PCR and its application for detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. Jundishapur Journal of Microbiology. 9.
- Mossakowska D, Ali NA, Dale JW;** 1989. Oxacillin-hydrolyzing beta-lactamases - a comparative-analysis at nucleotide and amino-acid sequence levels. European Journal of Biochemistry. 180: 309-18.
- Naas T, Nordmann P;** 1999. OXA-type beta-lactamases. Current Pharmaceutical Design. 5: 865-79.
- Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Diancourt L, van der Reijden TJK, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L;** 2008. Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 62: 484-9.
- Nguyen Van JC, Gutmann L;** 1994. [Resistance to antibiotics caused by decrease of the permeability in gram-negative bacteria]. Presse Med. 23: 522, 7-31.
- Nijhuis R, Samuelsen O, Savelkoul P, van Zwet A;** 2013. Evaluation of a new real-time PCR assay (Check-Direct CPE) for rapid detection of KPC, OXA-48, VIM, and NDM carbapenemases using spiked rectal swabs. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 77: 316-20.
- Nussinov R, Schreiber G;** 2009. Computational protein-protein interactions. Boca Raton: CRC Press.
- Okeke IN, Peeling RW, Goossens H, Auckenthaler R, Olmsted SS, de Lavison JF, Zimmer BL, Perkins MD, Nordqvist K;** 2011. Diagnostics as essential tools for containing antibacterial resistance. Drug Resistance Updates. 14: 95-106.
- Osterblad M, Karah N, Halkilahti J, Sarkkinen H, Uhlin BE, Jalava J;** 2016. Rare detection of the *Acinetobacter* class D carbapenemase *bla*OXA-23 gene in *Proteus mirabilis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 60: 3243-5.
- Pangon B, Bizet C, Bure A, Pichon F, Philippon A, Regnier B, Gutmann L;** 1989. In vivo selection of a cephamycin-resistant, porin-deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae* producing a TEM-3 beta-lactamase. The Journal of Infectious Diseases. 159: 1005-6.
- Papp-Wallace KM, Bonomo RA;** 2016. New beta-lactamase inhibitors in the clinic. Infectious Disease Clinics of North America. 30: 441-64.
- Patrick GL;** 2013. An introduction to medicinal chemistry. Fifth edition. Edition. Oxford: Oxford University Press.
- Pfeifer Y, Schlatterer K, Engelmann E, Schiller RA, Frangenberg HR, Stiewe D, Holfelder M, Witte W, Nordmann P, Poirel L;** 2012. Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in German hospitals. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 56: 2125-8.

- Podschun R, Ullmann U;** 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*. 11: 589.
- Poirel L, Bercot B, Millemann Y, Bonnin RA, Pannaux G, Nordmann P;** 2012. Carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. in cattle, France. *Emerging Infectious Diseases journal*. 18: 523-5.
- Poirel L, Naas T, Nordmann P;** 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54: 24-38.
- Poirel L, Nordmann P;** 2006. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene bla(OXA-58) in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50: 1442-8.
- Poirel L, Nordmann P;** 2015. Rapidec Carba NP test for rapid detection of carbapenemase producers. *Journal of Clinical Microbiology*. 53: 3003-8.
- Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P;** 2001. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45: 2598-603.
- Poole K;** 2004. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 61: 2200-23.
- Queenan AM, Bush K;** 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 20: 440-58, table of contents.
- Rawat D, Nair D;** 2010. Extended-spectrum beta-lactamases in Gram negative bacteria. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2: 263-74.
- Senkyrikova M, Husickova V, Chroma M, Sauer P, Bardon J, Kolar M;** 2013. *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 detected in the Czech Republic. *Springerplus*. 2: 296.
- Seputiene V, Linkevicius M, Bogdaite A, Povilonis J, Planciuniene R, Giedraitiene A, Pavilonis A, Suziedeliene E;** 2010. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitals in Lithuania. *Journal of Medical Microbiology*. 59: 1263-5.
- Sevillano E, Gallego L, Garcia-Lobo JM;** 2009. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathologie Biologie*. 57: 493-5.
- Shoja S, Moosavian M, Rostami S, Farahani A, Peymani A, Ahmadi K, Ebrahimifard N;** 2017. Dissemination of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in patients with burn injuries. *Journal of the Chinese Medical Association*. 80: 245-52.
- Schmidtke AJ, Hanson ND;** 2006. Model system to evaluate the effect of ampD mutations on AmpC-mediated beta-lactam resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50: 2030-7.
- Singh H, Arora E, Thangaraju P, Singh J, Natt NK;** 2013. Antimicrobial resistance: New patterns, emerging concepts and prevention. *Journal of Rational Pharmacotherapeutics and Research*. 1: 95-99.
- Skockova A, Bogdanovicova K, Kolackova I, Karpiskova R;** 2015. Antimicrobial-resistant and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in raw cow's milk. *Journal*

of Food Protection. 78: 72-7.

- Smet A, Boyen F, Pasmans F, Butaye P, Martens A, Nemeč A, Deschaght P, Vanechoutte M, Haesebrouck F;** 2012. OXA-23-producing *Acinetobacter species* from horses: a public health hazard? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 67: 3009-10.
- Swayne RL, Ludlam HA, Shet VG, Woodford N, Curran MD;** 2011. Real-time TaqMan PCR for rapid detection of genes encoding five types of non-metallo-(class A and D) carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 38: 35-8.
- Sykes RB, Bonner DP, Swabb EA;** 1985. Modern beta-lactam antibiotics. *Pharmacology & Therapeutics*. 29: 321-52.
- Szekely E, Damjanova I, Janvari L, Vas KE, Molnar S, Bilca DV, Lorinczi LK, Toth A;** 2013. First description of bla(NDM-1), bla(OXA-48), bla(OXA-181) producing *Enterobacteriaceae* strains in Romania. *International Journal of Medical Microbiology*. 303: 697-700.
- Tasli H, Bahar IH;** 2005. Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases in hospital-based *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 58: 162-7.
- Thanassi DG, Cheng LW, Nikaido H;** 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 179: 2512-8.
- Tipper DJ, Strominger JL;** 1965. Mechanism of action of penicillins - a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 54: 1133-+.
- Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR;** 2003. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d ' beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47: 2859-63.
- Turton JF, Doumith M, Hopkins KL, Perry C, Meunier D, Woodford N;** 2016. Clonal expansion of *Escherichia coli* ST38 carrying a chromosomally integrated OXA-48 carbapenemase gene. *Journal of Medical Microbiology*. 65: 538-46.
- Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Coelho JM, Warner M, Pike R, Pitt TL;** 2005. Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 3074-82.
- Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TL;** 2006. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiology Letters*. 258: 72-7.
- Vading M, Naucle P, Kalin M, Giske CG;** 2018. Invasive infection caused by *Klebsiella pneumoniae* is a disease affecting patients with high comorbidity and associated with high long-term mortality. *Plos One*. 13.
- Vaidya VK;** 2011. Horizontal transfer of antimicrobial resistance by extended-spectrum beta lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of laboratory physicians*. 3: 37-42.
- Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP, Colombian Nosocomial Resistance Study G;** 2007. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51: 1553-5.

- von Dolinger de Brito D, Oliveira EJ, Abdallah VO, da Costa Darini AL, Filho PP;** 2005. An outbreak of *Acinetobacter baumannii* septicemia in a neonatal intensive care unit of a university hospital in Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 9: 301-9.
- von Escherich T;** 1885. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschritte der Medizin*. 3: 515-522.
- Votava M et al.;** 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Neptun, Brno. 495 s.
- Votava M;** 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přepracované vydání. Neptun, Brno. 351 s.
- Wachino J, Doi Y, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Kubota T, Arakawa Y;** 2004. Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A beta-lactamase, GES-4, possessing a single G170S substitution in the omega-loop. *Antimicrob Agents Chemother*. 48: 2905-10.
- 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.
- Wang ZG, Fast W, Valentine AM, Benkovic SJ;** 1999. Metallo-beta-lactamase: structure and mechanism. *Current Opinion in Chemical Biology*. 3: 614-22.
- Webber MA, Piddock LJV;** 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51: 9-11.
- Willey JM, Sherwood L, Woolverton CJ;** 2014. *Prescott's microbiology*. Ninth edition. Edition. New York, NY: McGraw-Hill.
- Wright AJ;** 1999. The penicillins. *Mayo Clinic Proceedings*. 74: 290-307.
- Zatloukalova S, Holy O, Petrzelova J, Mlynarcik P, Vlckova J, Roderova M, Horakova D, Kollarova H;** 2018. Occurrence and antibiotic resistance of *Enterobacteriaceae* in acute leukemia patients. *Klinicka onkologie Journal*. 31: 282-8.
- Zhang WJ, Lu Z, Schwarz S, Zhang RM, Wang XM, Si W, Yu S, Chen L, Liu S;** 2013. Complete sequence of the *bla*(NDM-1)-carrying plasmid pNDM-AB from *Acinetobacter baumannii* of food animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 68: 1681-2.

INTERNETOVÉ ZDROJE:

Beta-Lactamase DataBase (BLDB) [online]. [cit 2019-02-01]. Dostupné z: <http://www.bldb.eu/Enzymes.php>

La Balme-les-Grottes F; BioMérieux (La Balme-les-Grottes, Francúzsko) [online]. [cit 2019-03-03]. Dostupné z: <https://www.biomerieux-diagnostics.com/rapidec-carba-np>.

The European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net): Surveillance Atlas of Infectious Diseases [online]. [cit 2019-01-29]. Dostupné z: <https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>

World Health Organization: Antimicrobial resistance [online]. [cit 2019-01-23]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>