

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2024**

**Bc. Anna Mahdalová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Detekce *mcr* genů a vybraných  
beta-laktamáz s rozšířeným spektrem účinku  
u enterobakterií**

**Diplomová práce**

**Anna Mahdalová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2024**

**Vedoucí práce: Mgr. Patrik Mlynářčík, Ph.D.**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Anna MAHDALOVÁ  
Osobní číslo: R220033  
Studijní program: N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie  
Téma práce: Detekce mcr genů a vybraných beta-laktamáz s rozšířeným spektrem účinku u enterobakterií  
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

### Zásady pro vypracování

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

Teoretická část: práce s odbornou literaturou a zpracování rešerše na téma kolistinové rezistence a beta-laktamáz s rozšířeným spektrem účinku u enterobakterií.

Praktická část: izolace nukleových kyselin z vybraných bakterií klinického původu, designování primerů, provádění PCR experimentů a gelové elektroforézy, a vyhodnocení výsledků.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Mlynářík, P., Kolar, M., (2019): Molecular mechanisms of polymyxin resistance and detection of mcr genes. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, 163(1), doi:10.5507/bp.2018.070.

Wang, R., van Dorp, L., Shaw, L. P., Bradley, P., Wang, Q., Wang, X., Jin, L., Zhang, Q., Liu, Y., Rieux, A., Dorai-Schneiders, T., Weinert, L. A., Iqbal, Z., Didelot, X., Wang, H., Balloux, F., (2018): The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene mcr-1. *Nature Communications*, 9(1), doi:10.1038/s41467-018-03205-z

Trimble, M. J., Mlynářík, P., Kolar, M., Hancock, R. E., (2016): Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(10), doi:10.1101/cshperspect.a025288.

Arcilla, M. S., van Hattem, J. M., Matamoros, S., Melles, D. C., Penders, J., de Jong, M. D., Schultsz, C., consortium, C., (2016): Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), doi:10.1016/S1473-3099(15)00541-1

Livermore, D. M., Woodford, N., (2006): The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. *Trends in Microbiology*, 14(9), 413-420, doi:10.1016/j.tim.2006.07.008.

Další odborné články v mezinárodních vědeckých časopisech týkající se problematiky diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Patrik Mlynářík, Ph.D.

Ústav mikrobiologie

Datum zadání diplomové práce: 20. října 2022  
Termín odevzdání diplomové práce: 31. května 2024

L.S.

---

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.  
děkan

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 25. října 2022

## **Bibliografické údaje**

Jméno a příjmení autora: Anna Mahdalová

Název práce: Detekce *mcr* genů a vybraných beta-laktamáz s rozšířeným spektrem účinku u enterobakterií

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

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

Rok obhajoby: 2024

Klíčová slova: *mcr*, mobilní kolistinová rezistence, bakterie, PCR, primer

Počet stran: 74

Počet příloh: 0

Jazyk: český

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se soustředí na identifikaci *mcr* genů a beta-laktamáz u enterobakterií z klinických vzorků. Teoretická část se zaměřuje na antibiotickou rezistenci, mechanismy účinku polymyxinů a mechanismy polymyxinové rezistence, včetně plazmidem zprostředkované rezistence. Dále se práce zabývá globálním rozšířením všech deseti variant *mcr* genů, náklady na fitness spojené s přítomností *mcr* genů v bakteriích a možným šířením těchto genů.

V experimentální části byla detekce *mcr* genů provedena pomocí PCR amplifikace se sedmi specifickými páry primerů. Navíc byly navrženy další čtyři páry primerů pro detekci všech doposud popsáných variant *mcr* genů pomocí programu Geneious Prime, tyto primery byly testovány *in silico*. Při analýze klinických vzorků byly identifikovány geny *mcr-1*, *mcr-9* a *mcr-10* pomocí PCR amplifikace, následované potvrzením pomocí celogenomových dat. Na základě celogenomových dat bylo také zjištěno, že všechny zkoumané vzorky nesly minimálně jednu beta-laktamázu, přičemž nejčastěji byly detekovány beta-laktamázy typu ACT, MIR, CTX-M, SHV, TEM a OXA. Konkrétní izoláty vykazovaly specifické kombinace beta-laktamáz, některé vzorky nesly až pět různých typů. V této práci byl také sestaven fylogenetický strom, který ukazuje podobnosti mezi MCR enzymy, byla provedena *in silico* analýza konzervovaných aminokyselin a analýza bodových mutací k identifikaci evolučně aktivních míst.

## **Bibliographical identification**

Author's first and surname: Anna Mahdalová

Title: Detection of *mcr* genes and selected extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteria

Type of thesis: diploma

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science Palacký University Olomouc

Supervisor: Mgr. Patrik Mlynářčík, Ph.D.

The year of presentation: 2024

Keywords: *mcr*, mobile colistin resistance, bacteria, PCR, primer

Number of pages: 74

Number of appendices: 0

Language: Czech

## **SUMMARY**

This diploma thesis focuses on identifying *mcr* genes and beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* from clinical samples. The theoretical part focuses on antibiotic resistance, mechanisms of action of polymyxins, and mechanisms of polymyxin resistance, including plasmid-mediated resistance. The thesis also discusses the global distribution of all ten *mcr* gene variants, the fitness costs associated with *mcr* genes in bacteria, and the potential spread of these genes.

In the experimental part, the detection of *mcr* genes was performed by PCR amplification with seven specific primer pairs. In addition, four more primer pairs were designed to detect all *mcr* gene variants described so far using Geneious Prime software, and these primers were tested *in silico*. In the analysis of clinical samples, the *mcr-1*, *mcr-9* and *mcr-10* genes were identified by PCR amplification, followed by confirmation using whole-genome sequencing data. The whole-genome data also found that all samples examined carried at least one beta-lactamase, with ACT, MIR, CTX-M, SHV, TEM and OXA beta-lactamases being the most frequently detected. Specific isolates showed specific combinations of beta-lactamases, with some samples carrying up to five different types. In this work, a phylogenetic tree was constructed to show the similarity between MCR enzymes, *in silico* analysis of conserved amino acids was performed, and point mutation analysis was performed to identify evolutionarily active sites.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Patrika Mlynářčika, Ph.D. s využitím uvedených literárních zdrojů, které jsou uvedeny v závěru této práce.

V Olomouci dne .....

.....

Bc. Anna Mahdalová

Ráda bych upřímně poděkovala svému vedoucímu diplomové práce, panu Mgr. Patrikovi Mlynářčikovi, Ph.D., za jeho odborné a trpělivé vedení během zpracovávání této práce. Děkuji za cenné a praktické rady, za ochotu a čas, který mi věnoval během psaní teoretické i experimentální části diplomové práce. Ráda bych také poděkovala své rodině, která mě po celou dobu studia podporovala.



## OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CÍLE PRÁCE .....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	3
3.1	<i>Enterobacteriaceae</i> .....	3
3.2	Bakteriální antimikrobiální rezistence .....	3
3.3	Mechanismy rezistence vůči antibiotikům.....	5
3.3.1	Modifikace cílového místa.....	6
3.3.2	Omezení příjmu léčiva.....	6
3.3.3	Efluxní pumpy .....	6
3.3.4	Inaktivace léčiva .....	6
3.4	Beta-laktamázy.....	7
3.5	Polymyxiny .....	7
3.6	Mechanismy účinku polymyxinů.....	9
3.6.1	Bakteriální dýchání.....	9
3.6.2	Vazba ribozomů.....	10
3.6.3	Buněčné dělení.....	10
3.6.4	ExPortal .....	10
3.6.5	Reaktivní formy kyslíku .....	11
3.7	Polymyxinová rezistence .....	11
3.7.1	Modifikace lipidu A.....	11
3.7.1.1	Dvousložkový regulační systém PhoPQ.....	13
3.7.1.2	Dvousložkový regulační systém PmrAB.....	13
3.7.1.3	Snížení tekutosti LPS.....	14
3.7.2	Ztráta LPS .....	14
3.7.3	Stresové reakce .....	15
3.7.3.1	Biofilm.....	15
3.7.3.2	Tvorba kapsul .....	15
3.7.4	Efflux .....	16
3.7.5	Plazmidem zprostředkovaná rezistence.....	17
3.8	Náklady na fitness.....	19
3.9	Varianty <i>mcr</i> genu.....	20

3.10	Globální epidemiologie <i>mcr</i> genů.....	21
3.11	Šíření <i>mcr</i> genů .....	23
4	MATERIÁL A METODY .....	25
4.1	Biologický materiál.....	25
4.2	Seznam použitých chemikálií .....	25
4.3	Seznam použitých souprav.....	25
4.4	Seznam použitých roztoků.....	25
4.5	Seznam použitých přístrojů a zařízení .....	26
4.6	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	26
4.6.1	Sekvenční analýza.....	26
4.6.2	Navrhování primerů pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR).....	27
4.6.3	Izolace bakteriální DNA .....	27
4.6.4	PCR amplifikace DNA .....	27
4.6.5	Elektroforetická separace PCR produktů.....	31
4.6.6	Sekvenování celého genomu, anotace a molekulární analýza genů <i>mcr</i> a beta-laktamáz .....	31
4.6.7	Konstrukce fylogenetického stromu .....	32
5	VÝSLEDKY .....	33
5.1	Designování primerů a jejich testování.....	33
5.2	Výskyt <i>mcr</i> -pozitivních izolátů enterobakterií v klinických vzorcích.....	34
5.3	Výskyt beta-laktamáz u izolátů enterobakterií.....	35
5.4	<i>In silico</i> analýza MCR enzymů.....	38
5.4.1	Bodové mutace v enzimech MCR .....	41
6	DISKUSE .....	45
7	ZÁVĚR.....	52
8	LITERATURA .....	54

## SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

<b>AMR</b>	Antimikrobiální rezistence ( <i>Antimicrobial resistance</i> )
<b>ATB</b>	Antibiotikum
<b>ATP</b>	Adenosintrifosfát
<b>BLDB</b>	<i>Beta-lactamase database</i>
<b>bp</b>	Páry bází ( <i>Base pair</i> )
<b>CAMP</b>	Kationtové antimikrobiální peptidy ( <i>Cationic antimicrobial peptides</i> )
<b>CMS</b>	Kolistimethát sodný ( <i>Colistimethate sodium</i> )
<b>CPS</b>	Kapsulární polysacharid ( <i>Capsular polysaccharide</i> )
<b>Da</b>	Dalton
<b>D-Leu</b>	D-leucin
<b>DNA</b>	Deoxyribonukleová kyselina ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<b>D-Phe</b>	D-fenylalanin
<b>ESBL</b>	Beta-laktamázy s rozšířeným spektrem účinku ( <i>Extended spectrum beta-lactamases</i> )
<b>HK</b>	Histidinkináza ( <i>Histidine kinase</i> )
<b>IMP</b>	Protein vnitřní membrány ( <i>Inner membrane protein</i> )
<b>L-Ara4N</b>	4-amino-4-deoxy-L-arabinóza
<b>L-Dab</b>	L- $\alpha$ - $\gamma$ -diaminomáslná
<b>LPS</b>	Lipopolysacharid ( <i>Lipopolysaccharide</i> )
<b>mcr</b>	Mobilní rezistence na kolistin ( <i>Mobilized colistin resistance</i> )
<b>MDR</b>	Mnohočetná léková rezistence/Multirezistence ( <i>Multidrug resistance</i> )
<b>MFP</b>	Membránový fúzní protein ( <i>Membrane fusion protein</i> )
<b>MIC</b>	Minimální inhibiční koncentrace ( <i>Minimum inhibitory concentration</i> )
<b>OMP</b>	Protein vnější membrány ( <i>Outer membrane protein</i> )
<b>pEtN</b>	Fosfoethanolamin ( <i>Phosphoethanolamine</i> )
<b>RND</b>	<i>Resistance Nodulation Division</i>
<b>ROS</b>	Reaktivní formy kyslíku ( <i>Reactive oxygen species</i> )
<b>RR</b>	Regulátor odezvy ( <i>Response regulator</i> )
<b>rRNA</b>	Ribozomální ribonukleová kyselina ( <i>Ribosomal ribonucleotide acid</i> )
<b>TCS</b>	Dvousložkový regulační systém ( <i>Two-component regulatory system</i> )
<b>WGS</b>	Celogenomové sekvenování ( <i>whole genome sequencing</i> )

## SEZNAM OBRÁZKŮ

**Obrázek 1:** Transformace, transdukce, konjugace.

**Obrázek 2:** Obecné mechanismy antimikrobiální rezistence.

**Obrázek 3:** Chemická struktura polymyxinu B a kolistinu (polymyxinu E).

**Obrázek 4:** Struktura efluxní pumpy AcrAB-TolC.

**Obrázek 5:** Geografická distribuce genů *mcr-1* až *mcr-10*.

**Obrázek 6:** Možné cesty přenosu *mcr* pozitivních enterobakterií.

**Obrázek 7:** Fylogenetický strom získaný porovnáním 800 enzymů MCR pomocí Geneious PhyML.

**Obrázek 8:** Změny aminokyselin v primární sekvenci enzymů MCR, spolu s jejich evolučním zachováním.

## **SEZNAM TABULEK**

**Tabulka 1:** Složení PCR směsi pro jednu PCR reakci.

**Tabulka 2:** Teplotní a časové podmínky PCR reakce.

**Tabulka 3:** Sekvence primerů použitých pro detekci *mcr* genů pomocí PCR.

**Tabulka 4:** Zastoupení MCR enzymů a beta-laktamáz u vybraných enterobakterií se sekvenovaným genomem.

# 1 ÚVOD

Bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* jsou široce rozšířené mikroorganismy, vyskytující se v půdě, vodě, na rostlinách a jsou také součástí přirozené střevní mikroflóry živočichů, včetně člověka. I přestože mnohé druhy enterobakterií jsou součástí trávicího traktu některé patogenní druhy způsobují závažné infekce u lidí i zvířat například salmonelózu, infekce močových cest, pneumonii nebo břišní tyfus.

Léčba bakteriálních infekcí je tradičně založena na použití antibiotik, avšak v současné době čelíme vážnému problému antibiotické rezistence. Bakterie si v průběhu evoluce vyvinuly různé mechanismy, jak se bránit účinkům antimikrobiálních látek a lidská činnost včetně nadměrného užívání antibiotik v klinické medicíně a zemědělství vznik rezistence značně urychluje. Celosvětově dochází k šíření multirezistentních a panrezistentních bakterií často označovaných jako „superbugs“ neboli „superbakterie“, které jsou buď citlivé na pár antibiotik poslední možnosti, například polymyxiny a karbapenémy nebo už nejsou citlivé na žádné z dostupných antibiotik. Lidstvo se tedy potýká s velmi vážným problémem, s narůstající polymyxinovou a karbapenémovou rezistencí, čímž nám docházejí poslední účinné antibiotika. Tento problém může vést k vysokému počtu infekcí a s nimi spojeným úmrtím v důsledku neúčinné léčby.

Kromě dobře známých mechanismů rezistence na antibiotika, jako je modifikace cílového místa, omezení příjmu léčiva, efflux léčiva ven z buňky nebo inaktivace léčiva byla nedávno objevena mobilní kolistinová rezistence, zkráceně označovaná jako *mcr*. MCR představuje zvláště znepokojivou hrozbu, protože poskytuje rezistenci vůči kolistinu, což je antibiotikum poslední možnosti. Navíc je gen pro tuto rezistenci umístěn na mobilním genetickém elementu, což umožňuje horizontální přenos rezistence mezi bakteriemi spolu s dalšími geny rezistence vůči karbapenémům a beta-laktamázám.

Tato diplomová práce se zaměřuje na problematiku rezistence u enterobakterií s důrazem na mobilní kolistinovou rezistenci. V experimentální části byl sledován výskyt *mcr* genů a beta-laktamáz v klinických vzorcích spolu s frekvencí aminokyselinových mutací v MCR enzymech. Byl sestaven fylogenetický strom pro vizualizaci podobnosti enzymů MCR a bylo navrženo celkem 11 párů primerů pro detekci všech variant genů *mcr*, z nichž sedm sad primerů bylo ověřeno také polymerázovou řetězovou reakcí.

## 2 CÍLE PRÁCE

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

Teoretická část: práce s odbornou literaturou a zpracování rešerše na téma kolistinová rezistence a beta-laktamáz s rozšířeným spektrem účinku u enterobakterií.

Praktická část: izolace nukleových kyselin z vybraných bakterií klinického původu, designování primerů, provádění PCR experimentů a gelové elektroforézy, vyhodnocení výsledků.

### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1 *Enterobacteriaceae*

Čeď *Enterobacteriaceae* obsahuje velké množství lidských patogenních bakterií. Všechny bakterie v této čedi jsou tyčinkovitého tvaru, gramnegativní, nesporulující, aerobní nebo fakultativně anaerobní (Salzberger, 2023). Existují nepohyblivé druhy i pohyblivé, ty se pohybují pomocí flagel a peritichózních bičíků (Lister *et* Barrow, 2008). Enterobakterie jsou všudypřítomné, jsou rozšířené po celém světě v půdě, vodě, na rostlinách i v gastrointestinálním traktu živočichů včetně člověka, kde tvoří přirozenou součást mikroflóry střeva (NCBI, 2023; Salzberger, 2023).

Čeď *Enterobacteriaceae* zahrnuje velké množství antigenně příbuzných a biochemicky podobných bakterií, které zahrnují rody jako *Citrobacter* spp., *Edwardsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Hafnia* spp., *Klebsiella* spp., *Morganella* spp., *Pantoea* spp., *Plesiomonas* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Salmonella* spp., *Serratia* spp., *Shigella* spp. a *Yersinia* spp. (Salzberger, 2023). Mnohé enterobakterie z výše uvedených rodů způsobují závažné infekce, které je možné léčit pomocí antibiotik. V současné době se ovšem potýkáme s rezistencí enterobakterií vůči antimikrobiálním látkám, což omezuje terapeutické možnosti, zvyšuje náklady na zdravotní péči a také zvyšuje úmrtnost (De Angelis *et al.*, 2020).

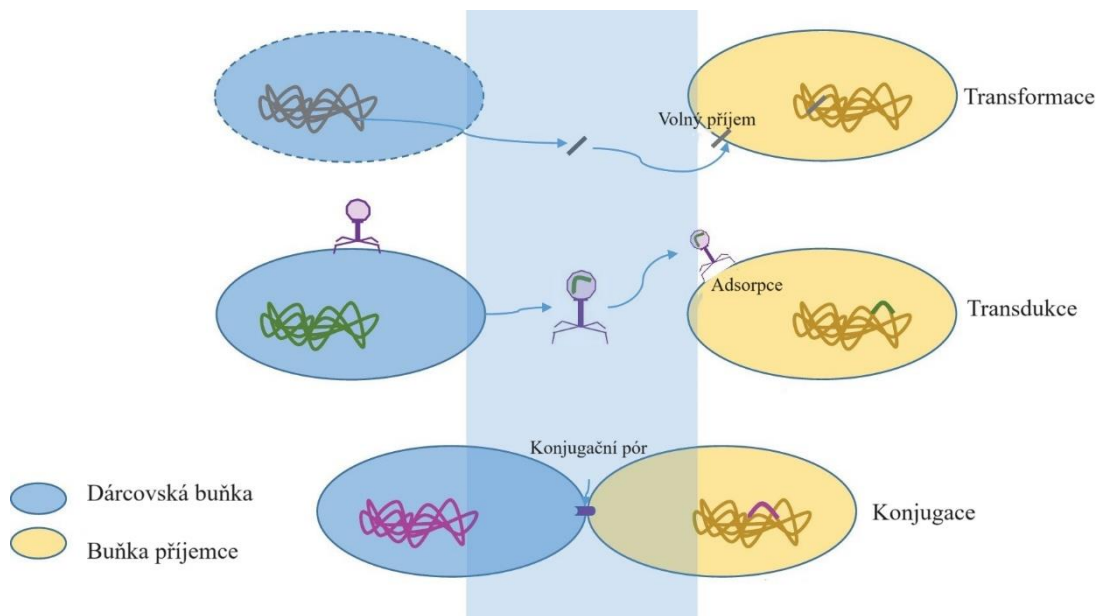
#### 3.2 Bakteriální antimikrobiální rezistence

Bakterie během evoluce čelily různým stresorům, hrozbám, napadení a usmrcení ze strany jiných mikroorganismů, konkurenčních bakterií, bakteriofágů a predátorů včetně lidského těla. V reakci na četné hrozby si bakterie za miliardy let vyvinuly důmyslné obranné mechanismy, jako genetické modifikace, které dnes bakterie chrání také před léčebnými prostředky (Smith *et al.*, 2023). Tvorba rezistence je přirozený proces, aby se mohly bakterie co nejrychleji množit, přežít a šířit se. Lidskou činností značně přispíváme k rychlejší tvorbě rezistence nadměrným používáním antibiotik, nepřesnou diagnostikou a v tom důsledku nesprávnému předepisování antibiotik, samoléčbou pacientů dochází ke ztrátě citlivosti a v neposlední řadě rozšířením používáním v zemědělství a chovu zvířat (Uddin *et al.*, 2021). Bakterie rezistentní na polymyxiny se velmi často vyskytují u hospodářských zvířat kvůli dřívějšímu používání polymyxinů jako stimulantů růstu (Ledger *et al.*, 2022).



Antimikrobiální rezistence (AMR) je definována jako pokračování růstu mikroorganismů v přítomnosti antimikrobiální látky v koncentraci u které se očekává, že inhibuje jeho růst (Mohapatra *et al.*, 2021). Jinými slovy se jedná o schopnost bakterií a dalších mikroorganismů odolávat působení ATB na které byly původně citlivé. AMR je nevyhnutelný jev díky genetickým mutacím mikrobů. Zároveň je AMR v posledních letech hlavním zdrojem obav. V současné době je více než 70 % patogenních bakterií rezistentních vůči alespoň jednomu ATB. V souvislosti s AMR ročně na celém světě zemře nejméně 700 000 lidí a předpokládá se, že pokud se nebude tento problém adekvátně řešit v roce 2050 způsobí rezistentní organismy 10 milionů úmrtí ročně (Cherak *et al.*, 2021; Uddin *et al.*, 2021). Žádná země ovšem nemůže sama úspěšně bojovat proti AMR, protože mezikontinentální cestování a obchod umožňuje, aby se rezistentní mikroorganismy šířily do zahraničí (O'Neill, 2014).

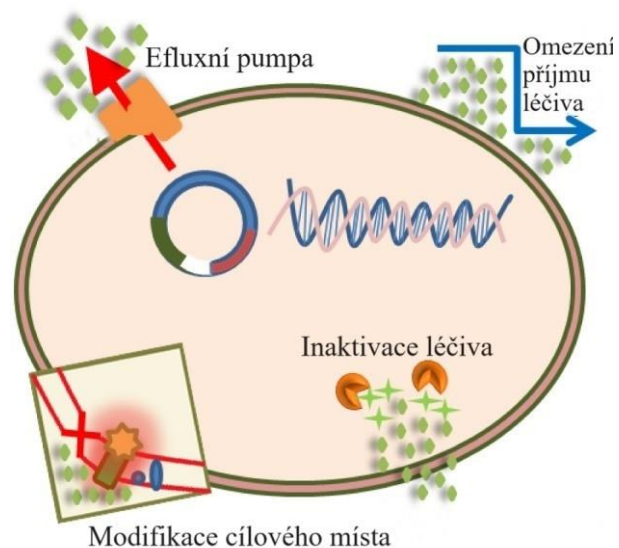
Rezistenci proti antimikrobiálním látkám dělíme na přirozenou a získanou. Přirozená rezistence je přirozeně vyskytující se rezistence, která není závislá na expozici antibiotikům, ale vyskytuje se všeobecně v genomu skupiny bakterií nebo v rámci bakteriálního druhu (Morrison *et Zembower*, 2020). Získaná rezistence je naopak způsobená důsledkem získání cizího genetického materiálu, který kóduje geny rezistence pomocí horizontálního přenosu genů, transdukci, konjugací nebo transpozicí viz obrázek 1 (Uddin *et al.*, 2021). Při transdukci je fragment DNA z jedné bakterie přenesen do druhé prostřednictvím bakteriálního viru, bakteriofágu. Transformace je proces kdy bakterie přijme extracelulární genetický materiál obvykle lyzované bakteriální buňky a začlení jej do svého chromozomu homologní rekombinací nebo jej převede na autonomně se replikující prvek. Nejdůležitějším a nejrozšířenějším mechanismem přenosu genů rezistence je konjugace. Konjugace zahrnuje přenos plazmidu nebo konjugativního transpozonu z dárcovské bakterie do příjemce prostřednictvím sex pillu, který je přítomný pouze u dárcovské buňky (Cherak *et al.*, 2021). Plazmidy se mohou rychle šířit bakteriálními společenstvy a napříč bakteriálními druhy a kmeny. Mezi získanou rezistencí se řadí také mutace vlastní chromozomální DNA (Morrison *et Zembower*, 2020).



**Obrázek 1:** Transformace, transdukce, konjugace. Převzato a upraveno podle Soler *et Forterre* (2020).

### 3.3 Mechanismy rezistence vůči antibiotikům

Jednotlivé mechanismy AMR se dělí do čtyř kategorií, první omezení příjmu léčiva, druhá modifikace cílového místa, třetí inaktivace léčiva a čtvrtá je eflux léčiva viz obrázek 2 (Uddin *et al.*, 2021). Je velmi důležité pochopit specifické mechanismy rezistence pro navrhnutí účinné léčebné strategie (Morrison *et Zembower*, 2020).



**Obrázek 2:** Obecné mechanismy antimikrobiální rezistence. Převzato a upraveno podle Reygaert (2018).

### 3.3.1 Modifikace cílového místa

Běžnou strategií bakterií při vývoji rezistence je zabránit ATB, aby se navázalo na cílové místo jeho modifikací. Změny cílového místa mohou spočívat v bodových mutacích v genech kódující cílové místo, v enzymatických změnách vazebného místa, například přidáním methylové skupiny nebo v úplné změně cílového místa, kdy bakterie vyvinou nový cíl, který plní podobné biochemické funkce jako původní cíl, ale nejsou inhibovány antibiotiky (Munita *et* Arias, 2016).

### 3.3.2 Omezení příjmu léčiva

Antibiotika mají velmi často intracelulární cíle, proto musí antibiotikum proniknout vnější a cytoplazmatickou membránou. Bakterie proto vyvinuly mechanismus, který brání ATB vstoupit do intracelulárního nebo periplazmatického prostoru změnou porinů. Změny porinů lze dosáhnout poškozením funkce porinu, změnou v úrovni exprese porinu a posunem v typu exprimovaných porinů. Změny porinů vedou k nízké úrovni rezistence, a proto jsou často spojeny s jinými mechanismy rezistence, nejčastěji se zvýšenou expresí efluxních pump (Munita *et* Arias, 2016).

### 3.3.3 Efluxní pumpy

Efluxní pumpy jsou rozmanitou skupinou transmembránových proteinů, které slouží k aktivnímu vyplavování antibiotik, bakteriálních metabolitů, ale také dezinfekčních prostředků z intracelulárního prostoru do extracelulárního prostoru, čímž udržují nízké intracelulární koncentrace (Kapoor *et al.*, 2017; Uddin *et al.*, 2021). Efluxní mechanismy pumpují antimikrobiální látky vstupující do buňky stejnou rychlostí ven dříve, než dosáhnou svého cíle (Kapoor *et al.*, 2017). Efluxní pumpy se vyskytují u gramnegativních i grampozitivních bakterií. Pumpy mohou být substrátově specifické nebo mají širokou substrátovou specifitu, takové pumpy se vyskytují u bakterií s multirezistencí (MDR). Geny kódující efluxní pumpy mohou být lokalizované na chromozomu nebo na mobilních genetických elementech (Munita *et* Arias, 2016).

### 3.3.4 Inaktivace léčiva

Jednou z nejúspěšnějších strategií bakterií, jak se vyrovnat s přítomností antibiotik je produkce enzymů, které léčivo degradují nebo inaktivují přidáním specifických chemických skupin ke sloučenině, čímž se ATB stane neúčinným. Mezi nejčastější biochemické reakce patří acetylace, fosforylace a adenylace. Výsledný efekt

je stérická zábrana, která snižuje afinitu léčiva k cíli, což se projevuje vyššími bakteriálními MIC (minimální inhibiční koncentrace). Tento mechanismus využívají gramnegativní i grampozitivní bakterie (Munita *et al.*, 2016).

### 3.4 Beta-laktamázy

Gramnegativní bakterie produkují enzymy beta-laktamázy, které hydrolyzují amidovou vazbu čtyřčlenného beta-laktamového kruhu ATB, jako jsou peniciliny, cefalosporiny a karbapenemy (Tooke *et al.*, 2019). Beta-laktamázy produkují také grampozitivní bakterie u nichž jsou vylučovány do prostředí, zatímco ty, které produkují gramnegativní bakterie obvykle zůstávají v periplazmatickém prostoru (Sandhu *et al.*, 2019).

V současné době existuje rozmanitá skupina beta-laktamáz schopných inaktivace všech klinicky používaných beta-laktamových antibiotik. Geny kódující beta-laktamázy s rozšířeným spektrem účinku (ESBL) jsou často nesené na plazmidech a vkládány do transpozonů nebo inzerčních sekvencí, což umožňuje rychlé efektivní šíření rezistence (Oelschlaeger, 2021). Na základě sekvenční analýzy se beta-laktamázy rozdělují do čtyř tříd, A, B, C a D. Mezi klíčové rodiny enzymů patří CTX-M, SHV, TEM a KPC (třída A), NDM a VIM (třída B), ADC a CMY (třída C) a OXA (oxacilinázy, třída D) (Tooke *et al.*, 2019). Podrobný pohled na tuto problematiku poskytuje Chudobová ve své diplomové práci z roku 2021 (Chudobová, 2021).

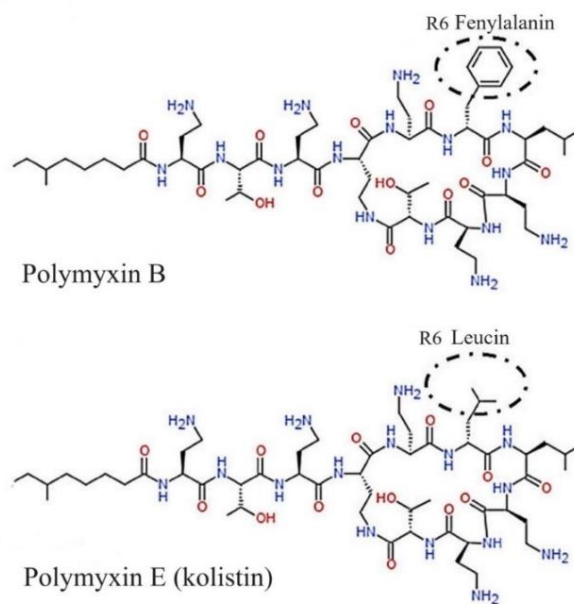
### 3.5 Polymyxiny

Polymyxiny představují rodinu antimikrobiálních cyklických oligopeptidů o hmotnosti ~ 1 200 Da produkovaných grampozitivním organismem *Bacillus polymyxa*, později přejmenovaným na *Paenibacillus polymyxa*. Pro klinické použití jsou vhodné pouze polymyxin B a polymyxin E neboli kolistin z patnácti známých molekulárních variací (Mlynarcik *et al.*, 2019). Strukturně obsahují šest kationtových zbytků kyseliny L- $\alpha$ - $\gamma$ -diaminomáslé (L-Dab) a patří tak ke kationtovým antimikrobiálním peptidům (CAMP). Polymyxiny se skládají z cyklického heptapeptidového kruhu a tripeptidového postranního řetězce, který je acylován mastnou kyselinou (Yin *et al.*, 2020). Kolistin a polymyxin B se liší pouze o jednu aminokyselinu na pozici 6 v polykationtovém peptidovém kruhu, kdy kolistin v této poloze nese d-leucin (D-Leu) a polymyxin B jej má nahrazený za d-fenylalanin (D-Phe) viz obrázek 3 (Nation *et al.*, 2015). Kationtový peptidový kruh poskytuje polymyxinům hydrofilní povahu, mastný acylový řetězec

je hydrofobní, tyto základní vlastnosti umožňují polymyxinům prostupovat buněčnou membránou (Mohapatra *et al.*, 2021).

V současnosti se polymyxin B i kolistin používají jako antimikrobiální látky „poslední možnosti“ kvůli dříve zaznamenané renální a nervové toxicitě. Proto jsou polymyxiny vyhrazeny pro léčbu závažných gramnegativních bakteriálních infekcí, které jsou rezistentní vůči jiným dostupným antibiotikům (Trimble *et al.*, 2016). Polymyxiny se využívají k léčbě infekcí močových cest, mozkových blan či krevního řečiště způsobené multirezistentními *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* a *Klebsiella pneumoniae* (Trimble *et al.*, 2016; Shatri *et Tadi*, 2023). Pro snížení toxicity je kolistin podáván ve formě neaktivního proléčiva, sodné soli kolistinu methansulfonátu (CMS), také známý jako kolistinmethát, ve kterém jsou kladné náboje neutralizovány (Nation *et al.*, 2015). CMS postrádá antibakteriální aktivitu a po podání vyžaduje *in vivo* přeměnu na kolistin (Nation *et al.*, 2014). Polymyxin B je podáván ve své aktivní formě jako sulfátová sůl a má nižší nefrotoxicitu než proléčivo kolistinmethát (Phe *et al.*, 2014).

Polymyxin B i kolistin se nejčastěji podávají intravenózně, infuzí. Mohou se podávat také inhalačně ve formě aerosolu. Při aplikaci intratekálně nebo intraventrikulárně je nutné aplikovat čisté ATB bez konzervačních látek. Polymyxin B může být podáván také lokálně pro oční a ušní použití pomocí roztoku nebo ve formě masti pro ošetření kožních infekcí (Shatri *et Tadi*, 2023).



**Obrázek 3:** Chemická struktura polymyxinu B a kolistinu (polymyxinu E). Převzato a upraveno podle Jerke *et al.* (2016).

### 3.6 Mechanismy účinku polymyxinů

V roce 1956 Newton navrhl, že mechanismus účinku polymyxinu B spočívá ve schopnosti spojovat se a dezorganizovat struktury bakteriální buňky, které jsou zodpovědné za udržení osmotické rovnováhy buňky. Nyní víme, že primárním cílem polymyxinů je lipopolysacharidová složka vnější membrány gramnegativních bakterií. Molekuly lipopolysacharidů (LPS) jsou bohaté na záporně nabitě fosfátové skupiny v doméně lipidu A, který je stabilizován dvojmocnými kationty, jako jsou  $Mg^{2+}$  a  $Ca^{2+}$  (Yin *et al.*, 2020). K interakci dochází pomocí kationtového náboje v polypeptidové části polymyxinu, který se elektrostaticky váže na negativně nabitý LPS, čemuž napomáhá interakce lipidového konce s mastnými kyselinami části lipidu A molekuly LPS. Důsledkem navázání polymyxinu na fosfátové zbytky lipidu A dojde ke kompetitivnímu vytěsnění membránu stabilizujících iontů hořčíku a vápníku, tím dojde k destabilizaci vnější membrány a narušení propustnosti (Trimble *et al.*, 2016). Průnik polymyxinů přes vnější membránu je závislý na amfipatické vlastnosti polymyxinů (Nang *et al.*, 2021). Díky narušení permeability polymyxiny pronikají do periplazmy a následně narušují fyzickou integritu cytoplazmatické membrány, což je klíčové pro baktericidní aktivitu (Yin *et al.*, 2020). Navzdory předpokladům, že narušení integrity vnější a cytoplazmatické membrány je jediným cílem polymyxinů, existují důkazy pro alternativní mechanismy účinku. Ukázalo se také, že pro buněčnou smrt není nutná buněčná lýza (Trimble *et al.*, 2016).

#### 3.6.1 Bakteriální dýchání

Polymyxiny cílí na permeabilizaci membrány, což má za následek narušení buněčné struktury až lýzy buňky. Narušení integrity cytoplazmatické membrány způsobené polymyxiny vede k negativnímu ovlivnění buněčné energetiky, buněčného dělení a biosyntézy buněčné stěny. Bakteriální dýchání vyžaduje ke správnému fungování neporušenou membránu. U *A. baumannii* už subletální koncentrace polymyxinu B vede k inhibici spotřeby kyslíku, aniž by ATB proniklo do cytoplazmatické membrány. Inhibice dýchání polymyxinem vede ke snížení zásoby ATP v buňce. Inhibice bakteriálního dýchání je dalším cílem polymyxinu, a i když nemá baktericidní účinky přispívá k jejich zabíjení tím, že ovlivňuje buněčnou energetiku (Trimble *et al.*, 2016; Ayoub Moubareck, 2020; Mohapatra *et al.*, 2021).

### 3.6.2 Vazba ribozomů

Již před více než padesáti lety bylo zjištěno, že polymyxin precipituje ribozomy *Escherichia coli* podobně jako jiná polykationtová antibiotika. V roce 2013 McCoy *et al.* začali zkoumat vztah polymyxinu k aminoglykosidům, což jsou kationtová sacharidová baktericidní antibiotika, která se váží na ribozomy. Zjistil, že polymyxin má mírnou vazbu na A-místo 16S rRNA ribozomů *E. coli* desetkrát slabší než kanamycin, ale desetkrát silnější než negativní kontrola, neaktivní derivát kolistinu se sulfomethylovanými aminokyselinami (neutralizovaný náboj). I přes schopnost vazby polymyxinu na ribozom nebyla bakteriální translace nijak ovlivněna. Naproti tomu eukaryotická translace byla ovlivněna negativně. Je prokázáno, že se polymyxin váže na A-místo 18S rRNA eukaryotických buněk (McCoy *et al.*, 2013). Vazba na ribozomy se nepovažuje za alternativní mechanismus účinku, kvůli nedostatku zjevných důsledků vazby ribozomů na prokaryotickou translaci ani důkazů, že polymyxin proniká dostatečně rychle do cytoplazmy, aby inhiboval velký počet ribozomů v bakteriálních buňkách (Trimble *et al.*, 2016; Mohapatra *et al.*, 2021).

### 3.6.3 Buněčné dělení

Buněčné dělení je zásadní proces, který je mechanicky spojen s cytoplazmatickou membránou a membránovým potenciálem. Při ošetření buněk subletální koncentrací kolistinu byl pozorován významný pokles počtu dělicích se buněk spolu s mírným poklesem počtu jednotek tvořících kolonie, nicméně bez významného zabíjení. Zastavení růstu je způsobené membránovou perturbací, která narušuje připojení genomu, čímž inhibuje replikaci DNA. Nemožnost replikace DNA a následného buněčného dělení podporuje baktericidní aktivitu polymyxinů. I když v současnosti nemůžeme říct, že buněčné dělení je přímým cílem polymyxinů, víme, že jej polymyxiny přímo nebo nepřímo ovlivňují (Trimble *et al.*, 2016).

### 3.6.4 ExPortal

Grampozitivní bakterie většinou neovlivňuje přítomnost polymyxinů, i když přesný mechanismus rezistence je z velké části neznámý. Předpokládá se, že velká peptidoglykanová vrstva brání interakci s cytoplazmatickou membránou. *Streptococcus pyogenes* je jedním druhem, který vykazuje polymyxinovou citlivost, což je způsobené absencí genu *mprF*, který kóduje enzym zodpovědný za modifikaci negativního náboje fosfatidylglycerolu na kapsulárním polysacharidu. Bylo také zjištěno, že polymyxin B cílí na strukturu ExPortal *S. pyogenes*. ExPortal je mikrodoména buněčné membrány

pro sekreční systém Sec, který exportuje proteiny. Každá buňka má pouze jeden ExPortal, který se nachází v sousedství místa budoucího dělení. Subletální koncentrace polymyxinu B narušují lipidovou strukturu kolem ExPortalu a brání sekreci cysteinové proteázy SpeB, streptolysinu O a cytolyzinu. I když dochází k narušení lipidové struktury v okolí ExPortalu již při subletálních dávkách, nedochází k narušení integrity membrány. Tento fakt podporuje alternativní mechanismy účinku (Rosch *et Caparon*, 2005; Trimble *et al.*, 2016; Mohapatra *et al.*, 2021).

### 3.6.5 Reaktivní formy kyslíku

Léčba polymyxiny může vést k endogenní produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), což vede k oxidativnímu zabíjení bakteriální buňky prostřednictvím hydroxylových radikálů. V bakteriálních buňkách aktivita redoxních enzymů extrahuje elektrony z molekulárního kyslíku a nepřetržitě tvoří intracelulární superoxid ( $O_2^-$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) a hydroxylové radikály ( $\cdot OH$ ). To vede k oxidativnímu poškození buněčných struktur jako jsou lipidy, DNA a proteiny, což může vést až k buněčné smrti. Tento velice kontroverzní mechanismus účinku vedoucí k smrti bakteriálních buněk ještě není plně akceptován a je potřeba provést další studie ke zjištění role ROS v celkové inhibici růstu buněk a jejich smrti (Trimble *et al.*, 2016; Ayoub Moubareck, 2020; Mohapatra *et al.*, 2021; Nang *et al.*, 2021).

## 3.7 Polymyxinová rezistence

Vzhledem k tomu, že polymyxiny jsou antibiotika poslední možnosti a využívají se k léčbě bakteriálních infekcí s MDR, je velmi důležité prozkoumat mechanismy rezistence, které se objevily jak v laboratoři, tak v klinice. Známé mechanismy rezistence zahrnují vnitřní, mutační a adaptivní mechanismy. Většina známých mechanismů je spojena s primárním cílem polymyxinu, s vnější membránou LPS, aby se stala méně propustnou pro polymyxiny. Mezi nejčastější změny vedoucí k narušení interakce antibiotika s LPS je snížení negativního náboje, snížení tekutosti LPS, zvýšení efluxu léčiva, snížení porinové dráhy, tvorba kapsul nebo hypervezikulace (Trimble *et al.*, 2016).

### 3.7.1 Modifikace lipidu A

Nejčastější mechanismus polymyxinové rezistence u různých patogenních bakterií jsou kovalentní modifikace fosfátových skupin lipidu A LPS přidáním kladně nabitých skupin, jako je fosfoethanolamin (pEtN) a 4-amino-4-deoxy-L-arabinóza (L-Ara4N). Tyto modifikace vedou ke snížení negativního náboje bakteriálního povrchu



a zabraňují počáteční elektrostatické interakci s kladně nabitými polymyxiny, což vede ke zvýšené odolnosti vůči polymyxinům až rezistenci (Mlynarcik *et al.*, 2019).

Modifikace pEtN i L-Ara4N jsou regulovány dvousložkovými regulačními systémy (TCS) (Mlynarcik *et al.*, 2019). Bakteriální dvousložkové systémy přenosu signálu hrají významnou úlohu při snímání environmentálních podnětů, mezi které patří nízké pH, nízké koncentrace  $Mg^{2+}$  a  $Ca^{2+}$ , vysoké koncentrace  $Fe^{3+}$  a  $Al^{3+}$ , makrofágové fagozomy nebo přítomnost CAMP včetně polymyxinů. Následná reakce na změny je modulace exprese několika genů způsobující upregulaci a následnou nadměrnou expresi genů a operonů modifikujících LPS (Rodríguez-Santiago *et al.*, 2021). Téměř všechny bakteriální druhy mají ve svém genomu několik TCS, jejich počty souvisí s velikostí genomu a rozsahem environmentálních nik, ve kterých organismus žije. Bakteriální TCS se skládá z transmembránové sensorové histidinkinázy (HK), která se autofosforyluje po přijetí externího signálu. Následně se signál přenáší na cytoplazmatický regulátor odezvy (RR) jeho fosforylací na konzervovaném místě. Aktivovaný RR působí jako transkripční faktor a ovlivňuje transkripci několika genů. RR se následně defosforyluje. Do polymyxinové rezistence je zapojeno několik TCS, nejlépe prostudovanými jsou PhoPQ a PmrAB TCS, ty jsou přítomny u většiny gramnegativních patogenů. Mezi další TCS podílejících se na polymyxinové rezistenci pomocí modifikace lipidu A u *P. aeruginosa* jsou ColRS, CprRS, CbrAB a ParRS. ParRS je nezbytný pro aktivaci operonu *arnBCADTEF*, který kóduje všechny enzymy potřebné pro syntézu, transmembránový transport a připojení L-Ara4N (Mohapatra *et al.*, 2021). ParRS také řídí expresi dalších genů zapojených do lékové rezistence včetně genů kódujících efluxní systém MexXY (OprM) a současně downregulaci porinu OprD specifického pro karbapenem (Moffatt *et al.*, 2019). Je pravděpodobné, že tyto TCS reagují na jiné environmentální podněty a aktivují se za různých okolností, avšak všechny aktivují geny modifikující LPS. U *K. pneumoniae* byl nalezen další TCS CrrAB (Mohapatra *et al.*, 2021). Mutace v TCS CrrAB vedou k aktivaci PmrAB prostřednictvím *crrC* (Baron *et al.*, 2016). *Vibrio cholerae* má regulační dvousložkový systém VprAB, ten indukuje modifikaci lipidu A přímou regulací exprese *alm* operonu, který kóduje proteiny nezbytné pro glycinovou modifikaci lipidu A (Huang *et al.*, 2020).

### 3.7.1.1 Dvousložkový regulační systém PhoPQ

Systém PhoPQ kóduje dva proteiny, regulační protein PhoP a membránově umístěnou senzorovou proteinkinázu PhoQ. Zatímco kináza snímá specifický signál z prostředí, konkrétně nízké koncentrace hořčíku a vápníku, kyselého pH nebo přítomnosti CAMP, odpovídající regulátor odezvy zprostředkovává buněčnou odpověď, expresi cílových genů. PhoQ je protein s tyrosinkinázovou aktivitou, který aktivuje PhoP prostřednictvím fosforylace. Aktivní PhoP řídí transkripci sedmigenového operonu *pmrHFIJKLM*, také známého jako *arnBCADTEF*, který se podílí na chemické modifikaci LPS prostřednictvím přidání L-Ara4N k LPS. PhoP může také aktivovat gen *pmrA* buď přímo nebo prostřednictvím proteinového konektoru PmrD. PmrA následně spouští expresi *pmrC*, známého také jako *eptA*, kódující pEtN transferázu, což způsobuje přidání pEtN k LPS (Ayoub Moubareck, 2020). Aktivovaný PhoPQ dále zprostředkovává acylaci, deacylaci a hydroxylaci lipidu A regulovanou geny kódujícími enzymy Pag, PagL a LpxO (Mlynarcik *et al.*, 2019). Dvousložkový systém PhoPQ je popsán například u *K. pneumoniae* a *Salmonella* spp., ale vyskytuje se i u jiných bakterií (Stefaniuk *et al.*, 2019).

Dalším molekulárním determinantem, který hraje klíčovou roli v polymyxinové rezistenci u *K. pneumoniae* je gen *mgrB*. Jedná se o konzervovaný gen o délce 141 nukleotidů, kódující krátký transmembránový protein o 47 aminokyselinách, který je negativním regulátorem systému PhoPQ. Funkční inaktivace nebo mutace MgrB vede k upregulaci PhoPQ a následně zvyšuje transkripci downstream genů zapojených do polymyxinové rezistence (Nang *et al.*, 2021).

### 3.7.1.2 Dvousložkový regulační systém PmrAB

Systém PmrAB kóduje protein s tyrosinkinázovou aktivitou PrmB, který fosforylací aktivuje transkripční regulátor PrmA. Stimuly prostředí, které aktivují PrmB jsou makrofágové fagozomy, trojmocné železo, ionty hliníku a nízké pH. PrmA aktivuje transkripci operonu *pmrHFIJKLM*, který se účastní modifikace LPS přidáním L-Ara4N a také aktivuje expresi operon *pmrCAB* (Ayoub Moubareck, 2020). Gen *pmrC* kóduje pEtN transferázu podobnou EptA, která katalyzuje přidání pEtN k 1'- nebo 4'-fosfátové skupině lipidu A LPS. U *A. baumannii* aktivovaný PmrAB upreguluje také gen *naxD*, což je gen zapojený do biosyntézy galaktosaminu, který je následně přidán zatím neznámým enzymem do 1'-fosfátové pozice lipidu A. Důležité je, že na rozdíl od *Enterobacteriaceae* postrádá *A. baumannii* všechny geny

potřebné pro biosyntézu L-Ara4N (Jeannot *et al.*, 2017). Dvousložkový systém PmrAB mají *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *A. baumannii*, *Yersinia pestis*, *Citrobacter rodentium* a *P. aeruginosa* (Stefaniuk *et Tyski*, 2019; Huang *et al.*, 2020).

Podobné systémy se nacházejí v mnoha bakteriích citlivých na polymyxin, nejsou ale konstitutivně aktivní. Rezistence na polymyxin je často získána prostřednictvím mutací typu „gain-of-function“ v genech kódujících regulační systémy, jako je PhoPQ, MgrB nebo PmrAB, které regulují expresi *pmr (arn)* operonu a *eptA*, což vede ke konstitutivní expresi, a tedy polymyxinové rezistenci (Ledger *et al.*, 2022). Zprávy o takových změnách jsou dostupné pro *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *P. aeruginosa* a *A. baumannii* (Ayoub Moubareck, 2020). Další informace o genech zapojených do modifikace LPS, které přispívají k odolnosti gramnegativních bakterií vůči polymyxinu, jsou podrobněji popsány na jiném místě (Mlynarcik *et Kolar*, 2019).

### 3.7.1.3 Snížení tekutosti LPS

Kromě modifikací L-Ara4N nebo pEtN dochází k deacylaci lipidu A, aby se snížila tekutost LPS a tím i schopnost kationtových peptidů prostupovat vnější membránou. U rodu *Salmonella* systém PhoPQ aktivuje *pagL*, jehož produkt deacyluje lipid A. Dále například v případě *Francisella tularensis* je za deacylaci lipidu A zodpovědný gen *naxD* (Trimble *et al.*, 2016).

### 3.7.2 Ztráta LPS

Nejzajímavější mutací vedoucí k polymyxinové rezistenci je úplná ztráta LPS u patogenu *A. baumannii*, což ji činí odolnou vůči polymyxinům. K tomu dochází v důsledku inzerční inaktivace prvkem *ISAbal1* v biosyntetickém klastru lipidu A zahrnujícího geny *lpxA*, *lpxC* a *lpxD* nebo prostřednictvím spontánních mutací v těchto genech (substituce, delece, posun čtecího rámce). Jakmile je syntéza lipidu A zastavena, polymyxinový cíl již není v buňkách *A. baumannii* dostupný, což vede k velmi vysoké úrovni rezistence (Moffatt *et al.*, 2011; Nang *et al.*, 2021). V důsledku ztráty LPS ztrácí *A. baumannii* také faktory virulence, to má za následek dramatický pokles fitness, což vede k nízké prevalenci izolátů *A. baumannii* rezistentních na polymyxin díky ztrátě LPS v klinickém prostředí (Ayoub Moubareck, 2020). Další důvody nízké prevalence může být také to, že vnější membrána s nedostatkem LPS je vysoce propustná, což zvyšuje bakteriální citlivost vůči dalším antimikrobiálním látkám, jako je rifampicin, cefepim, teikoplanin a azithromycin (Nang *et al.*, 2021). *A. baumannii* získává rezistenci

na polymyxiny také díky nadměrné expresi genů *lpsB*, *lptD* a *vacJ*, které vedou ke snížené fluiditě a zvýšené osmotické rezistenci vnější membrány (Ayoub Moubareck, 2020).

### 3.7.3 Stresové reakce

#### 3.7.3.1 Biofilm

Biofilm je shromáždění mikroorganismů povrchově připojených a uzavřených v extracelulární matrici, která chrání mikroorganismy před negativními vnějšími vlivy včetně antimikrobiálních látek. Tvorba biofilmu je další strategií k získání polymyxinové rezistence. Biofilmy vznikají v reakci na stres, především na ROS a další látky poškozující DNA. Díky architektuře biofilmu jsou bakterie biofilmu výrazně více odolné vůči vysokým koncentracím antibiotik, včetně polymyxinů, než geneticky identické neadherující planktonické bakterie (Mohapatra *et al.*, 2021).

Geny *psrA* a *cbrA* u *P. aeruginosa*, *carR* u *V. cholerae* a *mig-14* u *S. enterica* regulují tvorbu biofilmu a rezistenci na polymyxin B. Je zajímavé, že *psrA* reaguje na kationtové peptidy, vybraná antibiotika i na zvýšení obsahu mastných kyselin a zároveň je aktivátorem  $\sigma$  faktoru stacionární fáze RpoS (Trimble *et al.*, 2016; Mlynarcik *et Kolar*, 2019). Podle studie Azimi *et Lari* z roku 2019 je rezistence na kolistin doprovázená poruchou tvorby biofilmu kvůli ztrátě 47 969 bp genomové oblasti obsahující geny *ppk* a *modA*, které jsou spojeny s produkcí biofilmu u *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonas*. V této studii byla pozorována tvorba biofilmu pouze u kmenů citlivých na kolistin. Naopak u *P. aeruginosa* citlivé na kolistin byla tvorba biofilmu slabá (Azimi *et Lari*, 2019).

#### 3.7.3.2 Tvorba kapsul

Kapsle se vyskytují u některých bakterií přirozeně rezistentních na polymyxiny, například u *Neisseria meningitidis* a *Campylobacter jejuni*. U *N. meningitidis* vede ztráta pouzdra nebo pouzdra a lipopolysacharidu k 10násobnému zvýšení citlivosti na polymyxin B (Baron *et al.*, 2016). Schopnost vylučovat kapsulární polysacharid (CPS) ze svého povrchu má také *K. pneumoniae*. Bylo pozorováno, že *K. pneumoniae* zvyšovala množství CPS, když rostla v přítomnosti polymyxinu B (Rodríguez-Santiago *et al.*, 2021). Zároveň byl akapsulární mutant *K. pneumoniae* citlivější na polymyxin B a vykazoval zvýšenou vazbu polymyxinu B na bakteriální povrch ve srovnání s kapsulární variantou. To naznačuje, že kapsulární polysacharid může zachytit a vázat polymyxiny, rušit jejich vazbu k vnější membráně a tím i jejich baktericidní účinek

(Moffatt *et al.*, 2019). Vazbou CPS k polymyxinům se také snižuje množství léčiva, které se dostane na povrch bakterie buňky, což vede ke zvýšené polymyxinové rezistenci. Základním mechanismem vazby je elektrostatická interakce mezi kationtovými polymyxiny a aniontovými CPS (Olaitan *et al.*, 2014).

Některé regulátory tvorby kapslí, jako je Cpx a Rcs, se účastní rezistence na polymyxiny aktivací efluxní pumpy KpnEF a dvousložkového systému PhoPQ (Baron *et al.*, 2016). Aktivovaný PhoPQ je nezbytný pro indukci *cps* operonu. Rcs přispívá k rezistenci na polymyxin B také regulací exprese genu *ydel*. Syntéza polysacharidové kapsle, sestavená na periférii bakteriální buněčné stěny, která se může připojit k LPS ve vnější membráně gramnegativních bakterií, je také regulována geny *siaD* a *ompA* (Mlynarcik *et Kolar*, 2019).

### 3.7.4 Efflux

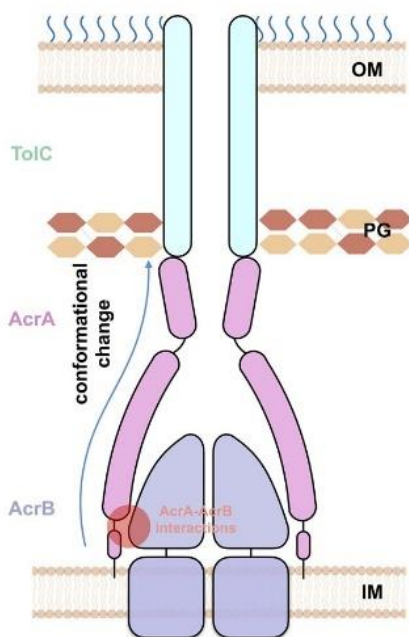
Efluxní pumpy se podílejí na antimikrobiální rezistenci nebo zvyšují úroveň tolerance svou nadměrnou expresí a synergií s jinými mechanismy rezistence. U gramnegativních bakterií se na rezistenci vůči mnoha toxickým látkám nejčastěji podílejí efluxní systémy rodiny RND z anglického Resistance Nodulation Division. Rodina RND jsou vícesložkové pumpy složené z proteinu vnější membrány (OMP), proteinu vnitřní membrány (IMP) a membránového fúzního proteinu (MFP), který prochází periplazmou a spojuje OMP s IMP viz obrázek 4. Trojdílné efluxní pumpy jsou více účinné než jednosložkové efluxní pumpy díky tomu, že odčerpávají léčivo přes vnější membránu ven, zatímco jednosložkové efluxní pumpy (rodina SMR, MFS, MATE a ABC) eliminují léčivo do periplazmatického prostoru, což dává léku šanci difundovat zpět do cytoplazmy buňky (Auda *et al.*, 2020).

RND rodina je klinicky nejvýznamnější, protože je spojena s MDR. Mezi efluxní pumpy RND patří AcrAB-TolC u *E. coli*, *Salmonella* spp. a *K. pneumoniae*, její homology MexAB-OprM, MexCD-OprJ a MexXY-OprM u *Pseudomonas* spp., CmeABC u *Campylobacter* spp., MtrCDE u *Neisseria* spp. a AdeABC u *A. baumannii* (Weston *et al.*, 2018). Mezi další efluxní pumpy zajišťující toleranci k polymyxinům u různých bakteriálních patogenů patří RosAB, KpnEF, VexAB, MtrCDE a NorM (Trimble *et al.*, 2016).

U enterobakterií je operon *acrRAB* kódující efluxní pumpu AcrAB-TolC regulován genem *acrR*, což je místní regulátor. Dalšími vzdálenými regulátory

jsou MarA, SoxS, Rob a RamA (Mmatli *et al.*, 2020). Mutace v regulačních genech jsou zodpovědné za nadměrnou nebo konstitutivní expresi operonu efluxní pumpy AcrAB-TolC, což vede ke zvýšení MIC hodnoty a rozvoji MDR rezistence (Auda *et al.*, 2020).

*K. pneumoniae* nese další efluxní pumpu KpnEF, která patří do rodiny SMR. KpnEF reguluje syntézu kapslí a zprostředkovává rezistenci na různá antibiotika, jako je ceftriaxon, erythromycin, rifampicin a kolistin. Reguluje také svou expresi prostřednictvím regulačního systému Cpx (Baron *et al.*, 2016; Auda *et al.*, 2020).



**Obrázek 4:** Struktura efluxní pumpy AcrAB-TolC. OM – vnější membrána, PG – peptidoglykan, IM – vnitřní membrána. Převzato z Chen *et al.* (2022).

### 3.7.5 Plazmidem zprostředkovaná rezistence

Do konce roku 2015 byla rezistence na kolistin spojena pouze s mutačními a regulačními změnami zprostředkovanými chromozomálními geny. Během rutinního sledování ATB rezistence v Číně byl poprvé identifikován mobilizovaný gen rezistence na kolistin, gen *mcr*, byl nesen konjugativním plazmidem a byl nalezen ve vzorcích z hospodářských zvířat, v izolátech *E. coli* a *K. pneumoniae* (Liu *et al.*, 2016; Ledger *et al.*, 2022).

Přítomnost genů polymyxinové rezistence nesené plazmidy představuje významné riziko kvůli rychlému horizontálnímu přenosu genů (Wang *et al.*, 2018a). Každý *mcr* gen je většinou nesen konjugativním plazmidem s mobilními genetickými

elementy. Gen *mcr-1* je součástí kazety o velikosti 2 600 bp, která se skládá z domnělého promotoru zodpovědného za expresi genu *mcr-1* (1 626 bp) a hypotetického proteinu později identifikovaného jako *pap2* (765 bp) (Mmatli *et al.*, 2022). Samotný gen *mcr-1* je často lemován inzerční sekvencí IS*Apl1* a genem *nikB* v tomto pořadí. Předpokládá se, že IS*Apl1* (člen rodiny IS30) je klíčovou složkou při mobilizaci genu *mcr-1* (Dalmolin *et al.*, 2018). Na mobilizaci kazety s *mcr-2* se podílí elementy IS1595. Gen *mcr-3* je lemován IS*Kpn40* a na mobilizaci *mcr-4* se podílí element IS5. Gen *mcr-8* je obvykle lemován IS903 stejně jako *mcr-9* a *mcr-10* (Mmatli *et al.*, 2022). Většina *mcr* genů byla mobilizována pouze jednou a následně se rozšířily po světě (Martiny *et al.*, 2022). Výjimkou je gen *mcr-1*, který se vyskytuje na různých plazmidech. Bylo popsáno více než 20 typů plazmidů nesoucích *mcr-1*. Mezi převládající typy replikonů patří IncX4, IncI2 a IncHI2 (Liu *et al.*, 2023).

Byly popsány případy koexistence dvou plazmidů nesoucích *mcr* v jednom bakteriálním izolátu. Ovšem MIC hodnota pro kolistin u izolátů nesoucích více než jeden *mcr* gen v různých plazmidech nebyla zvýšena (Dalmolin *et al.*, 2018). Hlavním problémem u *Enterobacteriaceae* jsou ESBL typu CTX-M a plazmidové AmpC beta-laktamázy s KPC karbapenamázy, které se často vyskytují na plazmidu s *mcr-1* genem (Livermore *et Woodford*, 2006; Wang *et al.*, 2018a). Některé plazmidy nesoucí *mcr-1* nesou další geny kódující rezistenci vůči klinicky významným antibiotikům jako jsou aminoglykosidy, chinolony, fosfomycin, sulfonamidy a tetracykliny (Poirel *et al.*, 2017). Přítomnost *mcr* genů na multirezistentních plazmidech je velice znepokojivá, protože použití jiných antimikrobiálních látek může selektivně podporovat růst izolátů nesoucích *mcr* geny a jejich následné šíření s potenciálem vyvinout panrezistenci (Ayoub Moubareck, 2020; Hussein *et al.*, 2021).

Geny *mcr* kódují vnitřní membránou ukotvený protein s N koncovou doménou s pěti hydrofobními transmembránovými  $\alpha$ -helixy vedle C koncové periplazmatické katalytické domény (Liu *et al.*, 2023). MCR protein je homologní s enzymem pEtN transferáza zapojeným do dráhy modifikace lipidu A v periplazmatickém prostoru (Mohapatra *et al.*, 2021). Enzym pEtN transferáza funguje tak, že k záporně nabitě 4' fosfátové skupině lipidu A přidá „ping-pong“ mechanismem kladně nabitou skupinu pEtN, což vede k nižší vazebné afinitě kolistinu k cílovému místu (Mmatli *et al.*, 2022).

Expres *mcr-1* zvyšuje MIC polymyxinu čtyř- až osminásobně, jediný krok získání plazmidu konjugací nebo transformací může učinit citlivé bakterie odolnými vůči polymyxinům. Od první zprávy o *mcr-1* bylo globálně hlášeno dalších devět *mcr* homologů (*mcr-2* až *mcr-10*) kódovaných na různých plazmidech a široce distribuovaných v *Enterobacteriaceae* (Mohapatra *et al.*, 2021). Ačkoli všech 10 *mcr* genů kóduje enzymy pEtN transferázy obsahující transmembránové i katalytické domény, podobnost jejich aminokyselinové identity ve srovnání s *mcr-1* se podstatně liší. To naznačuje, že pocházejí z různých genetických zdrojů (Ledger *et al.*, 2022). Zdá se, že exprese plazmidových *mcr* genů je do značné míry řízena podobně, jako exprese chromozomálně lokalizovaných genů, tj. TCS (Moffatt *et al.*, 2019).

### 3.8 Náklady na fitness

Získání plazmidů nesoucích *mcr-1* má příznivý efekt na hostitele, protože zlepšuje přežití bakterií v přítomnosti kolistinu. Expres genu *mcr-1* vede k inkorporaci MCR-1 do bakteriální membrány a fosfoethanolaminové modifikaci LPS. Expres zároveň způsobuje náklady na fitness tím, že zvyšuje energetickou zátěž, zhoršuje buněčný růst a snižuje celkové fitness bakterie, což se projevuje v prostředí bez přítomnosti kolistinu, kdy citlivé kmeny překonávají kmeny rezistentní. Náklady na fitness u bakterií nesoucí *mcr-1* jsou druhově specifické. Bylo také pozorováno, že nadměrná expres *mcr-1* vede ke změnám v architektuře vnější membrány a způsobuje únik cytoplazmy, což vede k buněčné smrti (Mmatli *et al.*, 2022).

Plazmidy nesoucí *mcr-1* se liší od jiných rezistencí zprostředkovaných plazmidem, jako je například gen rezistence na beta-laktam, svým negativním dopadem na fitness bakterií. Přesto je *mcr-1* globálně rozšířen. Pro přežití a široké rozšíření je nutné udržení nízkého počtu kopií plazmidu pomocí PcnR (represor počtu kopií plazmidu) a relativně vysokého konjugačního přenosu pro perzistenci plazmidu *mcr-1* (Liu *et al.*, 2023). Pro snížení toxicity plazmidu nesoucího *mcr-1* dochází ke kompenzační adaptaci mutacemi. Při odstranění selektivního tlaku, kolistinu, jsou plazmidy nesoucí *mcr-1* méně udržované a je možná úplná eliminace *mcr-1* genu z populace (Mmatli *et al.*, 2022).



### 3.9 Varianty *mcr* genu

Detekce genu *mcr-1* vedla k vědeckému zájmu identifikovat jeho varianty. V současnosti má *mcr-1* 37 variant, tedy *mcr-1.1* až *mcr-1.37* (NCBI, 2024a). V roce 2016 Xavier *et al.* popsal gen *mcr-2* u *E. coli* v Belgii a do roku 2023 bylo identifikováno 35 variant (*mcr-2.1* až *mcr-2.35*), tyto varianty jsou velmi podobné, liší se přibližně v 44 až 211 nukleotidech (Xavier *et al.*, 2016; Shahzad *et al.*, 2023). Pokud jde o tento enzym, Národní Centrum pro Biotechnologické Informace popisuje osm podtypů MCR-2 (NCBI, 2024b). Yin *et al.* v Číně v roce 2017 poprvé identifikovali *mcr-3* u *E. coli* (Yin *et al.*, 2017). Gen *mcr-3* má 42 variant, které se opět liší pouze o několik nukleotidů (Shahzad *et al.*, 2023; NCBI, 2024c). V Itálii v roce 2017 Carattoli *et al.* detekovala gen *mcr-4* ze *S. enterica* sérovaru *Typhimurium* (Carattoli *et al.*, 2017). Gen *mcr-4* má 8 variant (NCBI, 2024d). V roce 2017 byl v Německu objeven gen *mcr-5* v izolátu *S. enterica* v sérovaru *Paratyphi B* a gen *mcr-6*, který byl objeven ve Velké Británii u kmene *Moraxella pluranimalium* (AbuOun *et al.*, 2017; Borowiak *et al.*, 2017). Zatímco *mcr-5* má 5 variant, gen *mcr-6* žádnou subvariantu nemá (Gogry *et al.*, 2021; NCBI, 2024e; NCBI, 2024f).

V Číně byly v roce 2018 objeveny geny *mcr-7* a *mcr-8* v izolátech *K. pneumoniae* (Wang *et al.*, 2018b; Yang *et al.*, 2018). Stejně jako *mcr-6* ani *mcr-7* nemá žádné subvarianty (NCBI, 2024g), kdežto gen *mcr-8* se vyskytuje v 5 variantách (Gogry *et al.*, 2021). V databázi NCBI jsou uvedeny čtyři varianty (NCBI, 2024h). Ve státě Washington byl v roce 2019 objeven gen *mcr-9* v izolátu *Salmonella typhimurium* a od té doby byl tento gen zaznamenán ve třech subvariantách (Carroll *et al.*, 2019; Gogry *et al.*, 2021; NCBI, 2024i). Naposledy byl objeven gen *mcr-10* v Číně v kmeni *Enterobacter roggkampii* a dodnes bylo zaznamenáno jeho 5 variant (Wang *et al.*, 2020a; NCBI, 2024j).

Analýza fylogenetického stromu odhalila, že MCR-1 sdílí vysokou podobnost aminokyselinové sekvence s MCR-2 (81 %) a MCR-6 (83 %), které spadají do jedné podskupiny. Nicméně MCR-3 (32 %), MCR-4 (34 %), MCR-7 (35 %), MCR-8 (31 %), MCR-9 (36 %) a MCR-10 (36 %) tvoří další podskupinu díky své aminokyselinové homologii. MCR-5 (36 %) patří do samostatné podskupiny kvůli své nižší aminokyselinové homologii ve srovnání s ostatními členy (Liu *et al.*, 2023).

### 3.10 Globální epidemiologie *mcr* genů

Hlavním bakteriálním nositelem *mcr* genů jsou *Enterobacteriaceae*. U *E. coli* byly detekovány geny *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* a *mcr-9*, které byly nejčastěji neneseny plazmidem IncI2. *K. pneumoniae* je nositelkou *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-7*, *mcr-8* a *mcr-9* genů a nejrozšířenějším plazmidem je IncX4. U *S. enterica* byly identifikovány geny *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* a *mcr-9*, většina genů byla detekována na plazmidu typu IncHI2, následovaný IncI2 a IncX4. U *E. cloacae* byl identifikován *mcr-9* a u *E. roggkampii* *mcr-10*. Gen *mcr-6* se vyskytuje výhradně u *Moraxella* spp. Geny *mcr* byly zaznamenány také u *Shigella sonnei*, *Escherichia fergusonii*, *Kluyvera ascorbata*, *Klebsiella aerogenes*, *Cronobacter sakazakii*, *Raoultella ornithinolytica*, *P. aeruginosa* a v dalších rodech, jako je např. *Acinetobacter*, *Citrobacter* a *Leclercia* (Luo *et al.*, 2020; Ledger *et al.*, 2022; Mmatli *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2023). Studie souhrnně popisují *mcr* geny u různých bakteriálních kmenů a více než 27 bakteriálních druhů (Elbediwi *et al.*, 2019).

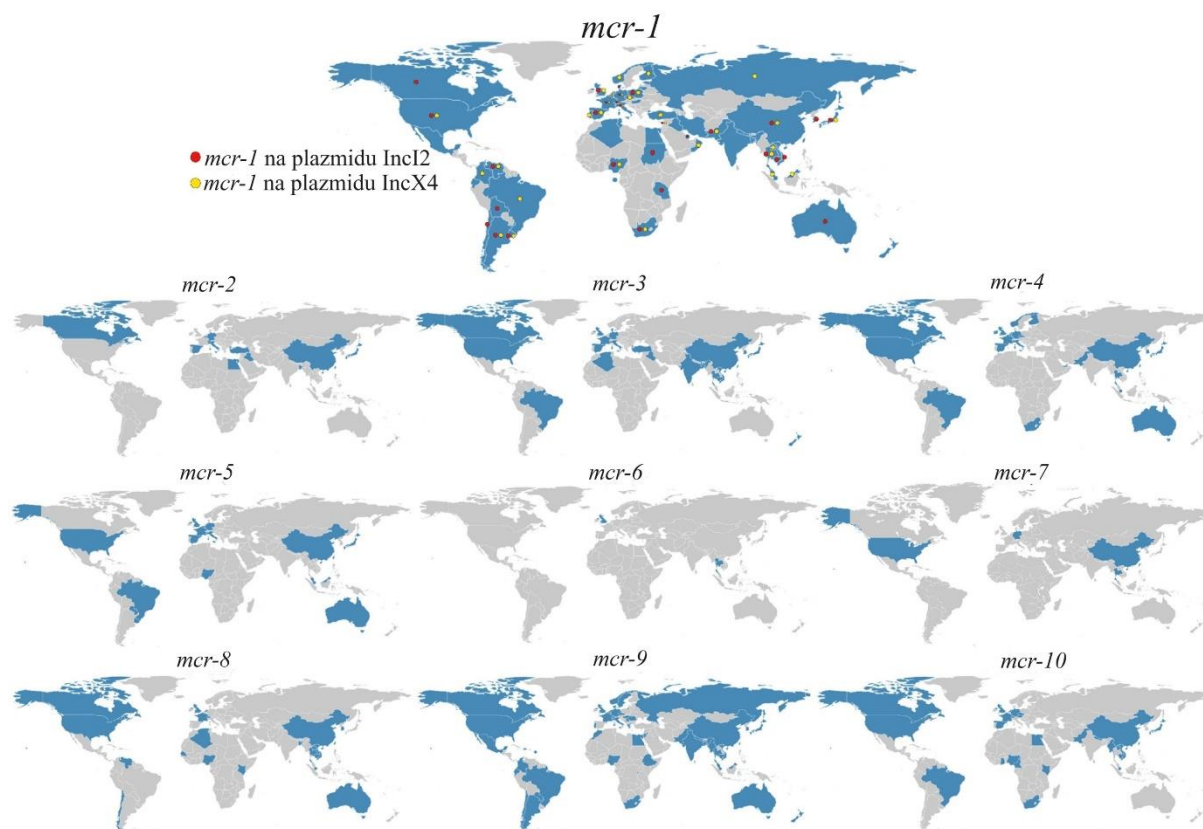
Od prvního záchytu *mcr-1* v Číně se plazmidem zprostředkovaná polymyxinová rezistence šířila ze zvířat na člověka a zároveň do sousedních zemí jihovýchodní Asie (Laos, Thajsko) a dál do Afriky (Nigérie), kde je kolistin hojně využíván v živočišné výrobě (Arcilla *et al.*, 2016). V současné době je hlášen záchyt *mcr* genů z více než 72 zemí na šesti různých kontinentech (Asie, Evropa, Severní Amerika, Jižní Amerika a Oceánie s výjimkou Antarktidy). Geny byly izolovány ze zvířat, lidí a z životního prostředí. V lidských vzorcích jsou *mcr* geny často izolované z *E. coli*, *K. pneumoniae* a *S. typhimurium* ze vzorků převážně stolice a moči. U zvířat patří mezi nejběžnější vzorky výkaly a maso, které běžně obsahuje *E. coli*, *K. pneumoniae* a *Salmonella* spp. (Mmatli *et al.*, 2022).

Celkově je prevalence *mcr-1* pozitivních izolátů ve většině zemí nízká (<5 %), vysoká prevalence (10 – 40 %) byla pozorována v několika asijských zemích, zejména v Číně a Vietnamu. V Evropě například v Nizozemsku, Francii, Itálii a Německu (Mmatli *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2023). I když je výskyt *mcr* genů globální, jednotlivé varianty jsou celosvětově nerovnoměrně distribuované. V určitých oblastech se vyskytují jen některé *mcr* varianty viz obrázek 5 (Wang *et al.*, 2018a; Martiny *et al.*, 2022).

Po prvním záchytu *mcr-2* v Belgii byl následně detekován také v Číně, Íránu, Egyptě, Bangladéši a Velké Británii. Gen *mcr-2* není globálně rozšířený, ale je široce

rozšířen v celé čeledi *Enterobacteriaceae*. V rámci *Enterobacteriaceae* je široce rozšířen také *mcr-3* a jeho varianty, ty byly detekovány v 18 zemích s největšími počty v Kolumbii a Thajsku. Záchyt genu *mcr-4* je hlášen z Itálie, Španělska, Belgie, Velké Británie a Číny (Mmatli *et al.*, 2022). Sekvence MCR-4 byla detekována u *S. enterica*, *E. cloacae*, *Shewanella* spp., *A. baumannii* a *Acinetobacter nosocomialis* (Khedher *et al.*, 2020). I přes ne příliš dobré šíření genu *mcr-5* v rámci čeledi *Enterobacteriaceae* byl *mcr-5* hlášen z deseti zemí, kdy byl nejrozšířenější v Japonsku, Německu a Francii (Mmatli *et al.*, 2022). Nejméně rozšířený je gen *mcr-6*, který byl zachycen pouze ve Francii, v Anglii a Thajsku (Martiny *et al.*, 2022). Varianta *mcr-7* je hlášena z Thajska, Brazílie a Číny, zároveň byla tato varianta identifikována pouze u *E. coli* a *K. pneumoniae*. Gen *mcr-8* byl hlášen z osmi zemí, přičemž v Číně je nejrozšířenější (Mmatli *et al.*, 2022). Sekvence MCR-8 byla identifikována pouze u *K. pneumoniae* a u *R. ornithinolytica* (Khedher *et al.*, 2020). V rámci *Enterobacteriaceae* je široce rozšířen *mcr-9*, zejména v rámci *Enterobacter* spp., *Citrobacter telavivum*, *Salmonella* spp., *K. pneumoniae* a *E. coli*. Nejvíce záchytů *mcr-9* je ve Švédsku a Thajsku a v dalších sedmi zemích (Mmatli *et al.*, 2022). Od první identifikace *mcr-10* v roce 2020 v klinickém kmeni *E. roggenkampii* byl nalezen u mnoha druhů *Enterobacteriaceae* v mnoha zemích, což naznačuje, že již dosáhl široké distribuce (Hussein *et al.*, 2021).

Nejvíce variant *mcr* genů je hlášeno z Číny (*mcr-1*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9* a *mcr-10*). Z Thajska je hlášeno šest *mcr* genů (*mcr-1*, *mcr-3*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8* a *mcr-9*). Další země jako USA, Turecko, Španělsko, Nigérie, Korea, Japonsko, Itálie, Francie, Anglie, Kambodža, Brazílie, Belgie, Bangladéš a Česká republika hlásili výskyt tří až čtyř *mcr* genů s tím, že vždy byla přítomná varianta *mcr-1* (Mmatli *et al.*, 2022).



**Obrázek 5:** Geografická distribuce genů *mcr-1* až *mcr-10*. Modře zvýrazněné oblasti, kde byl identifikován výskyt *mcr* genu. Převzato a upraveno podle Liu *et al.* (2023).

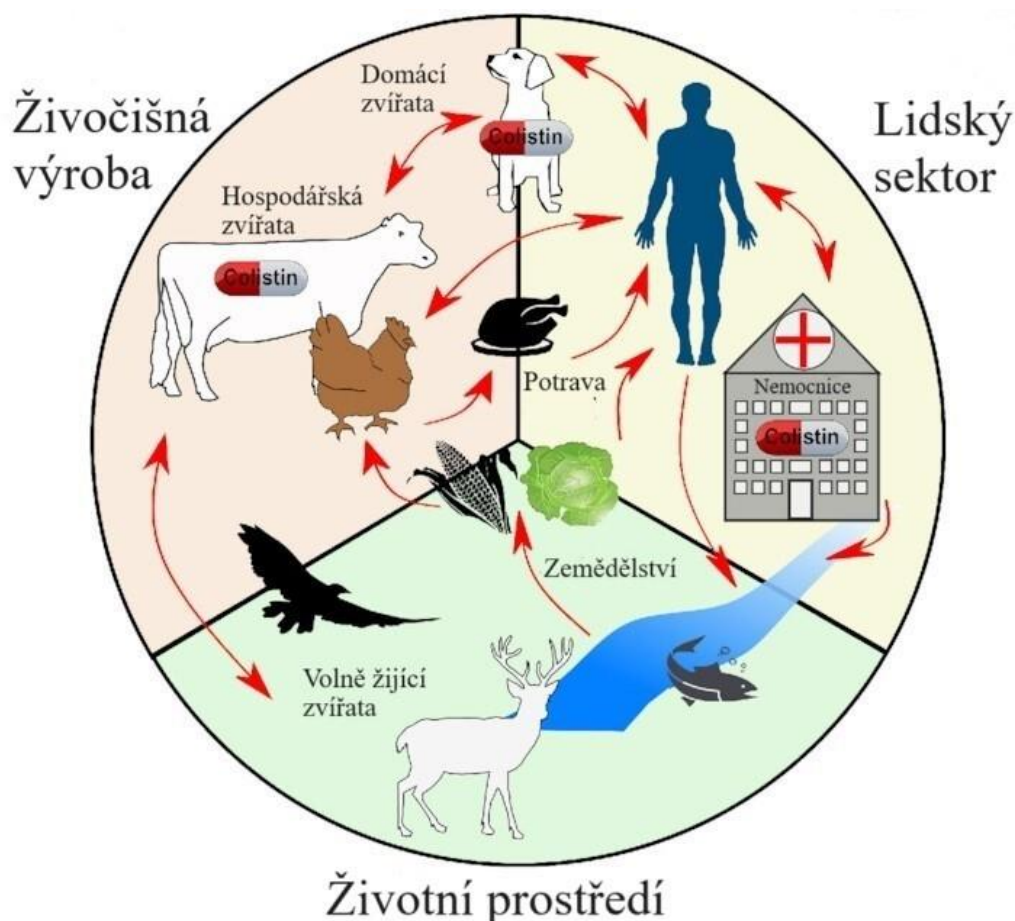
### 3.11 Šíření *mcr* genů

Plazmidy nesoucí *mcr-1* byly identifikovány v potravinách, v syrovém mase, čerstvé zelenině a ovoci, ve vzorcích povrchů z veřejné dopravy, ve vodním prostředí (řeky i moře), v nemocniční odpadní vodě, v čistírnách odpadních vod, ve vodních studnách venkovských oblastí, u infikovaných i kolonizovaných lidí, ve volně žijících ptácích a jiných zvířatech zejména v hospodářských, u kuřat, krůt, prasat, selat, skotu a telat, ale také například u mouchy domácí (Ledger *et al.*, 2022; Shahzad *et al.*, 2023).

Ve vodním prostředí byly detekovány všechny dosud popsané varianty *mcr* genů, což naznačuje, že vodní prostředí je hlavním rezervoárem a zdrojem *mcr* genů. Městské čistírny odpadních vod jsou jedním z nejběžnějších rezervoárů genů antibiotické rezistence proti různým třídám antibiotik (Khedher *et al.*, 2020). Velice znepokojivý byl záchyt *mcr-1* genu v upravené pitné vodě v Číně z roku 2018. Nedávno byl tento gen detekován také v pitné vodě v Německu (Cherak *et al.*, 2021). Podle nedávného screeningu je nejvyšší 22% prevalence výskytu *mcr-1* v životním prostředí, především

v akvakultuře a vodním prostředí. Následují zvířata s 11% prevalencí, potraviny s 5,4% prevalencí a lidé s 2,5% prevalencí (Ayoub Moubareck, 2020).

Hybnou silou globálního šíření *mcr* genů je obchod s potravinovými zvířaty a masem. Významný podíl má také globální pohyb kolonizovaných a infikovaných lidí (Wang *et al.*, 2018a). K přenosu *mcr* genů na člověka dochází přímým kontaktem s domácím nebo hospodářským zvířetem (Shahzad *et al.*, 2023). Největšímu riziku získání rezistentních mikroorganismů jsou vystavení lidé s neustálým kontaktem se zvířaty jako jsou farmáři a veterináři. Hlavním místem přenosu jsou jatka a farmy, kde se bakterie rezistentní na kolistin přenáší ze zvířat na člověka, ale také do potravinového řetězce a životního prostředí prostřednictvím odpadních vod viz obrázek 6 (Binsker *et al.*, 2022).



**Obrázek 6:** Možné cesty přenosu *mcr* pozitivních enterobakterií. Rezistentní izoláty se mohou šířit různými prostředí, jak je označeno červenými šipkami. Převzato a upraveno podle Binsker *et al.* (2022).

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

Biologický materiál použitý k testování pocházel z bakteriologické sbírky Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Celkem bylo testováno 103 klinických izolátů enterobakterií rezistentních ke kolistinu. Mezi tyto izoláty patřilo 31 kmenů *Enterobacter bugandensis*, 16 kmenů *Enterobacter kobei*, 14 kmenů *E. cloacae*, 8 kmenů *Enterobacter asburiae*, 4 kmeny *Enterobacter hormachei*, 1 kmen *Enterobacter ludwigii*, 1 kmen *E. roggenkampii*, 2 kmeny *E. coli*, 15 kmenů *K. pneumoniae*, 3 kmeny *Klebsiella oxytoca*, 3 kmeny *Klebsiella variicola*, 1 kmen *K. aerogenes*, 3 kmeny *Salmonella enteritidis* a 1 kmen *Citrobacter freundii*.

### 4.2 Seznam použitých chemikálií

- Agaróza pro elektroforézu DNA (SERVA, Německo; kat. č. 11404.05)
- Barvivo SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA; kat. č. S33102)
- Combi PPP Master Mix (Top-Bio Praha, ČR; kat. č. C210)
- Deionizovaná voda (dH<sub>2</sub>O)
- DNA marker molekulové hmotnosti o velikosti 200-1500 bp (Top-Bio, ČR; kat. č. D110)
- Forward/reverse primery (East Port Praha; v tabulce)
- PCR Loading buffer (Top-Bio, ČR; kat. č. P048)
- PCR Ultra H<sub>2</sub>O (Top-Bio, ČR; kat. č. P340)

### 4.3 Seznam použitých souprav

- NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Německo; kat. č. 740952.50)
- QIAseq FX DNA Library prep Kit (Qiagen, Německo, kat. č. 180477)

### 4.4 Seznam použitých roztoků

- 10x TBE pufr (Tris-Borate-EDTA; pH 8,3; Bio-Rad, USA; kat. č. 1610770)
- 1x TBE pufr (Tris-Borate-EDTA): 70 ml zásobního roztoku 10x TBE pufru zředit v 630 ml dH<sub>2</sub>O

## 4.5 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Automatické pipety v rozmezí objemu od 0,5 µl do 1000 µl (Thermo Fischer Scientific)
- Centrifuga MC-24 (Benchmark Scientific)
- Centrifuga Spectrafuge 24D (Labnet)
- Dokumentační systém Azure 200 (Azure Biosystems)
- Elektroforetická komora multiSUB Choice (Clever Scientific)
- Geneious Prime (Biomatters, Nový Zéland)
- Hlubokomrazicí box (−80 °C) MDF-U53V (Sanyo)
- Inokulační klíčky 1 µl, sterilní (Biologix)
- Laboratorní váha MXX-5001 (Denver Instruments)
- Laminární box MSC-Advantage (Thermo Fischer Scientific)
- Mikrovlnná trouba (Daewoo)
- Minicentrifuga (Clever Scientific)
- NanoPhotometer NP80 (Implen)
- Pipetovací nástavec Pipetus (Hirschmann)
- Sterilní špičky 0,5–5 µl; 2–20 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl (Alpha Laboratories)
- Termoblok Dri-Bath type 16500 (Thermolyne)
- Termocycler TRIO (Biometra)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Inc.)
- Zdroj stejnosměrného elektrického napětí MP-300 V (Major Science)

## 4.6 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

### 4.6.1 Sekvenční analýza

Při této analýze bylo z NCBI (poslední přístup 31. ledna 2024) staženo a prozkoumáno 800 nukleotidových sekvencí, včetně 114 referenčních sekvencí kódujících enzymy MCR. Konkrétně se jednalo o 480 nukleotidových sekvencí kódujících gen *mcr-1*, 22 sekvencí pro *mcr-2*, 185 sekvencí pro *mcr-3*, 23 sekvencí pro *mcr-4*, 17 sekvencí pro *mcr-5*, tři sekvence pro *mcr-6*, tři sekvence pro *mcr-7*, 23 sekvencí pro *mcr-8*, 28 sekvencí pro *mcr-9* a 16 sekvencí pro *mcr-10*.

Sekvence nukleotidů a aminokyselin byly srovnány pomocí algoritmu MUSCLE (s výchozím nastavením) (Edgar, 2004), který je součástí programu Geneious Prime.

K analýze aminokyselinových substitucí byly použity proteinové statistiky generované programem Geneious jako součást zarovnání sekvencí.

#### 4.6.2 Navrhování primerů pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR)

Primery byly navrženy na základě homologních nukleotidových sekvencí pomocí programu Primer3 (Geneious Prime) tak, aby amplifikovaly následujících 10 genů: *mcr-1* až *mcr-10*. Primery byly navrženy podle postupu popsaného v naší předchozí studii (Mlynarcik *et al.*, 2021). Pro vyhodnocení specifity navržených párů primerů byly nejprve provedeny *in silico* vazební testy. Všechny primery byly testovány proti specifickým nukleotidovým sekvencím kódujícím MCR enzymy pomocí testu s možností uložených primerů v Geneious programu.

Sedm párů primerů bylo syntetizováno firmou East Port Praha (Česká republika) a testováno na 103 klinických izolátech pomocí PCR. Kromě toho byly navrženy čtyři další páry primerů (které nebyly experimentálně testovány) pro detekci zbývajících variant genů *mcr*. Podrobné specifikace použitých primerů jsou uvedeny v tabulce 3.

#### 4.6.3 Izolace bakteriální DNA

Za účelem izolace genomové DNA a její následné detekce na přítomnost *mcr* genů pomocí PCR byly jednotlivé izoláty naneseny na krevní agar (Oxoid s.r.o., ČR) a inkubovány aerobně při 37 °C po dobu 16 hodin.

Izolace DNA byla provedena důkladným suspendováním kolonie každého bakteriálního vzorku pomocí bakteriologické kličky ve 100 µl deionizované vody. Vzorky byly inkubovány při 95 °C po dobu 10 minut v termobloku, následoval tepelný šok, kdy byly vzorky zmrazeny v hlubokomrazícím boxu na –80 °C po dobu 10 minut. Pro rozmrznutí byly vzorky umístěny zpět do termobloku (95 °C) na 2 minuty. Následně byly vzorky centrifugovány po dobu 5 minut při 13 000 RPM, což vedlo k oddělení peletu a supernatantu obsahujícího uvolněnou bakteriální DNA. Množství vyizolované genomické DNA bylo stanoveno spektrofotometricky pomocí NanoPhotometru (Implen).

#### 4.6.4 PCR amplifikace DNA

PCR reakční směs byla připravena tak, aby obsahovala všechny nezbytné reagenty pro úspěšnou amplifikaci templátové DNA. PCR reakční směs obsahovala optimalizovaný reakční pufr Combi PPP Master Mix (Top-Bio), ve kterém jsou přítomny hořčičné ionty a *Taq* DNA polymeráza. Dále obsahovala primery



(forward/reverse), templátovou DNA a PCR vodu. Tato směs byla připravena ve větším objemu podle počtu vzorků a následně byla rozdělena do PCR mikrokumavek po 11,5  $\mu$ l. Do každé mikrokumavky byl přidán 1  $\mu$ l templátové bakteriální DNA (Tabulka 1). Po důkladném centrifugování byla směs vložena do PCR termocycleru s předem nastavenými časovými a teplotními podmínkami (Tabulka 2). Pro kontrolu správného průběhu PCR reakce byla použita pozitivní a negativní kontrola (použití sterilní dvakrát destilované vody místo DNA).

V této práci bylo použito celkem devět pozitivních kontrol v podobě genomové DNA obsahující geny *mcr* (*mcr-1* až *mcr-9*, laskavý dar Dr. Dolejské). Nebyla k dispozici pozitivní kontrola pro variantu genu *mcr-10*.

**Tabulka 1:** Složení PCR směsi pro jednu PCR reakci.

PCR reagencie	Objem pro jednu reakci [ $\mu$ l]
Combi PPP	6,25
PCR voda	5,00
Forward primer	0,13
Reverse primer	0,13
Templátová DNA	1,00
<b>Celkem</b>	<b>12,50</b>

**Tabulka 2:** Teplotní a časové podmínky PCR reakce.

Krok PCR	Teplota [ $^{\circ}$ C]	Doba trvání	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94	1 min	1
Denaturace	94	15 s	32
Annealing	54-58	15 s	
Elongace	72	1 min na 1 kb	
Závěrečná elongace	72	7 min	1
Chlazení	4	$\infty$	-

**Tabulka 3:** Sekvence primerů použitých pro detekci *mcr* genů pomocí PCR.

Název primeru	Detekovaný gen	Nukleotidová sekvence (směr 5' → 3')	Délka (počet bází)	Velikost amplikonu (bp)	T <sub>m</sub> [°C]	Reference
P1	<i>mcr-1,2,6</i>	GTCGATACCGCCAAATACC; GTTCTTTTGGTGCAAAGGC	19/19	559	54	(Mlynarcik <i>et</i> Kolar, 2019)
P2	<i>mcr-3,5</i>	GCTGYAAAGGCGTCTGYGA; TGATCGGARACGTASAGCA	19/19	382	56	(Mlynarcik <i>et</i> Kolar, 2019)
P3	<i>mcr-3,7</i>	TGCATGTTYTCCAAYATGGGG; CGRATGGTRTTGTCATAGGTGTT	21/23	416	58	(Mlynarcik <i>et</i> Kolar, 2019)
P4	<i>mcr-4</i>	GATCCGAAGCTGTGTTCTG; GGCGCACCATGTAAATACA	19/19	380	54	(Mlynarcik <i>et</i> Kolar, 2019)
P5	<i>mcr-8</i>	AACCAACCCCTATCTTTCCA; ATATATTCCGCTTTCCCCCA	20/20	634	54	Tato studie
P6	<i>mcr-9</i>	GCCAGGTGATAAGCTTGTC; ACAGGTTGTCGTGGGAATA	19/19	440	53	Tato studie
P7	<i>mcr-10</i>	GTTTTACTTCTGGCACTCGT; GAACGCATATTCCTGAACGA	20/20	779	54	Tato studie
P8	<i>mcr-1,2,6</i>	ACCATGCTMCAAAATGCC; TGTTCTTTTGGYGCAAAGGC	18/20	1157	55	Tato studie
P9	<i>mcr-3</i>	TTTTGGAAGGAGAACGATGG; AACTTGGCAATCATCTCTGC	20/20	356	54	Tato studie

**Tabulka 3:** Pokračování

Název primeru	Detekovaný gen	Nukleotidová sekvence (směr 5' → 3')	Délka (počet bazí)	Velikost ampliconu (bp)	T <sub>m</sub> [°C]	Reference
P10	<i>mcr-3</i>	YGYCAGCTACACCATGATGA; GCTGGTGAAGGSRTTGGTCTC	20/21	526	60	Tato studie
P11	<i>mcr-7</i>	AAGGTGAATTTGTTGCTGGT; ACTGTTGTTGGTCTCCACTA	20/20	300	52	Tato studie

Pro degenerované primery: M = A nebo C; R = A nebo G; S = G nebo C; Y = C nebo T.

#### 4.6.5 Elektroforetická separace PCR produktů

Získané PCR produkty byly separovány pomocí horizontální gelové elektroforézy v 1% agarózovém gelu. Pro přípravu gelu bylo rozeřáno 1,2 g agarózy (SERVA) ve 110 ml destilované vody a 12 ml 10x TBE pufru (Bio-Rad). Po ochlazení na přibližně 50 °C bylo do gelu přidáno 5 µl barviva SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) k vizualizaci DNA v gelu. Připravený 1% agarózový gel byl nalit do elektroforetické vaničky, kde ztuhnul. Gel byl následně přelit 1x TBE pufrem, aby byly elektrody elektroforetické komůrky ponořené. V první jamce gelu bylo aplikováno 10 µl DNA markeru molekulové hmotnosti o velikosti 200–1 500 bp (Top-Bio) smíchaného se 3 µl PCR loading bufferu (Top-Bio) pro vizualizaci pohybu DNA markeru v gelu. Do ostatních jamek byly aplikovány PCR produkty o objemu 12 µl.

Elektroforetická separace PCR produktů byla provedena po připojení elektrod ke zdroji jednosměrného elektrického napětí (MP-300 V; Major Science) při napětí 105 V po dobu 55 minut. Po skončení separace byla DNA v gelu vizualizována pomocí zobrazovacího systému Azure 200 (BioTech, ČR) a velikost jednotlivých PCR produktů byla určena pomocí markeru molekulové hmotnosti.

#### 4.6.6 Sekvenování celého genomu, anotace a molekulární analýza genů *mcr* a beta-laktamáz

Genomová DNA ze 70 enterobakterií byla extrahována a přečištěna pomocí komerčního kitu (NucleoSpin® Tissue, Macherey-Nagel, Německo). Knihovna fragmentů byla vytvořena pomocí soupravy QIAseq FX DNA library prep kit (všechny tyto postupy byly provedeny v laboratoři Dr. Dolejské) a následně sekvenována pomocí platformy Illumina NovaSeq 6000 podle pokynů výrobce. Sekvenování celého genomu bylo provedeno jako komerčně dostupná služba (Institute of Applied Biotechnologies, Olomouc, Česká republika).

K určení přítomnosti genů *mcr* jsme použili náš soubor dat obsahující 25 různých genů *mcr* obsahujících různé varianty *mcr-1* až *mcr-10* prostřednictvím funkce nazvané "anotace z databáze" zabudované do softwarového balíčku Geneious Prime. Pro anotaci genů *mcr* ve všech 70 genomech byl použit práh 50 % identity. Následně byly sekvence vyhledávány ve veřejných databázích sekvencí pomocí BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool program; verze 2.15.0; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>; přístup 6. března 2024).

V případě identifikace beta-laktamáz byla použita naše další interní databáze vytvořená v programu Geneious Prime, která obsahovala 434 genů beta-laktamáz, se stejným prahem podobnosti. Shody sekvencí aminokyselin byly následně identifikovány pomocí funkce BLDB BLAST (<http://www.bldb.eu:4567/>).

#### **4.6.7 Konstrukce fylogenetického stromu**

Fylogenetický strom byl vytvořen za pomoci softwaru Geneious Prime, který využíval algoritmus PhyML (Guindon *et al.*, 2010) s použitím modelu Le a Gascuel. Fylogenetický strom byl získán porovnáním 800 aminokyselinových sekvencí enzymů MCR.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Designování primerů a jejich testování

Cílem práce bylo navrhnout primery pro detekci všech dosud popsáných variant genů *mcr* vyskytujících se u různých bakterií. Při hledání genů *mcr* v databázi NCBI bylo identifikováno 17 bakteriálních rodů, konkrétně rod *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Mixta*, *Moraxella*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shewanella* a *Shigella*, které tyto enzymy nesou. Pomocí Primer 3 (implementovaného v Geneious Prime) bylo vytvořeno celkem 11 specifických párů primerů (Tabulka 3), z nichž čtyři páry primerů byly popsány v naší předchozí publikaci (Mlynarcik *et* Kolar, 2019).

Tyto dříve popsané primery P1 dokázaly zachytit všech 37 specifických variant genu *mcr-1* (*mcr-1.1* až *mcr-1.37*), sedm z osmi specifických variant genu *mcr-2* (všechny kromě *mcr-2.7*) a jednu alelickou variantu genu *mcr-6* (*mcr-6.1*). Naše *in silico* analýza zahrnující referenční a jiné nukleotidové sekvence kódující geny *mcr* však ukázala, že tento primer je schopen detekovat 479 ze 480 nukleotidových sekvencí kódujících geny *mcr-1*, 20 z 22 sekvencí *mcr-2* a tři ze tří v případě genů *mcr-6*. Nový lépe navržený primer P8 byl schopen detekovat celou tuto sadu námi analyzovaných sekvencí.

Primer P2 byl schopen zachytit 33 ze 42 alelických variant referenčních genů *mcr-3* (devět nedetekovaných variant: *mcr-3.15*, *mcr-3.27*, *mcr-3.31*, *mcr-3.32*, *mcr-3.34*, *mcr-3.35*, *mcr-3.37*, *mcr-3.38* a *mcr-3.42*) a všech pět podtypů genu *mcr-5* (*mcr-5.1* až *mcr-5.5*). Další primer P3, detekoval 41 ze 42 variant genu *mcr-3* (všechny kromě genu *mcr-3-like* s přístupovým kódem MZ031277.1 do GenBank) a jednu alelickou variantu referenčního genu *mcr-7* (*mcr-7.1*). Oba tyto primery P2 a P3 společně nedetekovaly pouze jednu variantu referenčního genu *mcr-3*. V našem studijním souboru však první primer (P2) zachytil 104/185 *mcr-3* sekvencí a 17/17 *mcr-5* sekvencí, zatímco druhý primer (P3) zachytil 144/185 *mcr-3* sekvencí a dvě sekvence *mcr-7* ze tří. Primery P2 a P3 byly společně schopny rozpoznat 149/185 (80,5 %) nukleotidových sekvencí genu *mcr-3*. Pomocí dodatečně navržených primerů P9 a P10 v kombinaci s primerem P3 se podařilo identifikovat všechny zkoumané sekvence *mcr-3* (185/185, 100 %). Kromě toho byly všechny zkoumané sekvence genu *mcr-7* detekované pomocí primeru P11.

Primer P4 byl schopen zachytit všech osm alelických variant referenčních genů *mcr-4* (*mcr-4.1* až *mcr-4.8*) a všech 23 námi zkoumaných sekvencí *mcr-4*. Totéž platilo pro primery P5, P6 a P7, které zachytily čtyři referenční varianty genu *mcr-8* (všech 23 námi analyzovaných sekvencí *mcr-8*), tři referenční varianty genu *mcr-9* (všech 28 námi analyzovaných sekvencí *mcr-9*) a pět referenčních variant genu *mcr-10* (všech 16 námi analyzovaných sekvencí *mcr-10*).

Kromě toho byla analyzována specifita prvních sedmi párů primerů pomocí PCR analýzy, která je popsána v následující části.

## 5.2 Výskyt *mcr*-pozitivních izolátů enterobakterií v klinických vzorcích

Pomocí PCR se sedmi specifickými páry oligonukleotidů byla otestována přítomnost *mcr* genů ve 103 klinických vzorcích s použitím různých pozitivních kontrol *mcr-1* až *mcr-9*. Všechny pozitivní kontroly poskytly amplikony s předpokládanými velikostmi párů bází (Tabulka 3) a potvrdily specifitu použitých primerů.

Celkem 20,4 % (21 ze 103) zkoumaných klinických vzorků bylo metodou PCR považováno za pozitivní na *mcr* geny (výsledek není zobrazen). Těchto výsledků bylo dosaženo pomocí následujících oligonukleotidů – P1 (*mcr-1,2,6*), P3 (*mcr-3,7*), P6 (*mcr-9*) a P7 (*mcr-10*). V současné době jsou k dispozici údaje celogenomového sekvenování (WGS) pouze pro 14 z těchto 21 *mcr*-pozitivních izolátů potvrzených pomocí PCR. U zbývajících sedmi vzorků proto nebylo možné definitivně vyloučit nebo potvrdit přítomnost těchto genů kvůli nedostatku dat WGS.

Celogenomová analýza odhalila, že sedm ze 14 PCR-pozitivních izolátů s použitím primerů P1 nese místo očekávaných *mcr* genů geny *eptA*. Zbývajících sedm izolátů bylo potvrzeno jako skutečně *mcr* pozitivních. Zajímavé je, že těchto sedm kmenů je rovněž *eptA* pozitivních.

V případě *mcr*-pozitivních kmenů se jednalo o *K. pneumoniae* a šest různých druhů rodu *Enterobacter*. U *K. pneumoniae* byl identifikován gen *mcr-1* a dva kmeny *E. bugandensis* nesly *mcr-9*. V jednom případě se jednalo pouze o zkrácený gen *mcr-9* o délce 1 104 bp, 68,1 % původní délky tohoto genu. Dále byl gen *mcr-10* zjištěn u jednoho kmene *E. asburiae* a *E. roggkampii* a u dvou kmenů *E. kobei*.

Kromě výše uvedených 21 PCR-pozitivních izolátů vykazovalo dalších 19 vzorků slabý pás v elektroforetickém gelu po PCR s primery P2 a P3 (výsledek není zobrazen).

Z těchto 19 izolátů máme v současné době k dispozici WGS data pouze pro deset izolátů a jejich analýza potvrdila přítomnost genů *eptA*.

Na druhou stranu PCR reakce na přítomnost *mcr* genů byla negativní v 63 případech. Z toho ve 46 případech jsme měli k dispozici data WGS, která potvrdila pouze přítomnost genů *eptA*. Nicméně u jednoho kmene *E. asburiae*, který byl PCR negativní při použití primerů určených k amplifikaci námi studovaných genů *mcr*, byla přítomnost genu *mcr-9* potvrzena *in silico* analýzou celogenomových dat.

### 5.3 Výskyt beta-laktamáz u izolátů enterobakterií

Homologní sekvence beta-laktamáz byly identifikovány v 70 sekvenovaných genomech enterobakterií pomocí analýzy BLAST v programu Geneious s anotovanými beta-laktamázami uloženými v naší interní databázi. Nalezené sekvence byly následně analyzovány pomocí analýzy BLAST v databázi BLDB, což vedlo k identifikaci těchto beta-laktamáz. Z beta-laktamáz třídy A byly zjištěny CTX-M, LEN, OXY, SHV a TEM. Třída B zahrnovala beta-laktamázy jako NDM a SER. Zjištěné beta-laktamázy třídy C představovaly typy ACT, Ear a MIR. Z třídy D byly zjištěny pouze OXA.

Všech 70 klinických vzorků neslo alespoň jednu beta-laktamázu (Tabulka 4). Zároveň u všech *mcr* pozitivních izolátů byla prokázána alespoň jedna beta-laktamáza. Konkrétní izoláty vykazovaly specifické kombinace beta-laktamáz. Kromě genu *mcr-1* byly u *K. pneumoniae* identifikovány beta-laktamázy typů CTX-M, SHV, TEM a OXA. Kromě genů *mcr* byly u jednoho izolátu *E. asburiae* a dvou kmenů *E. kobei* zjištěny beta-laktamázy typu MIR. U jednoho kmene *E. asburiae*, *E. bugandensis* a *E. roggkampii* byla spolu s enzymem MCR zjištěna beta-laktamáza typu ACT. Další izolát *E. bugandensis* vykazoval kromě zkráceného genu *mcr-9* přítomnost beta-laktamáz typu MIR, CTX-M, TEM, a NDM. Podrobnější informace o výskytu různých typů beta-laktamáz u konkrétních izolátů jsou uvedeny v tabulce 4.



**Tabulka 4:** Zastoupení MCR enzymů a beta-laktamáz u vybraných enterobakterií se sekvenovaným genomem.

Bakteriální kmeny	PCR	WGS	WGS			
			Beta-laktamázy			
	MCR	MCR	Třída A	Třída B	Třída C	Třída D
EA		EptA, MCR-9			ACT	
EA		EptA			MIR	
EA	MCR-10	MCR-10, EptA			MIR	
EA		EptA	TEM		ACT	
EA		EptA			ACT	
EA		EptA			MIR	
EA	MCR-3,7?	EptA			ACT	
EB		EptA			ACT	
EB		EptA			ACT	
EB		EptA			ACT	
EB	MCR-3,7?	EptA			MIR	
EB		EptA			MIR	
EB		EptA			ACT	
EB		EptA			MIR	
EB		EptA			ACT	
EB		EptA			ACT	
EB	MCR-9	MCR-9, EptA			ACT	
EB	MCR-9	MCR-9 (zkrácený), EptA	TEM, CTX-M	NDM	MIR	
EB		EptA			MIR	
EB		EptA			ACT	
EB		EptA			MIR	
EB		EptA	SHV			
EB		EptA			MIR	
EB		EptA			MIR	
EB	MCR-3,7	EptA			MIR	
EC	MCR-3,7?	EptA			ACT	
EC		EptA	TEM		ACT	
EC	MCR-3,5?	EptA	OXY			
EC		EptA			ACT	
EC		EptA	TEM		ACT	
EC		EptA			ACT	
EC		EptA			ACT	
EC		EptA			ACT	
EH		EptA			ACT	OXA
EH		EptA			ACT	
EH		EptA			ACT	
EH		EptA			ACT	

EA - *E. asburiae*, EB - *E. bugandensis*, EC - *E. cloacae*, EH - *E. hormachei*. ? - potenciální enzym (slabá pozitivní reakce při PCR).

**Tabulka 4:** Pokračování

Bakteriální kmeny	PCR	WGS	WGS			
			Beta-laktamázy			
			Třída A	Třída B	Třída C	Třída D
EK	MCR-3,7?	EptA			ACT	
EK	MCR-3,7?	EptA			ACT	
EK		EptA			MIR	
EK		EptA			MIR	
EK		EptA			ACT	
EK		EptA			ACT	
EK	MCR-10	MCR-10, EptA			MIR	
EK	MCR-10	MCR-10, EptA			MIR	
EK		EptA			MIR	
EK		EptA			MIR	
EK		EptA			ACT	
EK		EptA			ACT	
EK		EptA			ACT	
EL		EptA			ACT	
ER	MCR-10	MCR-10, EptA			ACT	
KA	MCR-1,2,3,5,6,8?	EptA			Ear	
KO	MCR-3,5?	EptA	OXY			
KP	MCR-3,7	EptA	TEM, SHV			
KP	MCR-3,7	EptA	SHV			
KP		EptA	TEM, CTX-M, SHV			OXA
KP	MCR-1,2,6	MCR-1, EptA	CTX-M, TEM, SHV			OXA
KP	MCR-3,7?	EptA	SHV			
KP	MCR-3,7	EptA	CTX-M, SHV			OXA
KP	MCR-3,7?	EptA	SHV			
KP	MCR-3,7	EptA	CTX-M, TEM, SHV			OXA
KP	MCR-3,7	EptA	SHV			
KP		EptA	SHV			
KV		EptA	TEM, SHV, CTX-M, LEN			OXA
KV	MCR-3,7	EptA	TEM, CTX-M, SHV			OXA
KV		EptA	SHV, TEM, CTX-M, LEN			OXA
SE		EptA		SER		
SE		EptA		SER		

EK - *E. kobei*, EL - *E. ludwigii*, ER - *E. roggkampii*, KA - *K. aerogenes*, KO - *K. oxytoca*, KP - *K. pneumoniae*, KV - *K. variicola*, SE - *S. enteritidis*. ? - potenciální enzym (slabá pozitivní reakce při PCR).

#### 5.4 *In silico* analýza MCR enzymů

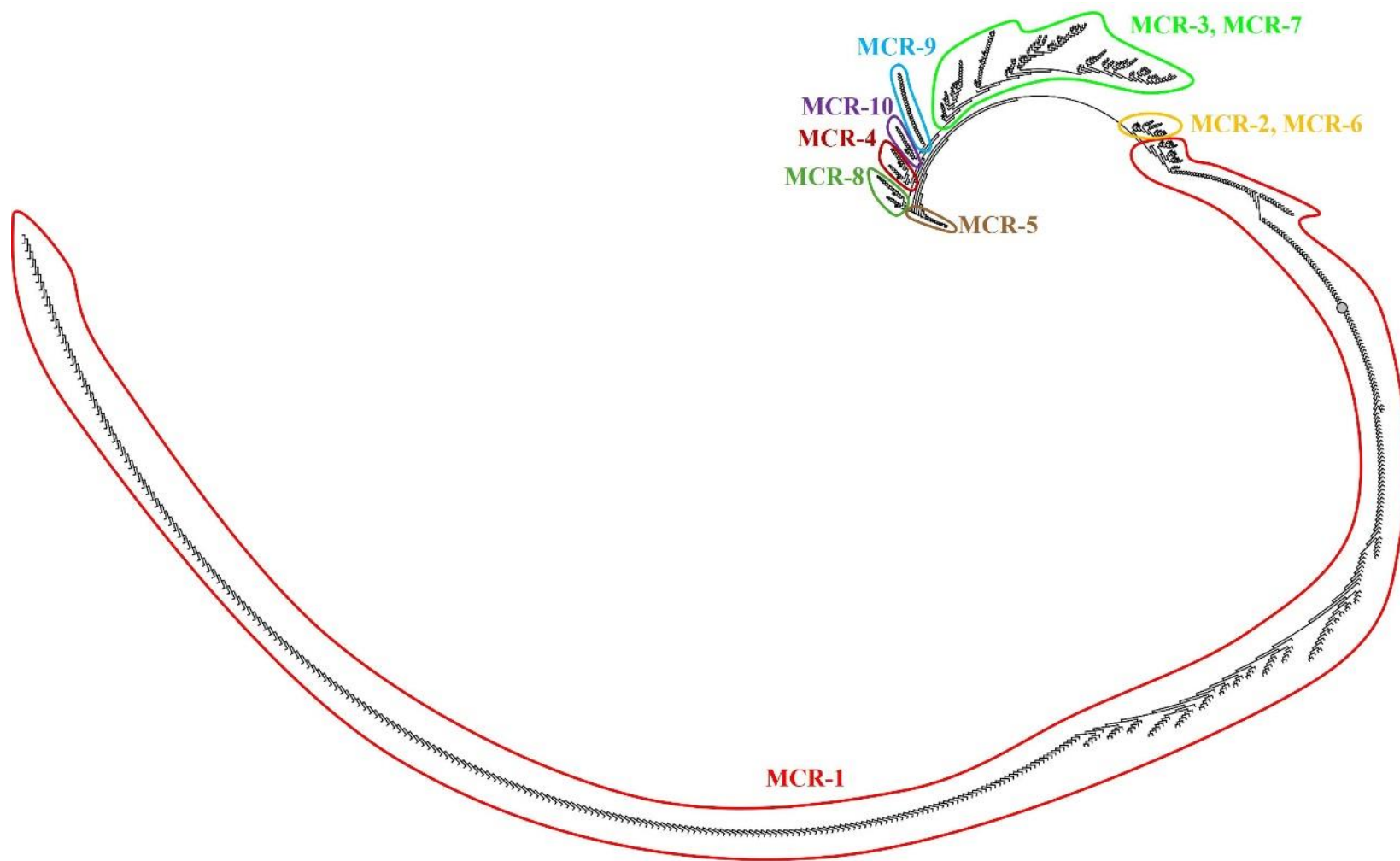
V rámci 114 referenčních enzymů MCR uvedených v databázi NCBI bylo identifikováno celkem 79 konzervovaných aminokyselin (kromě start a stop kodonu), konkrétně leucin v poloze 79, tyrosin v poloze 93, kyselina asparagová v poloze 98, methionin v poloze 101, asparagin v poloze 104, threonin v poloze 108, kyselina glutamová v poloze 112, arginin v poloze 180, prolin v poloze 191, kyselina asparagová a alanin v polohách 219-220, prolin v poloze 231, valin v poloze 237, glycin-kyselina glutamová-threonin v polohách 239-241, arginin v poloze 243, glycin a tyrosin v polohách 251-252, threonin v poloze 256, fenylalanin v poloze 268, serin-cystein-glycin-threonin v polohách 273-276, threonin a alanin v polohách 278-279, prolin-cystein-methionin-fenylalanin-serin v polohách 283-287, tryptofan v poloze 318, asparagin v poloze 321, lysin a glycin v polohách 326-327, cystein v polohách 346 a 351, kyselina asparagová v poloze 353, leucin v polohách 357 a 360, kyselina asparagová v poloze 371, histidin v poloze 377, glycin v poloze 380, histidin v poloze 382, tyrosin v poloze 386, arginin a tyrosin v polohách 389-390, cystein v polohách 401 a 409, leucin v poloze 414, asparagin v poloze 416, tyrosin-asparagin-asparagin v poloze 418-420, threonin a kyselina asparagová v poloze 425-426, leucin v poloze 436, tyrosin v poloze 449, serin-kyselina asparagová-histidin-glycin-kyselina glutamová-serin-leucin-glycin v poloze 451-458, tyrosin-leucin-histidin-glycin v poloze 463-466, prolin v poloze 468 a 473, glutamin v poloze 476, prolin v poloze 480, tryptofan v poloze 484, histidin a kyselina asparagová v polohách 511-512 a leucin v poloze 519 (výsledek není zobrazen). V rámci 800 námi studovaných enzymů MCR bylo konzervováno 74 identických aminokyselin (kromě start kodonu; výsledek není zobrazen).

Srovnáním našich 800 aminokyselinových sekvencí enzymů MCR nebo jen 114 referenčních sekvencí MCR ukázalo 31,9 – 100%, resp. 32,3 – 99,8% sekvenční identitu mezi nimi (výsledek není zobrazen). Například nejnižší identita byla zjištěna mezi enzymem rodiny MCR-1.23 (QHD57408.1) ve srovnání s enzymem rodiny MCR-4.1 (AVP73878.1), který měl pouze 32,3% aminokyselinovou identitu (373 aminokyselinových rozdílů). V případě *in silico* analýzy specifických enzymů MCR to vypadalo následovně. Po porovnání 480 aminokyselinových sekvencí námi studovaných enzymů MCR-1 byla zjištěna jejich sekvenční identita v rozmezí 95 – 100 %. Naopak porovnání 37 referenčních aminokyselinových sekvencí enzymu MCR-1 odhalilo 96,5 – 100% sekvenční identitu. Například MCR-1.23 (QHD57408.1)

a MCR-1.24 (QHD64700.1) vykazovaly 96,5% identitu aminokyselin. U 22 enzymů MCR-2 a osmi referenčních aminokyselinových sekvencí byla zjištěna 96,3 – 100%, resp. 96,5 – 99,8% sekvenční identita. Například MCR-2.4 (QLP89644.1) a MCR-2.5 (QLP89641.1) měly 96,5% identitu aminokyselin.

U 185 enzymů MCR-3 nebo 42 referenčních aminokyselinových sekvencí to byla sekvenční identita 73,2 – 100 %, resp. 80 – 99,8 %. Například MCR-3 (QUW44365.1) a MCR-3.17 (AWM11659.1) měly 80% identitu aminokyselin. U 24 enzymů MCR-4, včetně osmi referenčních aminokyselinových sekvencí, to byla 98,9 – 100%, resp. 99,3 – 99,8% sekvenční identita. U enzymů MCR-5 byla porovnáním námi analyzovaných 17 enzymů nebo pěti referenčních aminokyselinových sekvencí zjištěna 96,5 – 100%, resp. 99,6 – 99,8% sekvenční identita. V případě enzymů MCR-6 byla dosud popsána pouze jedna varianta. Podobně v případě enzymu MCR-7 byla v NCBI popsána pouze jedna varianta, ale v naší analýze se nám podařilo identifikovat další enzym MCR-7 (BBQ52497.1), který s referenční sekvencí MCR-7.1 (AUR80098.1) sdílel 79,8% aminokyselinovou identitu. Dále u 23 enzymů MCR-8 nebo čtyř referenčních aminokyselinových sekvencí to byla sekvenční identita 96,4 – 100 %, resp. 99,1 – 99,8 %. U enzymů MCR-9 byla zjištěna 99,6 – 100% sekvenční identita porovnáním 28 námi analyzovaných enzymů a 99,6 – 99,8% identita porovnáním tří referenčních aminokyselinových sekvencí. Pro 16 enzymů MCR-10 nebo pět referenčních aminokyselinových sekvencí to bylo 99,3 – 100 %, resp. 99,3 – 99,8 % aminokyselinové identity.

Pomocí fylogenetického stromu byly ilustrovány vztahy mezi MCR enzymy na základě jejich podobnosti aminokyselinových sekvencí. Zakořeněný fylogenetický strom nám umožnil identifikovat několik hlavních skupin a podskupin (obrázek 7).



**Obrázek 7:** Fylogenetický strom získaný porovnáním 800 enzymů MCR pomocí Geneious PhyML. Jednotliví zástupci rodin MCR jsou zvýraznění barevnými čarami.

#### 5.4.1 Bodové mutace v enzimech MCR

Studie bodových mutací pro jednotlivé enzymy MCR ukázaly různý stupeň zachování aminokyselinových zbytků. U enzymu MCR-1 bylo při porovnání 480 aminokyselinových sekvencí s referenční sekvencí WP\_049589868.1 (MCR-1.1) s 542 aminokyselinami identifikováno 166 aminokyselinových změn (obrázek 8). Kromě substitucí aminokyselin byly zaznamenány také adice a delece. Obrázek 8 také ukazuje četnosti mutací pro každou pozici se zvýrazněnými evolučně aktivními místy. Ukazuje několik aktivních míst podél vícenásobného zarovnání aminokyselinových sekvencí, které obsahují více než 160 mutací, z nichž čtyři aktivní místa měla více než pět mutací. Frekvence mutací byla nejvyšší na pozicích reziduí Ala216, Met2, Gln3 a Ser15 (v sestupném pořadí). Pro enzym MCR-2 bylo srovnáno 22 aminokyselinových sekvencí s referenční sekvencí WP\_065419574.1 (MCR-2.1) o délce 539 aminokyselin. Celkem bylo zaznamenáno 148 aminokyselinových změn, přičemž pět aktivních míst mělo deset a více mutací. Četnost mutací byla nejvyšší na pozicích aminokyselinových zbytků Ala534 (17krát), His4 (14krát), Gly528 (13krát), Val509 (11krát) a 10krát u Val57 (výsledek není zobrazen).

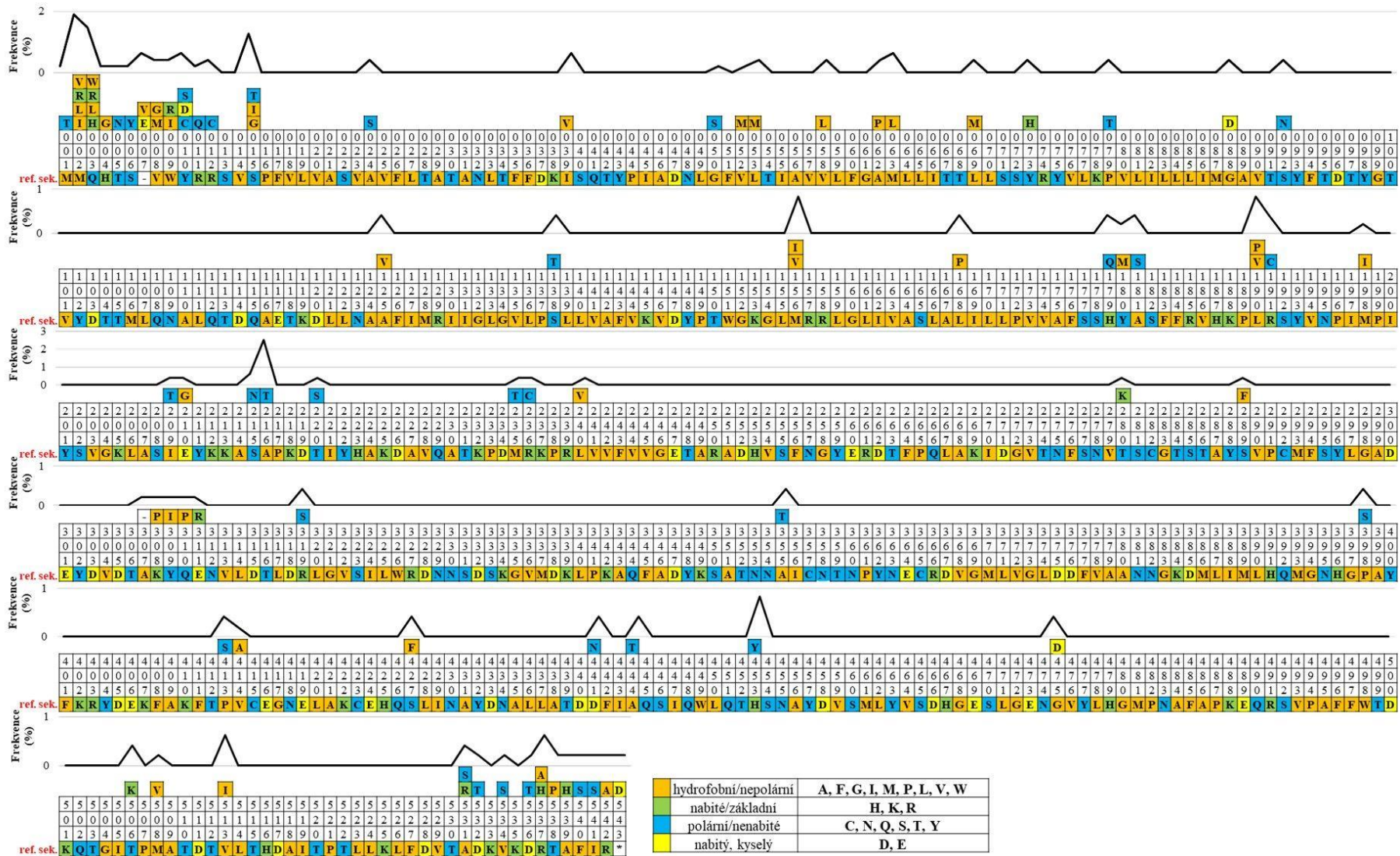
V aminokyselinové sekvenci enzymu MCR-3 bylo zaznamenáno nejvíce změn, konkrétně 8 934 aminokyselinových mutací při srovnání 185 aminokyselinových sekvencí s referenční sekvencí WP\_039026394.1 (MCR-3.1) o délce 542 aminokyselin (výsledek není zobrazen). Při tomto vysokém počtu změn aminokyselin bylo v devíti aktivních místech více než 100 mutací. Frekvence mutací byla vysoká na aminokyselinových pozicích Gly428, Met13, Ala496, Thr488, Val493, Ser525, Arg297, Gly530 a Val122 (seřazeno postupně). U čtyř sekvencí bylo rovněž pozorováno přidání dvou (QSR74932.1) a 17 aminokyselin (AUV50255.1, AWH58347.1, WHV03556.1) před start kodon. Zarovnání stop kodonu pro tento typ enzymu nebylo stejné, například 113 sekvencí končilo na pozici 542 a 69 sekvencí končilo na pozici 541. Dále se například v jedné sekvenci jednalo o odstranění nejméně 70 aminokyselin před stop kodonem (AXK59209.1) a v jiné o přidání nejméně šesti aminokyselin za stop kodon (WP\_272954244.1).

V případě enzymu MCR-4 bylo provedeno srovnání 24 aminokyselinových sekvencí s referenční sekvencí WP\_099156046.1 (MCR-4.1) o délce 542 aminokyselin. Celkem bylo zaznamenáno 39 aminokyselinových změn, přičemž tři aktivní místa mají osm nebo více mutací. Frekvence mutací byla nejvyšší na aminokyselinových pozicích

Val236 (12krát), Gln331 (11krát) a osmkrát na Val179 (výsledek není zobrazen). U enzymu MCR-5 bylo provedeno srovnání 17 aminokyselinových sekvencí s referenční sekvencí WP\_053821788.1 (MCR-5.1) o délce 548 aminokyselin. Celkem bylo zaznamenáno devět aminokyselinových změn (výsledek není zobrazen), přičemž nejvyšší počet změn byl zaznamenán u alaninu na pozici 414 (čtyři změny na serin). Dále v dostupných sekvencích enzymu MCR-6 nejsou žádné mutace. Existuje pouze jedna varianta tohoto enzymu a to MCR-6.1 (WP\_099982813.1).

U enzymu MCR-7 bylo provedeno srovnání tří aminokyselinových sekvencí s referenční sekvencí WP\_104009851.1 (MCR-7.1) o délce 540 aminokyselin. Bylo zjištěno celkem 109 aminokyselinových změn oproti referenční sekvenci (výsledek není zobrazen), z nichž všechny byly spojeny s odlišnou aminokyselinovou sekvencí ve variantě MCR-7 popsané u *Aeromonas veronii* (BBQ52497.1). Pro enzym MCR-8 bylo provedeno srovnání 23 aminokyselinových sekvencí s referenční sekvencí WP\_114699275.1 (MCR-8.1) o délce 566 aminokyselin. Ve srovnání s referenční sekvencí bylo zjištěno celkem 60 aminokyselinových změn. Frekvence mutací byla nejvyšší na aminokyselinových pozicích Ala51 (devítinásobná změna na valin), Ala232 (devítinásobná změna na serin), Asn365 (osminásobná změna na tyrosin) a osminásobná změna asparaginu na lysin na pozici 480 (výsledek není zobrazen).

Pro enzym MCR-9 bylo provedeno srovnání 28 aminokyselinových sekvencí s referenční sekvencí QCC62183.1 (100% aminokyselinová shoda s MCR-9.1 - AYW01299.1) o délce 540 aminokyselin. Celkem bylo zaznamenáno 19 aminokyselinových změn od referenční sekvence (výsledek není zobrazen). Většina změn aminokyselin v tomto případě úzce souvisela s umístěním stop kodonu na pozici 540 (u 13 sekvencí) nebo na pozici 541 (u 15 sekvencí). U enzymu MCR-10 bylo provedeno srovnání celkem 16 aminokyselinových sekvencí s referenční sekvencí WP\_023332837.1 (MCR-10.1) o délce 540 aminokyselin. Bylo identifikováno celkem osm aminokyselinových změn oproti referenční sekvenci, včetně dvou změn z alaninu na serin a z kyseliny glutamové na valin v polohách 114 a 391 (výsledek není zobrazen).



Obrázek 8: Změny aminokyselin v primární sekvenci enzymů MCR, spolu s jejich evolučním zachováním. Pozorované aminokyselinové záměny



u mnoha variant enzymů MCR jsou uvedeny nad referenční sekvencí (ref. sek.) enzymu MCR-1.1 (WP\_049589868.1). Chybějící aminokyseliny v barevných čtvercích představují nulové identifikované substituce. Frekvence změn pro každou pozici jsou uvedeny nad pozorovanými aminokyselinovými substitucemi. Barevné čtverce charakterizují obecné kategorie aminokyselin. Čísla jsou čtena vertikálně a označují pozice aminokyselinových zbytků na základě referenční sekvence MCR-1.1. Pomlčka v primární sekvenci enzymu MCR v poloze 7 představuje přidání tří aminokyselin v této poloze (jednou kyselina glutamová a dvakrát valin). Pomlčka ve čtverci na pozici 307 představuje delecí aminokyseliny u jedné z variant MCR. Na obrázku není zobrazeno přidání dvou aminokyselin před start kodon v jedné z variant MCR (QPJ36140.1) a také přidání 30 aminokyselin za stop kodon v jiné variantě MCR (AZZ00689.1).

## 6 DISKUSE

AMR je celosvětový problém s vážnými důsledky v oblasti humánní i veterinární medicíny. Rozšíření multirezistentních a panrezistentních gramnegativních bakterií přináší obtížně léčitelné infekce, komplikace během terapie, delší hospitalizace a zvýšenou úmrtnost. Zejména rezistence enterobakterií vůči karbapenemům a produkce ESBL výrazně omezuje možnosti léčby, někdy vyžadující užití antibiotik poslední instance, například kolistinu. Bohužel, bakterie rychle vyvinuly mechanismy rezistence vůči kolistinu, jak chromozomálně kódované v genech, tak i plazmidem přenášené (*mcr*), což komplikuje léčbu (Binsker *et al.*, 2022).

Kolistinová rezistence byla hlášena z různých zdrojů, včetně hospodářských zvířat, lidí a vzorků životního prostředí. Hospodářská zvířata jsou rezervoárem *mcr* genů díky hojnému využití kolistinu při léčbě a prevenci infekcí způsobených gramnegativními bakteriemi a jako stimulátoru růstu. Abychom zabránili šíření *mcr* genů a posoudili rizika spojená s jejich přítomností, je nezbytné vyvinout efektivní metody k monitorování prevalence *mcr* genů a zavést účinná opatření k prevenci jejich šíření (Smelikova *et al.*, 2022).

Pro snadnou identifikaci je nezbytná účinná diagnostika, která je levná, rychlá, jednoduchá, citlivá a specifická. V klinické praxi však neexistuje standardní a uznávaný protokol pro screening, identifikaci a potvrzení gramnegativních bakterií rezistentních na kolistin nebo *Enterobacteriaceae* produkující *mcr* (Osei Sekyere, 2019).

Pro testování citlivosti na antimikrobiální látky se často používá disková difúze, ale tato metoda není vhodná pro testování citlivosti na kolistin kvůli vysoké míře falešně pozitivních výsledků. Detekce kolistinové rezistence zprostředkované *mcr* lze provést pomocí amplifikace DNA kauzálního genu. Tento přístup je nezávislý na kultivaci, ale pro zvýšení citlivosti je možné přidat krok obohacení. PCR detekce *mcr* genů se hojně využívá v epidemiologických studiích, kde je DNA buď přímo extrahovaná z klinických vzorků nebo je extrahovaná po předchozím obohacení, aby se minimalizovaly falešně negativní výsledky způsobené například inhibitory PCR. Specifičnost PCR produktů je důležité ověřit sekvenováním. Jednou z nevýhod je omezení PCR reakce designem použitých primerů, což brání detekci nových variant *mcr* genu (Smelikova *et al.*, 2022). Molekulární testy identifikují přítomnost známých *mcr* genů, ale neurčují fenotypovou rezistenci na kolistin, protože existují MCR-pozitivní kmeny citlivé na kolistin (Osei

Sekyere, 2019). Tento přístup umožňuje zkoumání velkého počtu vzorků v krátkém časovém období při relativně nízkých nákladech (Smelikova *et al.*, 2022).

Existuje také řada komerčních chromogenních i nechromogenních fenotypových testů zaležených na kultivaci pro detekci rezistence na kolistin v klinických, veterinárních i environmentálních vzorcích. Mezi takovéto média patří například Agar CHROMID® Colistin R (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francie) a médium CHROMagar™ COL-APSE (CHROMagar, Paříž, Francie). Rezistence bakterií pěstovaných na selektivních agarových plotnách s kolistinem je nutné potvrdit testováním citlivosti na tuto látku, protože významná část bakteriálních izolátů je na kolistin citlivá. Možné příčiny zahrnují nerovnoměrnou distribuci kolistinu v agarových plotnách, adhezi kolistinu na plast Petriho misky nebo degradaci kolistinu během skladování nebo inkubace, protože jeho stabilita je závislá na teplotě (Smelikova *et al.*, 2022). Fenotypové testy sice stanoví přítomnost nebo nepřítomnost rezistence na kolistin, ale neposkytují informace o základním mechanismu rezistence (Osei Sekyere, 2019).

Pro testování kolistinové citlivosti mezi gramnegativními bakteriemi doporučuje Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST) pouze mikrodiluční bujónovou metodu s použitím sulfátové soli kolistinu bez přídavku povrchově aktivních látek (Smelikova *et al.*, 2022). Nicméně tato metoda má své omezení, jako je časová náročnost a metodologické problémy, což vede k hledání alternativních způsobů detekce polymyxinové rezistence (Leshaba *et al.*, 2022).

Pro epidemiologické účely je nutná charakterizace *mcr* genů. WGS představuje konečnou typizační metodu, umožňuje identifikaci všech mechanismů rezistence a poskytuje mnohem více informací než fenotypové metody (Osei Sekyere, 2019; Smelikova *et al.*, 2022).

Mezi lety 2018 a 2019 byla v České republice zaznamenána prevalence genu *mcr-1* v klinických vzorcích (rektální výtěry a vzorky stolice) ve výši 0,21 %. Geny *mcr-2* až *mcr-8* nebyly detekovány a geny *mcr-9* a *mcr-10* nebyly sledovány (Tkadlec *et al.*, 2021). Jiné studie sledující výskyt *mcr-1* genu v klinických vzorcích zaznamenaly ve Francii prevalenci 0,58 % a v Nizozemsku 0,35 % (Terveer *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020b). Při screeningu byly používány různé metodologie. Některé studie testovaly vzorky pomocí PCR detekce nebo pomocí obohacených bujónů s následnou selektivní kultivací a PCR pozitivních vzorků. Většina evropských studií používala selektivní

kultivaci s následnou PCR nebo WGS detekcí *mcr* genů v izolátech rezistentních na kolistin (Tkadlec *et al.*, 2021). Zajímavé je, že celosvětově je menší diverzita *mcr* genů v klinických vzorcích (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* a *mcr-5*) než ve vzorcích zvířat, zdravých lidí a životního prostředí. V Asii byly v klinických testech zachyceny geny *mcr-1*, *mcr-2* a *mcr-3*. V Evropě byly detekovány varianty *mcr-1* a *mcr-2*, v Americe pak *mcr-1* a *mcr-5* a v Africe pouze *mcr-1*. Navzdory nízké diverzitě byla nejvyšší prevalence *mcr* genu v klinických vzorcích v Africe s hodnotou 7,58 %. Následovala Amerika s prevalencí 3,59 %, Asie s 1,56 % a Evropa s 0,522 % (Bastidas-Caldes *et al.*, 2022). V Číně byla provedena studie sledující prevalenci genů *mcr-9* a *mcr-10* v klinických vzorcích, která prokázala vysokou prevalenci jak u kolistin rezistentních, tak u citlivých enterobakterií. U enterobakterií rezistentních na kolistin byla prevalence *mcr-9* 8,4 % a *mcr-10* 12,6 % zatímco u izolátů citlivých na kolistin byla prevalence 14,8 % a 6 % (Liao *et al.*, 2022).

Celosvětová analýza z roku 2022 ukázala, že hlavním rezervoárem *mcr* pozitivní *E. coli* jsou kuřata a prasata s prevalencí 15,8 % a 14,9 %. Zdraví lidé a klinické izoláty vykazovali prevalenci 7,4 % a 4,2 % (Gaballa *et al.*, 2023).

Nízká prevalence *mcr* genů v klinických vzorcích může být způsobena negativními vlivy na fitness, kdy nadměrná exprese *mcr* genů zvyšuje energetickou zátěž, snižuje buněčný růst a oslabuje bakteriální zdatnost. Přítomnost plazmidu nesoucího *mcr* gen má příznivý účinek pouze v případě léčby kolistinem. Naopak, chromozomální mutace v genech *pmrAB*, *phoPQ* a *mgrB* nevykazují významné vlivy na fitness. Široké využití kolistinu jako terapeutického léku a stimulatoru růstu u hospodářských zvířat a v zemědělství vede k vysoké prevalenci *mcr* pozitivních, kolistin rezistentních enterobakterií v tomto prostředí. Selekcí tlak dále podporuje získávání a šíření *mcr* genů do environmentálního prostředí a mezi lidmi (Mmatli *et al.*, 2022).

V některých zemích, například v Brazílii, Thajsku, Číně, Japonsku, Argentině a v zemích EU, bylo zakázáno používání kolistinu jako stimulatoru růstu s cílem zachovat jeho účinnost v humánní medicíně, protože jeho nadměrné používání přispívá k rostoucí hrozbě antibiotické rezistence (Mmatli *et al.*, 2022). Několik epidemiologických studií prokázalo, že zákaz kolistinu jako stimulatoru růstu vedl ke snížení prevalence *mcr-1* v *E. coli* u zvířat, což je připisováno negativním nákladům na fitness. Zatímco zákaz

používání kolistinu v zemědělství vede ke snížení prevalence *mcr* genů u zvířat i lidí, stále dochází ke klinickému šíření *mcr* pozitivních bakterií (Liu *et al.*, 2023).

Mobilizované geny rezistence na kolistin (*mcr*), kódující pEtN transferázy, jsou blízce příbuzné s chromozomálně kódovanou variantou pEtN, známou jako EptA. Analýza sekvenční podobnosti a fylogeneze pomocí metody maximum likelihood pro geny *mcr* a *eptA* naznačuje, že sekvenční podobnost není dostatečná k rozlišení mezi *mcr* a *eptA* geny. Existuje řada důkazů podporující názor, že se *mcr* vyvinul z *eptA* prostřednictvím mobilizace. Geny *eptA* jsou typicky chromozomálně kódované v operonu s dvousložkovým regulačním systémem nebo sousedící s regulátorem typu TetR, zatímco *mcr* sousedí s *pap2* nebo inserčními sekvencemi (Gaballa *et al.*, 2023).

V nedávné studii Gaballa *et al.* z roku 2023 bylo zjištěno, že z celkového počtu 69 814 shod BLASTP s MCR a MCR-like proteiny, které byly identifikovány, jich 15 321 (21,9 %) odpovídalo proteinům anotovaným jako EptA (Gaballa *et al.*, 2023). Aminokyselinová sekvence ukazuje, že alely MCR sdílí 61 až 76 % sekvence s EptA. Některé alely MCR vykazují vyšší stupeň podobnosti s EptA než jiné alely MCR. Například MCR-8.1 vykazuje průměrnou podobnost  $72,8 \pm 1,1$  % s EptA a  $70 \pm 7$  % s jinými alelami MCR. Naopak MCR-1.1 vykazuje průměrnou podobnost  $64,5 \pm 1,5$  % s EptA a  $76,1 \pm 18,1$  % s jinými alelami MCR. Tento výsledek naznačuje, že samotná sekvenční podobnost nemůže dostatečně rozlišit EptA od MCR (Elizabeth *et al.*, 2022).

Expres *mcr-1* zvyšuje MIC polymyxinů čtyř- až osminásobně. Přítomnost *mcr* genů proto stačí k udělení polymyxinové odolnosti bez pomoci jiných mechanismů rezistence (Kai *et Wang*, 2020). U endogenního genu *eptA* je situace odlišná. Enzymy EptA se nacházejí v mnoha gramnegativních patogenech (např. *S. enterica*, *K. pneumoniae*, *E. coli* atd.), nevykazují ale samy o sobě odolnost vůči terapii kolistinem. Test transkripční exprese na sedmi izolátech postrádající jakýkoli *mcr* gen neprokázal žádnou změnu v expresi *eptA* jak v přítomnosti, tak nepřítomnosti kolistinu. Nicméně u pěti izolátů obsahující gen *eptA* i *mcr-1* byla pozorována zvýšená exprese obou genů při vystavení sub-inhibiční koncentraci kolistinu. To naznačuje, že pro spuštění exprese *eptA* se musí podílet další regulační faktory. Zřejmá je také genetická interakce mezi geny *mcr-1* a *eptA* při expozici kolistinu (Elizabeth *et al.*, 2022).

V literatuře byla popsána řada primerů pro detekci genu *mcr*. Mnohé z těchto oligonukleotidů však nepokrývají všechny varianty těchto genů, ale pouze nejběžnější

varianty genů *mcr*. V publikaci Smelikova *et al.* jsou shrnuty různé primery pro detekci genů *mcr* (Smelikova *et al.*, 2022). Například primery pro geny *mcr-1* byly schopny detekovat 34 variant z 37 referenčních sekvencí. Analýza těchto primerů a našich 480 sekvencí genů *mcr-1* ukázala, že pokrývají 98,1 % sekvencí (471/480). Dále primery pro detekci genů *mcr-2* pokrývaly 25 % (2/8) referenčních sekvencí a 22,7 % (5/22) námi analyzovaných sekvencí. U primerů pro *mcr-3* byla specifita 71,4 % (30/42) u referenčních sekvencí a 44,9 % (83/185) u našich sekvencí. Cílem této studie proto bylo navrhnout specifické primery pro PCR detekci široké škály genů *mcr* popsáných v databázi NCBI.

Nedávno jsme navrhli čtyři páry primerů pro sledování genů *mcr* u klinicky významných bakterií (Mlynarcik *et al.*, 2019). Výsledky analýzy primer-BLAST ukázaly, že tyto dříve publikované oligonukleotidy jsou schopny detekovat 98 % (100 ze 102) alelických variant referenčních genů *mcr-1* až *mcr-7* uvedených v databázi NCBI. S ohledem na námi analyzované sekvence a tyto dříve popsány primery byla jejich detekční schopnost 93,9 % (688 ze 733), což představuje 45 nedetekovatelných *mcr* variant ve srovnání se dvěma variantami při detekci referenčních *mcr* sekvencí. Tato zjištění naznačují, že některé *mcr* varianty v databázi NCBI dosud nebyly přiřazeny. Kromě této skutečnosti jsme se v této práci pokusili navrhnout celkem 11 párů oligonukleotidů (včetně čtyř párů primerů popsáných v předchozí práci) používaných pro detekci všech referenčních *mcr-1* až *mcr-10* genů, včetně *mcr* genů neznámé varianty (Tabulka 3).

Tato studie poukazuje na rozmanitost enzymů MCR a naše data mohou pomoci definovat hranice podrodiny enzymů MCR. Na druhou stranu, tyto nejméně podobné varianty mohou také představovat nové enzymy MCR. Stejně jako tomu bylo například v případě KLUC-1 a CTX-M-1 podtypů beta-laktamáz, které sdílely 85 – 86% identitu aminokyselin (Decousser *et al.*, 2001). V této souvislosti je třeba upozornit na některé enzymy MCR-3, u nichž jsme zjistily nejnižší aminokyselinovou identitu 73,2 % nebo také enzymy MCR-7 s identitou 79,8 %.

Fylogenetický strom ukázal, že všech 800 aminokyselinových sekvencí námi studovaných MCR enzymů bylo správně seskupeno do 8 klastřů (skupina MCR-1, MCR-2 společně s MCR-6, MCR-3 společně s MCR-7, MCR-4, MCR-5, MCR-8, MCR-9, MCR-10). Co se týče enzymů, které měly nejnižší aminokyselinovou identitu

ve srovnání se svými protějšky, opět byly tyto enzymy správně seskupeny do klastrů. Je však třeba poznamenat, že stejným způsobem je enzym MCR-6 zařazen k enzymům MCR-2 a tedy do jednoho shluku, přičemž aminokyselinová identita například mezi MCR-2.1 (SBV31106.1) a variantou MCR-6.1 (ASK49942.1) činí 87,9 %.

Studie mutační analýzy ukazuje, že nejvyšší podíl aminokyselinových změn mezi deseti enzymy MCR (MCR-1 až MCR-10) byl pozorován u enzymů MCR-3 a MCR-1 (166 aminokyselinových změn enzymů MCR-1 je uveden na obrázku 8). U prvního z nich obsahoval tento soubor více než 8 930 mutací pokrývajících celkem 256 z 542 pozic reziduí enzymu MCR-3, které jsou zde označovány jako mutační „hotspoty“. Tato aktivní místa obsahovala alespoň jednu mutaci, přičemž 39 hotspotů mělo 70 a více mutací.

V této studii bylo dosud komplexně analyzováno 70 izolátů enterobakterií klinického původu rezistentních ke kolistinu. Výsledky PCR a WGS jasně potvrdily přítomnost genů *mcr* u sedmi izolátů. Na druhé straně byl jeden vzorek negativní při PCR reakci s primery určenými k amplifikaci *mcr* genů. Na základě údajů WGS však tento vzorek *E. asburiae* nesl gen *mcr-9*. Za zmínku stojí, že naše *in silico* vazebná analýza primeru P6 potvrdila jeho specifitu vůči tomuto identifikovanému *mcr* genu. Skutečnost, že gen *mcr* nebyl zachycen PCR reakcí, mohla být způsobena přítomností inhibitorů v reakci, protože DNA nebyla izolována pomocí komerční purifikační soupravy nebo mohla souviset s degradací DNA během skladování.

Výsledky PCR reakcí však naznačují, že námi navržené primery se nespecificky vážou také na geny *eptA*. Řada autorů (Elizabeth *et al.*, 2022) upozornila na jejich poměrně vysokou sekvenční podobnost (61 až 76 %). Na tomto místě je důležité poznamenat, že naše *in silico* analýza 1 500 náhodně vybraných enzymů EptA ukázala, že mezi nimi existuje 15,4 až 100% sekvenční identita (výsledky nejsou uvedeny). Z toho vyplývá i jejich rozdílná podobnost s enzymy MCR. To naznačuje, že u některých bakteriálních rodů nemusíme mít při použití našich primerů žádné falešně pozitivní výsledky. Přesto by bylo lepší navrhovat specifitější primery používané k detekci genů *mcr* z jedné konkrétní rodiny a při navrhování primerů nespojovat různé podrodiny dohromady, a to i v případě, že existuje poměrně vysoká aminokyselinová identita, jako je tomu například u proteinů MCR-1, MCR-2 a MCR-6.

Naše genomové analýzy dále potvrdily společný výskyt těchto genů s beta-laktamázami. Zkoumané kmeny obsahovaly různé kombinace variant AmpC

(např. *bla*<sub>ACT</sub>, *bla*<sub>EAR</sub> a *bla*<sub>MIR</sub>), genů beta-laktamázu s širokým nebo rozšířeným spektrem účinku (*bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXY</sub>) a oxacilinázy (*bla*<sub>OXA</sub>). Kromě toho byla v jednom případě u *E. bugandensis* zjištěna přítomnost genu *bla*<sub>NDM</sub> kódujícího karbapenemázu, který rovněž obsahoval gen *mcr-9*. V tomto případě se pravděpodobně jednalo o nefunkční gen *mcr-9*, protože tento gen byl zkrácený a obsahoval pouze 68,1 % původní sekvence, přičemž zbývající gen byl nahrazen inserční sekvencí. Data WGS dále odhalila přítomnost dalších genů rezistence (výsledky nejsou uvedeny) jako jsou *tet*, *sul*, *mph*, *msr*(E) a *aph*, což potvrzuje profil multirezistence vůči polymyxinům, beta-laktamům, tetracyklinům, sulfonamidům, makrolidům a aminoglykosidům. Podobně jako v této studii i v jiných pracích byla zaznamenána koexistence genů *mcr* s geny ESBL (Chopjitt *et al.*, 2024) a karbapenemázami (Sanikhani *et al.*, 2024), což představuje významnou a rostoucí hrozbu pro celosvětové veřejné zdraví.

Tyto skutečnosti dále naznačují, že WGS poskytuje úplnější obraz bakteriálního genomu z hlediska rezistence vůči antibiotikům. Na druhou stranu je však třeba si uvědomit komplikace spojené s WGS jako jsou náklady, vybavení, odborné znalosti v oblasti bioinformatiky, čas na získání výsledků a jejich interpretaci. Proto může být detekce *mcr* genů na základě PCR užitečná v laboratořích, které nemají rozsáhlé finanční zdroje nebo platformy pro sekvenování nové generace. Obecně lze říct, že PCR reakce představují nižší náklady, rychlejší dobu realizace a schopnost detekovat specifické geny rezistence, jako jsou geny *mcr*.



## 7 ZÁVĚR

Již v roce 1945 Alexander Fleming varoval před nevyhnutelným výskytem antibiotické rezistence a tato předpověď se ukázala jako přesná. Mezi nejobávanějšími patogeny v nemocničních zařízeních jsou *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* a *Acinetobacter*. Tyto patogeny si vytvořili rezistenci vůči karbapenemům, beta-laktamům i polymyxinům, jejichž geny rezistence jsou často nesené společně na plasmidech, což umožňuje horizontální šíření rezistence napříč bakteriálními populacemi.

Mobilní kolistinová rezistence je zvláště znepokojivá, protože kolistin se stává stále důležitějším ATB poslední linie obrany proti fatálním infekcím způsobeným multirezistentními organismy. V současnosti známe deset variant *mcr* genů a 114 alel. Tyto geny kódují fosfoethanolaminové transferázy, které katalyzují adici pEtN k fosfátové skupině lipidu A. Tím dochází ke snížení negativního náboje bakteriální vnější membrány a zeslabení afinity kolistinu, což vede k rezistenci proti tomuto antibiotiku.

V experimentální části práce byla provedena detekce *mcr* genů u 103 klinických izolátů pomocí PCR reakce s použitím sedmi specifických párů primerů navržených v bioinformatickém programu Geneious Prime. Navíc byly ve stejném programu navrženy další čtyři nové páry primerů, které byly navrženy tak, aby spolu s předchozími primery umožnily detekci všech doposud známých *mcr* variant, které se vyskytují u bakterií. Na základě údajů WGS byla celková prevalence funkčních genů *mcr* u dosud studovaných klinických izolátů 10 %. Detekované byly geny *mcr-1*, *mcr-9* a *mcr-10* s prevalencí 1,4 %, 2,9 % a 5,7 % v daném pořadí. Dále byla provedena *in silico* analýza přítomnosti beta-laktamáz u 70 osekvenovaných klinických vzorků. U všech izolátů se vyskytovala minimálně jedna beta-laktamáza, nejčastěji se jednalo o ACT (45,7 %), MIR (27,1 %), SHV (20 %) a TEM (15,7 %). Dále byl vytvořen fylogenetický strom a provedeny studie bodových mutací pro jednotlivé MCR enzymy s cílem identifikovat evolučně aktivní místa.

V souvislosti s budoucími opatřeními by mohlo být užitečné zvážit zavedení systematického monitorování v nemocnicích, zemědělských podnicích, potravinách a životním prostředí. To by mohlo přispět k rychlé identifikaci bakterií rezistentních vůči kolistinu a produkujících MCR, což by následně mohlo pomoci zabránit jejich šíření. Pravidelný screening je klíčový pro získání skutečné prevalence kolistinové rezistence

a *mcr* genů. Zároveň by měl být zaveden standardní a uznávaný protokol pro screening, identifikaci a konfirmaci kolistin-rezistentních bakterií produkujících MCR enzymy.

## 8 LITERATURA

- AbuOun M., Stubberfield E. J., Duggett N. A., Kirchner M., Dormer L., Nunez-Garcia J., Randal L. P., Lemma F., Crook D. W., Teale Ch., Smith R. P., Anjum M. F. (2017). *mcr-1* and *mcr-2* (*mcr-6.1*) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(10), 2745-2749.
- Arcilla M. S., van Hattem J. M., Matamoros S., Melles D. C., Penders J., de Jong M. D., Schultsz C. (2016). Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *The Lancet infectious diseases*, 16(2), 147-149.
- Auda I. G., Salman I. M. A., Odah J. G. (2020). Efflux pumps of Gram-negative bacteria in brief. *Gene Reports*, 20, 100666.
- Ayoub Moubareck C. (2020). Polymyxins and bacterial membranes: a review of antibacterial activity and mechanisms of resistance. *Membranes*, 10(8), 181.
- Azimi L., Lari A. R. (2019). Colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains with defective biofilm formation. *GMS hygiene and infection control*, 14.
- Baron S., Hadjadj L., Rolain J. M., Olaitan A. O. (2016). Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *International journal of antimicrobial agents*, 48(6), 583-591.
- Bastidas-Caldes C., de Waard J. H., Salgado M. S., Villacís M. J., Coral-Almeida M., Yamamoto Y., Calvopiña M. (2022). Worldwide prevalence of *mcr*-mediated colistin-resistance *Escherichia coli* in isolates of clinical samples, healthy humans, and livestock—a systematic review and meta-analysis. *Pathogens*, 11(6), 659.
- Binsker U., Käsbohrer A., Hammerl J. A. (2022). Global colistin use: a review of the emergence of resistant *Enterobacterales* and the impact on their genetic basis. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(1), fuab049.

- Borowiak M., Fischer J., Hammerl J. A., Hendriksen R. S., Szabo I., Malorny B. (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in *d*-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Paratyphi* B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(12), 3317-3324.
- Carattoli A., Villa L., Feudi C., Curcio L., Orsini S., Luppi A., Pezzotti G., Magistrali C. F. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*, 22(31), 30589.
- Carroll L. M., Gaballa A., Guldemann C., Sullivan G., Henderson L. O., Wiedmann M. (2019). Identification of novel mobilized colistin resistance gene *mcr-9* in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* isolate. *MBio*, 10(3), 10-1128.
- Dalmolin T. V., de Lima-Morales D., Barth A. L. (2018). Plasmid-mediated colistin resistance: what do we know?. *Journal of Infectiology and Epidemiology*, 1(2).
- De Angelis G., Del Giacomo P., Posteraro B., Sanguinetti M., Tumbarello M. (2020). Molecular mechanisms, epidemiology, and clinical importance of  $\beta$ -lactam resistance in *Enterobacteriaceae*. *International journal of molecular sciences*, 21(14), 5090.
- Decousser J. W., Poirel L., Nordmann P. (2001). Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A  $\beta$ -lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(12), 3595-3598.
- Edgar R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.
- Elbediwi M., Li Y., Paudyal N., Pan H., Li X., Xie S., Rajkovic A., Feng Y., Fang W., Rankin S. C., Yue M. (2019). Global burden of colistin-resistant bacteria: mobilized colistin resistance genes study (1980–2018). *Microorganisms*, 7(10), 461.
- Elizabeth R., Baishya S., Kalita B., Wangkheimayum J., Choudhury M. D., Chanda D. D., Bhattacharjee A. (2022). Colistin exposure enhances expression of *eptB* in colistin-resistant *Escherichia coli* co-harboring *mcr-1*. *Scientific Reports*, 12(1), 1348.

- Gaballa A., Wiedmann M., Carroll L. M. (2023). More than *mcr*: canonical plasmid-and transposon-encoded mobilized colistin resistance genes represent a subset of phosphoethanolamine transferases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1060519.
- Gogry F. A., Siddiqui M. T., Sultan I., Haq Q. M. R. (2021). Current update on intrinsic and acquired colistin resistance mechanisms in bacteria. *Frontiers in medicine*, 8, 677720.
- Guindon S., Dufayard J. F., Lefor V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*, 59(3), 307-321.
- Huang J., Li C., Song J., Velkov T., Wang L., Zhu Y., Li J. (2020). Regulating polymyxin resistance in Gram-negative bacteria: roles of two-component systems PhoPQ and PmrAB. *Future microbiology*, 15(6), 445-459.
- Hussein N. H., Al-Kadmy I. M., Taha B. M., Hussein J. D. (2021). Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from 1 to 10: a comprehensive review. *Molecular biology reports*, 48, 2897-2907.
- Chen M., Shi X., Yu Z., Fan G., Serysheva I. I., Baker M. L., Luisi B. F., Ludtke S. J., Wang Z. (2022). *In situ* structure of the AcrAB-TolC efflux pump at subnanometer resolution. *Structure*, 30(1), 107-113.
- Cherak Z., Loucif L., Moussi A., Rolain J. M. (2021). Epidemiology of mobile colistin resistance (*mcr*) genes in aquatic environments. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 27, 51-62.
- Chopjitt P., Boueroy P., Morita M., Iida T., Akeda Y., Hamada S., Kerdsin A. (2024). Genetic characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* harboring colistin-resistant gene isolated from food animals in food supply chain. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14.
- Chudobová H. (2021). Identifikace a charakterizace beta-laktamáz s rozšířeným spektrem účinku (ESBL) u bakterií. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouci.

- Jeannot K., Bolard A., Plesiat P. (2017). Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *International journal of antimicrobial agents*, 49(5), 526-535.
- Jerke K. H., Lee M. J., Humphries R. M. (2016). Polymyxin susceptibility testing: a cold case reopened. *Clinical Microbiology Newsletter*, 38(9), 69-77.
- Kai J., Wang S. (2020). Recent progress on elucidating the molecular mechanism of plasmid-mediated colistin resistance and drug design. *International Microbiology*, 23(3), 355-366.
- Kapoor G., Saigal S., Elongavan A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*, 33(3), 300.
- Khedher M. B., Baron S. A., Riziki T., Ruimy R., Raoult D., Diene S. M., Rolain J. M. (2020). Massive analysis of 64,628 bacterial genomes to decipher water reservoir and origin of mobile colistin resistance genes: is there another role for these enzymes?. *Scientific reports*, 10(1), 5970.
- Ledger E. V., Sabnis A., Edwards A. M. (2022). Polymyxin and lipopeptide antibiotics: membrane-targeting drugs of last resort. *Microbiology*, 168(2).
- Leshaba T. M. S., Mbelle N. M., Osei Sekyere J. (2022). Current and emerging polymyxin resistance diagnostics: a systematic review of established and novel detection methods. *Journal of Applied Microbiology*, 132(1), 8-30.
- Liao W., Cui Y., Quan J., Zhao D., Han X., Shi Q., Wang Q., Jiang Y., Du X., Li X., Yu Y. (2022). High prevalence of colistin resistance and *mcr-9/10* genes in *Enterobacter* spp. in a tertiary hospital over a decade. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 59(5), 106573.
- Lister S. A., Barrow P. (2008). *Enterobacteriaceae*. *Poultry Diseases*. Elsevier, s. 110-145. ISBN 978-0-70-202862-5.
- Liu J. H., Liu Y. Y., Shen Y. B., Yang J., Walsh T. R., Wang Y., Shen J. (2023). Plasmid-mediated colistin-resistance genes: *mcr*. *Trends in Microbiology*.

- Liu Y. Y., Wang Y., Walsh T. R., Yi L. X., Zhang R., Spencer J., Doi Y., Tian G., Dong B., Huang X., Yu L. F., Gu D., Ren H., Chen X., Lv L., He D., Zhou H., Liang Z., Liu J. H., Shen J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*, 16(2), 161-168.
- Livermore D. M., Woodford N. (2006). The  $\beta$ -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *TRENDS in Microbiology*, 14(9), 413-420.
- Luo Q., Wang Y., Xiao Y. (2020). Prevalence and transmission of mobilized colistin resistance (*mcr*) gene in bacteria common to animals and humans. *Biosafety and Health*, 2(2), 71-78.
- Martiny H. M., Munk P., Brinch C., Szarvas J., Aarestrup F. M., Petersen T. N. (2022). Global distribution of *mcr* gene variants in 214K metagenomic samples. *Msystems*, 7(2), e00105-22
- McCoy L. S., Roberts K. D., Nation R. L., Thompson P. E., Velkov T., Li J., Tor Y. (2013). Polymyxins and analogues bind to ribosomal RNA and interfere with eukaryotic translation *in vitro*. *ChemBioChem*, 14(16), 2083-2086.
- Mlynarcik P., Chudobova H., Zdarska V., Kolar M. (2021). *In silico* analysis of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in bacteria. *Antibiotics*, 10(7), 812.
- Mlynarcik P., Kolar M. (2019). Molecular mechanisms of polymyxin resistance and detection of *mcr* genes. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, 163(1).
- Mmatli M., Mbelle N. M., Maningi N. E., Osei Sekyere J. (2020). Emerging transcriptional and genomic mechanisms mediating carbapenem and polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*: a systematic review of current reports. *MSystems*, 5(6), 10-1128.
- Mmatli M., Mbelle N. M., Osei Sekyer J. (2022). Global epidemiology, genetic environment, risk factors and therapeutic prospects of *mcr* genes: A current and emerging update. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 1210.

- Moffatt J. H., Harper M., Adler B., Nation R. L., Li J., Boyce J. D. (2011). Insertion sequence IS *Aba11* is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(6), 3022-3024.
- Moffatt J. H., Harper M., Boyce J. D. (2019). Mechanisms of Polymyxin Resistance. In: Li J., Nation R., Kaye K. (eds) *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1145. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0_5)
- Mohapatra S. S., Dwibedy S. K., Padhy I. (2021). Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. *Journal of Biosciences*, 46(3), 85.
- Morrison L., Zembower T. R. (2020). Antimicrobial resistance. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics*, 30(4), 619-635.
- Munita J. M., Arias C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*, 481-511.
- Nang S. C., Azad M. A., Velkov T., Zhou Q. T., Li J. (2021). Rescuing the last-line polymyxins: achievements and challenges. *Pharmacological reviews*, 73(2), 679-728.
- Nation R. L., Li J., Cars O., Couet W., Dudley M. N., Kaye K. S., Mouton J. W., Paterson D. L., Tam V. H., Theuretzbacher U., Tsuji B. T., Turnidge J. D. (2015). Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. *The Lancet infectious diseases*, 15(2), 225-234.
- Nation R. L., Velkov T., Li J. (2014). Colistin and polymyxin B: peas in a pod, or chalk and cheese?. *Clinical infectious diseases*, 59(1), 88-94.
- Newton B. A. (1956). The properties and mode of action of the polymyxins. *Bacteriological reviews*, 20(1), 14-27.
- O'Neill J. (2014). AMR Review Paper-Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *AMR Review Paper*, 1, 2-14.
- Oelschlaeger P. (2021).  $\beta$ -Lactamases: Sequence, structure, function, and inhibition. *Biomolecules*, 11(7), 986.



- Olaitan A. O., Morand S., Rolain J. M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology*, 5, 643.
- Osei Sekyere J. (2019). *Mcr* colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods. *Microbiologyopen*, 8(4), e00682
- Phe K., Lee Y., McDanel P. M., Prasad N., Yin, T., Figueroa D. A., Musick W. L., Cottreau J. M., Hu M., Tam V. H. (2014). *In Vitro* Assessment and Multicenter Cohort Study of Comparative Nephrotoxicity Rates Associated with Colistimethate versus Polymyxin B Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(5), 2740-2746.
- Poirel L., Jayol A., Nordmann P. (2017). Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clinical microbiology reviews*, 30(2), 557-596.
- Reygaert W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482-501.
- Rodríguez-Santiago J., Cornejo-Juárez P., Silva-Sánchez J., Garza-Ramos U. (2021). Polymyxin resistance in *Enterobacterales*: overview and epidemiology in the Americas. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 58(5), 106426.
- Rosch J. W., Caparon M. G. (2005). The ExPortal: an organelle dedicated to the biogenesis of secreted proteins in *Streptococcus pyogenes*. *Molecular microbiology*, 58(4), 959-968.
- Salzberger B. (2023). *Therapie-Handbuch-Infektionskrankheiten und Impfungen*. Urban & Fischer. Kapitel 15 - Infektionen mit Bakterien aus der Familie *Enterobacteriaceae*. Pages 77-79, ISBN 9783437238178
- Sandhu B. K., Edwards A. N., Anderson S. E., Woods E. C., McBride S. M. (2019). Characterization of a  $\beta$ -lactamase that contributes to intrinsic  $\beta$ -lactam resistance in *Clostridioides difficile*. *BioRxiv*, 630020.
- Sanikhani R., Akbari M., Hosseinzadeh M., Siavash M., Badmasti F., Solgi H. (2024). Outbreak of colistin and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST16 co-producing NDM-1 and OXA-48 isolates in an Iranian hospital. *BMC microbiology*, 24(1), 59.

- Shahzad S., Willcox M. D., Rayamajhee B. (2023). A Review of Resistance to Polymyxins and Evolving Mobile Colistin Resistance Gene (*mcr*) among Pathogens of Clinical Significance. *Antibiotics*, 12(11), 1597.
- Smelikova E., Tkadlec J., Krutova M. (2022). How to: screening for *mcr*-mediated resistance to colistin. *Clinical Microbiology and Infection*, 28(1), 43-50.
- Smith W. P., Wucher B. R., Nadell C. D., Foster K. R. (2023). Bacterial defences: mechanisms, evolution and antimicrobial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 1-16.
- Soler N., Forterre P. (2020). Vesiduction: the fourth way of HGT. *Environmental Microbiology*, 22(7), 2457-2460.
- Stefaniuk E. M., Tyski S. (2019). Colistin resistance in *Enterobacterales* strains—a current view. *Polish journal of microbiology*, 68(4), 417-427.
- Terveer E. M., Nijhuis R. H., Crobach M. J., Knetsch C. W., Veldkamp K. E., Gooskens J., Kuijper E. J., Claas E. C. (2017). Prevalence of colistin resistance gene (*mcr-I*) containing *Enterobacteriaceae* in feces of patients attending a tertiary care hospital and detection of a *mcr-I* containing, colistin susceptible *E. coli*. *PLoS One*, 12(6), e0178598.
- Tkadlec J., Kalova A., Brajerova M., Gelbicova T., Karpiskova R., Smelikova E., Nyc O., Drevinek P., Krutova M. (2021). The intestinal carriage of plasmid-mediated colistin-resistant *Enterobacteriaceae* in tertiary care settings. *Antibiotics*, 10(3), 258.
- Tooke C. L., Hinchliffe P., Bragginton E. C., Colenso C. K., Hirvonen V. H., Takebayashi Y., Spencer J. (2019).  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of molecular biology*, 431(18), 3472-3500.
- Trimble M. J., Mlynarcik P., Kolar M., Hancock R. E. (2016). Polymyxin: alternative mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(10), a025288.

- Uddin T. M., Chakraborty A. J., Khusro A., Zidan B. R. M., Mitra S., Emran T. B., Dhama K., Ripon M. K. H., Gajdács M., Sahibzada M. U. K., Hossain M. J., Koirala N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of infection and public health*, 14(12), 1750-1766.
- Wang C., Feng Y., Liu L., Wei L., Kang M., Zong Z. (2020a). Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 508-516.
- Wang R., Van Dorp L., Shaw L. P., Bradley P., Wang Q., Wang X., Jin L., Zhang Q., Liu Y., Rieux A., Dorai-Schneiders T., Weinert L. A., Iqbal Z., Didelot X., Wang H., Balloux F. (2018a). The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nature communications*, 9(1), 1179.
- Wang X., Wang Y., Zhou Y., Li J., Yin W., Wang S., Zhang S., Shen J., Shen Z., Wang Y. (2018b). Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging microbes & infections*, 7(1), 1-9.
- Wang Y., Xu C., Zhang R., Chen Y., Shen Y., Hu F., Liu D., Lu J., Guo Y., Xia X., Jiang J., Wang X., Fu Y., Yang L., Li J., Cai C., Yin D., Che J., Fan R., Wang Y., Qing Y., Li Y., Liao K., Chen H., Zou M., Liang L., Tang J., Shen Z., Wang S., Yang X., Wu C., Xu S., Walsh T. R., Shen J. (2020b). Changes in colistin resistance and *mcr-1* abundance in *Escherichia coli* of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: an epidemiological comparative study. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(10), 1161-1171.
- Weston N., Sharma P., Ricci, V., Piddock L. J. (2018). Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in *Enterobacteriaceae*. *Research in microbiology*, 169(7-8), 425-431.
- Xavier B. B., Lammens C., Ruhai R., Kumar-Singh S., Butaye P., Goossens H., Malhotra-Kumar S. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Eurosurveillance*, 21(27), 30280.

- Yang Y. Q., Li Y. X., Lei C. W., Zhang A. Y., Wang H. N. (2018). Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(7), 1791-1795.
- Yin J., Meng Q., Cheng D., Fu J., Luo Q., Liu Y., Yu Z. (2020). Mechanisms of bactericidal action and resistance of polymyxins for Gram-positive bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 104, 3771-3780.
- Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh T. R, Shen J, Wang Y. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *MBio*, 8(3), 10-1128

## Online:

National Center for Biotechnology Information (NCBI): *Enterobacteriaceae*. (2023) [online]  
[navštíveno 10. 11. 2023] Dostupné z  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh?Db=mesh&Cmd=DetailsSearch&Term=%22Enterobacteriaceae%22%5BMeSH+Terms%5D>

National Center for Biotechnology Information (NCBI): Gene\_family: mcr-1, (2024a) [online]  
[navštíveno 14. 2. 2024] Dostupné z  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene\\_family:mcr-1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene_family:mcr-1)

National Center for Biotechnology Information (NCBI): Gene\_family: mcr-2, (2024b) [online]  
[navštíveno 5. 4. 2024] Dostupné z  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene\\_family:mcr-2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene_family:mcr-2)

National Center for Biotechnology Information (NCBI): Gene\_family: mcr-3, (2024c) [online]  
[navštíveno 5. 4. 2024] Dostupné z  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene\\_family:mcr-3](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene_family:mcr-3)

National Center for Biotechnology Information (NCBI): Gene\_family: mcr-4, (2024d) [online]  
[navštíveno 14. 2. 2024] Dostupné z  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene\\_family:mcr-4](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene_family:mcr-4)

National Center for Biotechnology Information (NCBI): Gene\_family: mcr-5, (2024e) [online]  
[navštíveno 14. 2. 2024] Dostupné z  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene\\_family:mcr-5](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene_family:mcr-5)

National Center for Biotechnology Information (NCBI): Gene\_family: mcr-6, (2024f) [online]  
[navštíveno 5. 4. 2024] Dostupné z  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene\\_family:mcr-6](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene_family:mcr-6)

National Center for Biotechnology Information (NCBI): Gene\_family: mcr-7, (2024g) [online]  
[navštíveno 5. 4. 2024] Dostupné z  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene\\_family:mcr-7](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene_family:mcr-7)

National Center for Biotechnology Information (NCBI): Gene\_family: mcr-8, (2024h) [online]  
[navštíveno 5. 4. 2024] Dostupné z  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene\\_family:mcr-8](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene_family:mcr-8)

National Center for Biotechnology Information (NCBI): Gene\_family: mcr-9, (2024i) [online]  
[navštíveno 5. 4. 2024] Dostupné z  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene\\_family:mcr-9](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene_family:mcr-9)

National Center for Biotechnology Information (NCBI): Gene\_family: mcr-10, (2024j) [online]  
[navštíveno 14. 2. 2024] Dostupné z  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene\\_family:mcr-10](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene_family:mcr-10)

Shatri G., Tadi P. (2023). Polymyxin. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing. [online]  
[navštíveno 22. 11. 2023] Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557540/>