



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ENTEROBACTER SPP. REZISTENTNÉ K BETA-LAKTAMOVÝM ANTIBIOTIKÁM Z MESTSKÝCH A NEMOCNIČNÝCH ODPADNÝCH VÔD

ENTEROBACTER SPP. RESISTANT TO BETA-LACTAM ANTIBIOTICS FROM URBAN AND HOSPITAL WASTEWATER

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Petra Kocúrová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Iva Sukkar, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1707/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Petra Kocúrová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Mgr. Iva Sukkar, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Enterobacter spp. rezistentné k beta–laktamovým antibiotikám z mestských a nemocničných odpadných vôd

Zadání diplomové práce:

Ciele diplomovej práce:

1. Detekcia izolátov Enterobacter spp. rezistentných k beta–laktamovým antibiotikám z mestských a nemocničných odpadných vôd a z rieky v blízkosti čistiarne odpadných vôd.
2. U získaného súboru izolátov Enterobacter spp. stanoviť mechanizmus rezistencie k beta–laktamovým antibiotikám a fenotypový profil rezistencie ku klinicky významným antibiotikám pomocou metód molekulárnej biológie a mikrobiológie.
3. Porovnať klonálnu príbuznosť izolátov Enterobacter spp. s dôrazom na porovnanie izolátov pochádzajúcich z rôznych lokalít a typu vôd.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Petra Kocúrová
studentka

Mgr. Iva Sukkar, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Rastúci výskyt rezistentných baktérií k antibiotikám predstavuje obrovské riziko pre verejné zdravie. *Enterobacter* spp. je bežne rozšírená baktéria v životnom prostredí, zároveň je ale dokumentovaná ako častá príčina ochorení človeka. *Enterobacter* spp. rezistentný k cefalosporínom a karbapenémom je stále častejšie celosvetovo detekovaný ako v nemocničnom prostredí, tak aj mimo neho. Táto diplomová práca skúma výskyt kmeňov *Enterobacter* spp. rezistentných k β -laktámovým antibiotikám, najmä v odpadových vodách, ale aj v prečistených vodách, ktoré sú vypúšťané do životného prostredia.

Cieľom práce bolo charakterizovať súbor 205 kmeňov *Enterobacter* spp. selektovaných na médiu s prídavkom cefotaximu a meropenemu. Vzorky vôd boli odobrané z troch krajských miest v Českej Republike a pochádzali z nemocničnej odpadovej vody, z prítoku a odtoku čističky odpadových vôd (ČOV), z rieky nad ČOV a rieky pod ČOV. Metódou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) bolo v izolátoch hľadaných 8 vybraných génov kódujúcich produkciu širokospektrálnych β -laktamáz (ESBL; CTX-M, GES) a karbapenemáz (GES, IMI/NMC-A, IMP, KPC, NDM, OXA-48, VIM). Tiež bol stanovený fenotyp produkcie β -laktamáz testom Mastdisc a citlivosti na 24 rôznych antibiotík mikrodilučnou metódou. U izolátov nesúcich hľadaný gén bola vykonaná klonálna analýza metódou restričného štiepenia v kombinácii s pulznou gélovou elektroforézou (PFGE).

Z celkovo 205 kmeňov nieslo 36 izolátov hľadaný gén pre produkciu β -laktamáz. Tieto izoláty pochádzali zväčša z nemocničnej odpadovej vody (n=31) zo všetkých vzorkovaných lokalít A, B a C. Taktiež bol zachytený jeden izolát v prítoku ČOV v lokalite B a štyri izoláty pochádzali z odtoku ČOV v lokalitách A a B. U izolátov boli detekované nasledujúce záujmové gény: *bla*_{GES} (n=16), *bla*_{CTX-M} (n=24), *bla*_{OXA-48} (n=1) a *bla*_{NMC-A} (n=1), v ojedinelých prípadoch bola detekovaná kombinácia dvoch génov u jedného izolátu. Všetky charakterizované izoláty (n=36) vykazovali multirezistentný profil. Bola zaznamenaná vysoká rezistencia k aminoglykozidom (76,9 %) s výnimkou amikacínu (19,4 %). V prípade karbapenémov bola pozorovaná rezistencia na ertapeném (77,8 %), naopak veľká časť kmeňov bola citlivá na meropeném, kde rezistencia bola zaznamenaná iba u 13,9 % izolátov. U antibiotík zo skupiny cefalosporínov všetky izoláty vykazovali rezistenciu na antibiotiká cefazolín a cefuroxím (100 %), nižia miera rezistencie bola zaznamenaná u antibiotík cefoperazón (80,6 %), cefotaxím (77,8 %) a cefepím (69,4 %). Najnižšia rezistencia u tejto skupiny antibiotík bola zaznamenaná u antibiotika cefoperazón/sulbaktám (33,3 %). Všetky vybrané izoláty vykazovali rezistenciu k tetracyklínovým antibiotikám. Fenotypovými testami bola najčastejšie zaznamenaná produkcia serínovej karbapenemázy (50 %), kam sú radené určité varianty β -laktamázy GES. Porovnanie makrorestričných profilov poukázalo na vysokú diverzitu medzi izolátmi reprezentovanou 20 rôznymi klastrami, pričom príbuzné izoláty pochádzali vždy z rovnakej lokality.

Odpadové vody hrajú kľúčovú rolu v šírení antibiotickej rezistencie. V rámci tejto diplomovej práce boli detekované kmene *Enterobacter* spp. s klinicky významnou rezistenciou k cefalosporínom a karbapenémom. Tieto kmene boli zachytené najmä v nemocničných odpadových vodách, ale aj na odtoku ČOV, kedy súčasné procesy v ČOV nedokážu eliminovať všetky baktérie, ktoré sa následne dostávajú do životného prostredia. Pre obmedzenie antibiotickej rezistencie je potrebné neustále zvyšovať efektívnosť čistenia odpadových vôd a zároveň monitorovať jej šírenie aj mimo nemocničné prostredie.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: *Enterobacter* spp.; antibiotiká; rezistencia; odpadové vody; β -laktamázy

ABSTRACT

The increasing prevalence of antibiotic-resistant bacteria pose a huge risk for public health. *Enterobacter* spp. is a common in the environment but it is also documented as a frequent cause of human disease. *Enterobacter* spp. resistant to cephalosporins and carbapenems is increasingly detected globally both in and out of hospital setting. This thesis examines the occurrence of *Enterobacter* spp. strains resistant to β -lactam antibiotics especially in wastewaters but also in treated water discharged into the environment.

The aim of this study was to characterize a set of 205 strains of *Enterobacter* spp. selected on medium supplemented with cefotaxime and meropenem. The water samples were collected from three regional cities in the Czech Republic and originated from hospital wastewater, inflow and outflow of municipal wastewater treatment plant (WWTP), from a river above and below the WWTP. The isolates were screened for presence of eight genes encoding production of broad-spectrum β -lactamases (ESBL; CTX-M, GES) and carbapenemases (GES, IMI/NMC-A, IMP, KPC, NDM, OXA-48, VIM) by the polymerase chain reaction (PCR) method. The phenotype of isolates carrying the gene of interest was tested for β -lactamase production by the Mastdisc test and susceptibility to 24 different antibiotics by microdilution method. The phylogenetic relatedness was determined using restriction digestion in combination with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

From total of 205 strains, 36 isolates carried the gene of interest for β -lactamase production. These isolates originated mostly from hospital wastewater (n=31) of all sampled sites (A, B and C). Also one isolate was detected in the WWTP influent in site B and four isolates came from the WWTP effluent in sites A and B. The following genes of interest were detected among the isolates: *bla*_{GES} (n=16), *bla*_{CTX-M} (n=24), *bla*_{OXA-48} (n=1) and *bla*_{NMC-A} (n=1) a combination of two genes were detected in one isolate. All characterized isolates (n=36) showed a multidrug-resistant profile. High resistance to aminoglycosides was reported (76,9 %) with the exception of amikacin (19,4 %). In the case of carbapenems, resistance to ertapenem was observed (77,8 %), while a majority of strains were susceptible to meropenem, where resistance was detected only in 13,9 % of cases. Different resistance profile has been reported to cephalosporin antibiotics. All tested isolates showed resistance to antibiotics cefazolin and cefuroxime (100 %), lower rates of resistance were reported to antibiotics cefoperazone (80,6 %), cefotaxime (77,8 %) and cefepime (69,4 %). The lowest resistance in this group of antibiotics was found to cefoperazone/sulbactam (33,3 %). All selected isolates showed resistance to tetracycline antibiotics. Serine carbapenemase production (50 %) was the most frequently detected by phenotypic tests which is produced certain variants of β -lactamase GES. Comparison of macrorestrictions profiles showed a high diversity among isolates represented by 20 different clusters, the related isolates originated from the same location.

Wastewaters play a key role in the spread of antibiotics resistance. In this thesis, *Enterobacter* spp. strains with clinically significant resistance to cephalosporins and carbapenems were detected. These strains were detected mainly in hospital wastewaters but also in WWTP effluent. The current WWTP processes are unable to eliminate all bacteria that subsequently enter the environment. To limit antibiotic resistance the continuous improvement of the efficiency of wastewater treatment is necessary and at the same time the monitoring of its spread outside the hospitals is crucial.

KEYWORDS: *Enterobacter* spp., antibiotics, resistance, wastewater, β -lactamase

KOCÚROVÁ, Petra. *Enterobacter spp. rezistentné k beta-laktamovým antibiotikám z mestských a nemocničných odpadných vôd* [online]. Brno, 2022. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138753>. Diplomová práca. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnológií. Vedoucí práce Mgr. Iva Sukkar Ph.D.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE:

Rada by som sa poďakovala vedúcej svojej diplomovej práce Mgr. Ive Sukkar, Ph.D. za možnosť pracovať pod jej skvelým a profesionálnym vedením, ale najmä za jej ľudský, milý, trpezlivý a ochotný prístup. Práca bola súčasťou projektu Celogenómová sekvenácia a metagenomika ako nástroje k pochopeniu ciest prenosu rezistentných baktérií k antibiotikám z nemocníc do prostredia NU20J-09-00040 agentúry pre zdravotnícky výskum Českej republiky, ktorý bol financovaný Ministerstvom zdravotníctva Českej republiky.

OBSAH

1	ÚVOD.....	10
2	TEORETICKÁ ČASŤ	11
2.1	Antimikrobiálne látky.....	11
2.1.1	História antimikrobiálnych látok.....	11
2.1.2	Klasifikácia antibiotík	12
2.1.3	β -laktámové antibiotiká	13
2.1.4	β -laktamázové inhibítory	17
2.2	Antimikrobiálna rezistencia.....	18
2.3	Mechanizmy antimikrobiálnej rezistencie.....	20
2.3.1	Inaktivácia antibiotika produkciou enzýmov	20
2.3.2	Efluxné pumpy	20
2.3.3	Modifikácia cieľovej molekuly	21
2.3.4	Znížená permeabilita vonkajšej membrány.....	21
2.4	Rezistencia k β -laktámom.....	22
2.4.1	β -laktamázy.....	22
2.4.2	Výskyt karbapenemáz v Českej republike.....	23
2.5	Génová podstata prenosu rezistencie.....	26
2.5.1	Konjugácia.....	27
2.5.2	Transdukcia	27
2.5.3	Transformácia.....	27
2.6	Mobilné genetické elementy.....	29
2.6.1	Plazmidy	29
2.6.2	Transpozóny	29
2.6.3	Integróny a génové kazety.....	30
2.7	<i>Enterobacter</i> spp.	31
2.7.1	Rezistencia <i>Enterobacter</i> spp.	31
2.8	Odpadové vody.....	33
2.8.1	Štruktúra ČOV	33
3	CIELE PRÁCE	36
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	37
4.1	Použitý materiál a prístroje.....	37
4.1.1	Zbierka <i>Enterobacter</i> spp. rezistentných k β -laktámom z odpadových vôd.....	37
4.1.2	Použité zbierkové mikroorganizmy	38
4.1.3	Antimikrobiálne látky pre selektívnu kultiváciu a fenotypové testy rezistencie	38
4.1.4	Kultivačné médiá.....	40
4.1.5	Chemikálie na PCR, gélovú elektroforézu, pulznú gélovú elektroforézu a MALDI	40
4.1.6	Komerčné kity	40
4.1.7	Použité prístroje a software	40
4.1.8	Použité laboratórne pomôcky	41
4.2	Metodiky	43

4.2.1	Detekcia génov kódujúcich rezistenciu na β -laktámy	43
4.2.2	Hmotnostná spektrometria MALDI-TOF	46
4.2.3	Fenotypové testy rezistencie.....	46
4.2.4	Určenie epidemiologickej príbuznosti metódou restričného štiepenia DNA s využitím pulznej gélovej elektroforézy	48
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA	51
5.1	Vyhodnotenie selektívnej kultivácie	51
5.2	Typizácia a charakterizácia bakteriálnych izolátov.....	52
5.2.1	Detekcia génov kódujúcich produkciu β -laktamáz.....	52
5.3	Vyhodnotenie fenotypových testov rezistencie.....	55
5.3.1	Výsledok produkcie β -laktamáz	55
5.3.2	Vyhodnotenie fenotypu rezistencie k 24 antibiotikám	56
5.4	Základná charakteristika jednotlivých izolátov pomocou PFGE	59
5.4.1	Súhrn charakterizácie 36 izolátov <i>Enterobacter</i> spp.	60
6	ZÁVER.....	65
7	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	66
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	73
9	PRÍLOHY	74
9.1	Príprava roztokov	74
9.1.1	Príprava kultivačných a kryoprotektívnych médií.....	74
9.1.2	Príprava antimikrobiálnych látok	74
9.1.3	Príprava zásobných roztokov pre PFGE.....	74
9.1.4	Príprava pracovných roztokov pre PFGE.....	75
9.2	Zoznam použitých primerov.....	76
9.3	Parametre PCR programov.....	77

1 ÚVOD

Prvé liečivé účinky antimikrobiálnych látok sa využívali dlho pred príchodom modernej medicíny. Už v starovekom Egypte ľudia využívali plesnivý chlieb na liečbu rán a popálenín. V stredoveku liečiteľia z Číny a Grécka používali zatuchnuté tkaniny pri liečbe rôznych ochorení. V roku 1928 škótsky lekár a mikrobiológ Alexander Fleming náhodou objavil pri svojom skúmaní vplyv antibiotika penicilínu produkovaného hubou *Penicillium notatum*. Išlo o veľký vedecký objav, ktorý spôsobil ďalšie bádanie účinku a produkcie antimikrobiálnych látok. Boli objavené nové antibiotické triedy, ktoré sa začali využívať v klinickej praxi. Antibiotiká boli považované za „zázračné lieky“, pretože zachránili mnoho ľudských životov. V roku 1947 bol prvýkrát definovaný pojem „antibiotikum“ ako látka, ktorá sa získava z mikroorganizmov a môže spôsobiť smrť alebo zastaviť rast iných mikroorganizmov.

V poslednej dobe však neustále narastá výskyt infekčných ochorení spôsobených vplyvom rezistentných baktérií. Ide hlavne o klinicky významné antibiotiká ako sú cefalosporíny tretej generácie a karbapenémy. Rezistentné kmene predstavujú významné ohrozenie verejného zdravia, čo má za následok zvyšujúcu mortalitu a morbiditu pacientov a tiež zvýšenú záťaž pre svetovú ekonomiku. Na rezistentné baktérie umiera každým rokom čoraz viac ľudí. Odhaduje sa, že na infekcie spôsobené rezistentnými baktériami každý rok zomiera okolo 700 tisíc ľudí. Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) vydala varovnú správu, že pokiaľ sa situácia nezlepší a šírenie antibiotickej rezistencie bude pokračovať súčasným tempom, tak by na infekcie spôsobené rezistentnými kmeňmi mohlo v roku 2050 umrieť až 10 miliónov ľudí. Tento problém vzniká nesprávnym nakladaním s antimikrobiálnymi látkami v humánnej a veterinárnej medicíne a v poľnohospodárstve.

Kľúčovú rolu na proces šírenia rezistencie predstavujú mobilné genetické elementy. Majú schopnosť autoreplikácie alebo majú vlastné mechanizmy, pomocou ktorých sa začlenia do chromozómu alebo plazmidu a replikujú sa zároveň s replikáciou chromozómu alebo plazmidu. Vďaka tomu, že sa dokážu šíriť aj medzidruhovo a adaptujú sa na rôzne podmienky, dochádza k nežiadúcej evolúcii patogénnych druhov baktérií.

Medzi jednotlivými ekosystémami tvorí spojenie vodné prostredie a čistiare odpadových vôd (ČOV) predstavujú miesta, kde dochádza k spojeniu odpadových vôd ako z miest, tak aj z nemocníc, priemyslu či poľnohospodárstva. ČOV sú považované za potenciálne rezervoáre a miesta selekcie a šírenia rezistencie medzi baktériami. Rezistentné baktérie nachádzajúce sa v prečistených odpadových vodách následne prenikajú do životného prostredia, čím dochádza k rozšíreniu výskytu rezistentných baktérií vo voľnej prírode. Znalosti o rezistencii na antibiotiká v odpadových vodách sa v posledných rokoch výrazne zvýšili s pokrokom molekulárnych metód. Aby sa predišlo nežiadúcim vplyvom antibiotickej rezistencie na verejné zdravie, je dôležité sledovať tieto nebezpečné patogény aj mimo nemocničného prostredia ako napríklad v odpadových vodách.

Táto práca je súčasťou projektu zameraného na porozumenie šírenia rezistentných izolátov do životného prostredia prostredníctvom nemocničných a mestských odpadových vôd v Českej republike. Pozornosť je venovaná významnému rodu *Enterobacter*, kde narastajúci záchyt kmeňov *Enterobacter* spp. rezistentný ku klinicky významným antibiotikám je dokumentovaný celosvetovo ako z nemocničného, tak zo životného prostredia.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

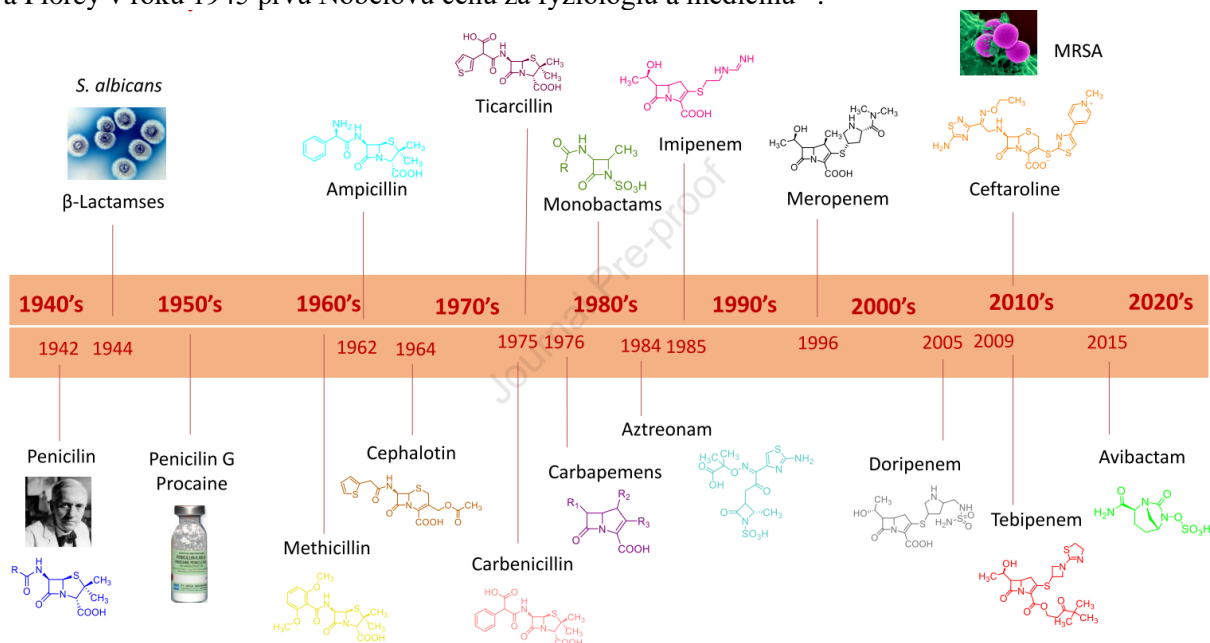
2.1 Antimikrobiálne látky

2.1.1 História antimikrobiálnych látok

Prví výskumníci, ktorí dokázali rozpoznať klinický potenciál mikroorganizmov a ich produktov ako terapeutické činidlá, boli Pasteur a Joubert v roku 1877. Pozorovali rýchly rast bacilu antraxu v sterilnom moči, avšak tiež si všimli, že sa nedokáže množiť. Bacil bol inhibovaný, aj keď boli do moču súčasne naočkované bežné baktérie zo vzduchu. Podobné výsledky dosiahli pomocou rovnakých experimentov u zvierat. Nakoniec skonštatovali, že život ničí život oveľa viac medzi nižšími druhmi organizmov ako medzi vyššími. Dospeli k záveru, že bacil antraxu sa môže masívne podávať zvieratám bez toho, aby spôsobil akékoľvek zranenie, ak sa súčasne do zvierat naočkujú aj „obyčajné baktérie“ v ten istý čas. Uvedomili si, že tento fakt môže byť nápomocný pre vývoj terapeutík^[1].

V roku 1928 si Alexander Fleming všimol, že niektoré Petriho misky naočkované *Staphylococcus* spp. zabudnuté na laboratórnom stole boli náhodne infikované hubou nazývanou *Penicillium notatum*. Tiež pozoroval priehľadnú zónu okolo kontaminujúcej plesne, ktorá naznačovala lýzu a zníženú rýchlosť rastu. To naznačovalo, že huba môže produkovať nejakú baktericídnu zlúčeninu. V roku 1932 Fleming uverejnil kompletne výsledky svojej práce na identifikácii novej antimikrobiálnej látky z metabolitov *Penicillium notatum*, ktoré pomenoval ako penicilín. Spočiatku Flemingove zistenia nevzbudili záujem verejnosti a až do vypuknutia druhej svetovej vojny nebol penicilín terapeuticky využitý^[2].

Ernst Boris Chain a Lord Howard Florey pokračovali vo Flemingovom výskume a v roku 1940 izolovali penicilín a docielili jeho priemyselnú výrobu (viď. *Obrázok 1*). O rok neskôr uskutočnil Edward Abraham chromatografické čistenie penicilínu, čím sa uskutočnili prvé experimenty účinku antimikrobiálnych látok na zvieratách. V roku 1943 Robert Robinson objasnil chemickú štruktúru penicilínu, čo poskytlo prostriedky pre budúcu syntézu. Za tieto objavy spoločne získali Fleming, Chain a Florey v roku 1945 prvú Nobelovu cenu za fyziológiu a medicínu^[1].

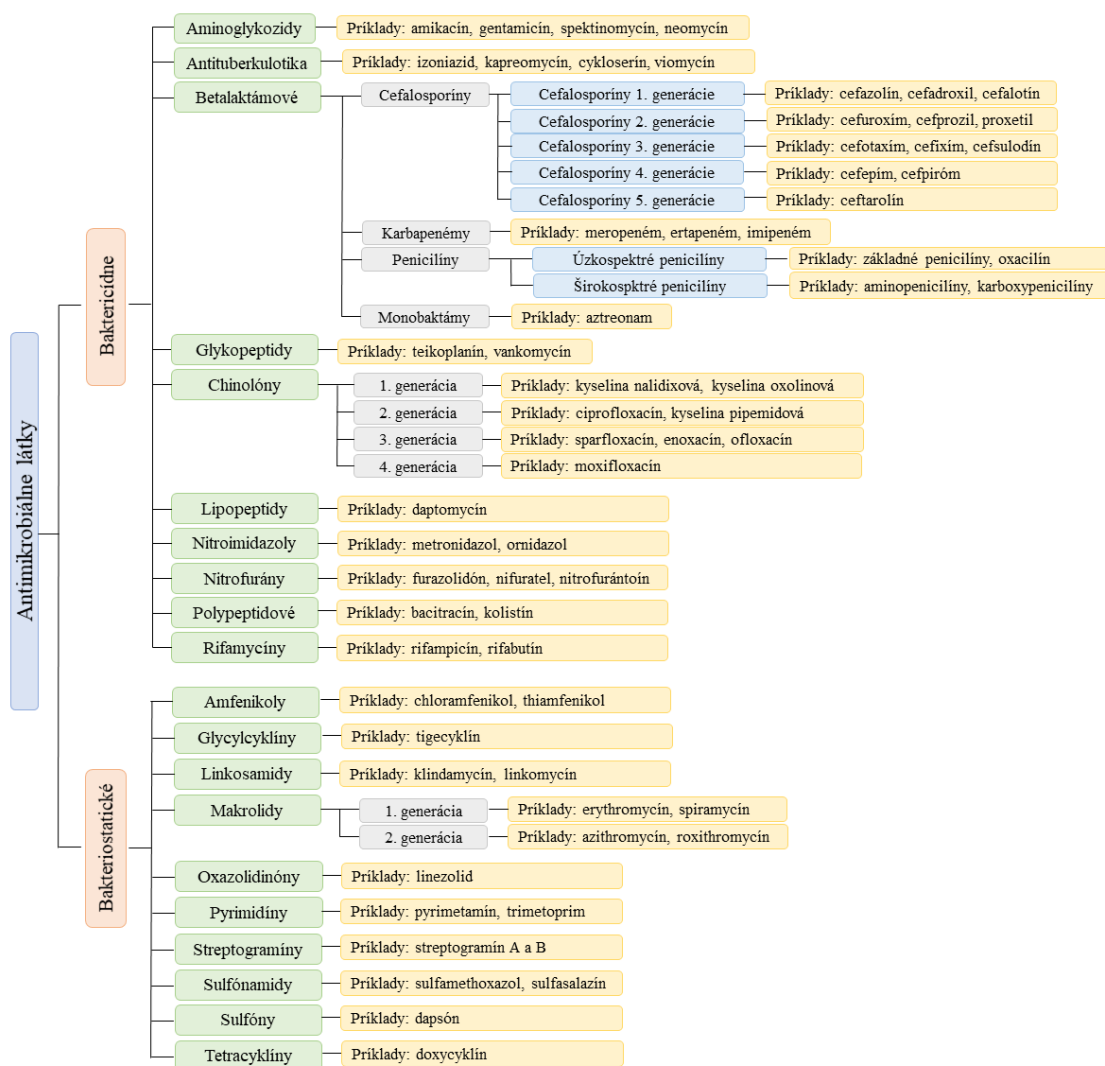


Obrázok 1 Časový prehľad objavenia β-laktámových antibiotík^[1]

2.1.2 Klasifikácia antibiotík

Antimikrobiálne látky sú definované ako chemické látky, ktoré sú produkované mikroorganizmami. Pojem antibiotiká je komplexnejší a zahŕňa aj polosyntetické liečivá. Antimikrobiálne látky patria medzi širokú skupinu látok, ktoré majú inhibičný účinok na rast ostatných mikroorganizmov. Z hľadiska delenia sa dajú klasifikovať na základe rôznych kritérií. Na základe cieľového mikroorganizmu sa dajú rozdeliť na antivirotiká, antimykotiká, antiparazitiká a antibiotiká. Medzi ďalšiu klasifikáciu patrí delenie podľa spektra účinku, kde sa rozdeľujú na úzkospektrálne a širokospektrálne. Ďalšie kritérium zahŕňa napríklad chemickú štruktúru antimikrobiálnej látky a od toho aj mechanizmus jeho účinku. Z tohto hľadiska sa definujú na dve základné skupiny a to s bakteriostatickým a baktericídnym účinkom (viď. Obrázok 2). Táto klasifikácia je využívaná najmä v oblasti medicíny a infekčných ochorení. Rozdiel medzi týmito dvoma skupinami naznačuje, že baktericídne antibiotiká majú silnejší antimikrobiálny účinok a sú schopné usmrtiť baktérie. Na rozdiel od nich bakteriostatické antibiotiká vyžadujú fagocytujúcu bunku pre zastavenie rastu baktérií. Preto sa predpokladá, že bez účinnej imunitnej odpovede je táto skupina antibiotík menej účinná^[3].

Antibiotiká sa delia podľa mechanizmu účinku na 5 základných skupín. Patrí tu inhibícia syntézy bunkovej steny (β -laktámové antibiotiká, vankomycín, bacitracín), inhibícia syntézy proteínov bunkovej steny (aminoglykozidy, tetracyklíny, makrolidy, linkozamidy a chloramfenikol), zmena permeability membrány (polymyxín, amfotericín), inhibícia syntézy DNA (grizeofulvín, rifampicín) a zásah do intermediárneho metabolizmu bunky (sulfónamidy)^[4].



Obrázok 2 Základná klasifikácia antimikrobiálnych látok (autor Kocúrová)

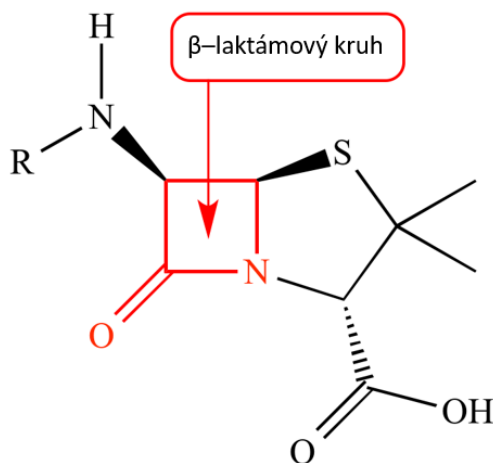
2.1.3 β -laktámové antibiotiká

β -laktámové antibiotiká sú jednou z najčastejšie predpisovaných skupín liekov s mnohými klinickými indikáciami. Ich nástup v 30. rokoch 20. storočia výrazne zmenil boj proti bakteriálnym infekčným ochoreniam. Ich používanie sa však stretáva so znepokojujúcim fenoménom antimikrobiálnej rezistencie, ktorá naďalej predstavuje veľký zdravotný problém^[5].

Z biochemického hľadiska majú tieto liečivá spoločnú vlastnosť, ktorou je β -laktámový kruh, ktorý je vysoko reaktívny. Jeho štruktúra pozostáva z troch atómov uhlíku, jedného atómu dusíku a ketoskupiny (viď. Obrázok 3). Ich rozdelenie závisí od chemickej povahy začleneného kruhu s jednotkou β -laktámového kruhu. Rozdeľujú sa na penicilíny, cefalosporíny, karbapenémy a monobaktámy. Prvé tri skupiny majú spoločnú bicyklickú štruktúru (penicilíny, cefalosporíny a karbapenémy), štvrtá skupina má monocyklickú štruktúru (monobaktámy)^[6].

Antimikrobiálne spektrum účinnosti β -laktámových antibiotík je ovplyvnené fyzikálne-chemickými faktormi súvisiacimi s ich štruktúrou. Všeobecne platí, že aktivitu voči grampozitívnym baktériám zvyhodňuje lipofilita, zatiaľ čo hydrofilita zvyhodňuje pôsobenie voči gramnegatívnym baktériám^[1].

Každá nová trieda β -laktámov bola vyvinutá buď s cieľom rozšíriť spektrum účinku na ďalšie bakteriálne druhy, alebo s cieľom riešiť špecifické mechanizmy rezistencie. Rezistencia na β -laktámy je spôsobená predovšetkým enzýmami β -laktamázami produkovanými baktériami, ktoré hydrolyzujú β -laktámový kruh, čím sa liečivo inaktivuje^[7].

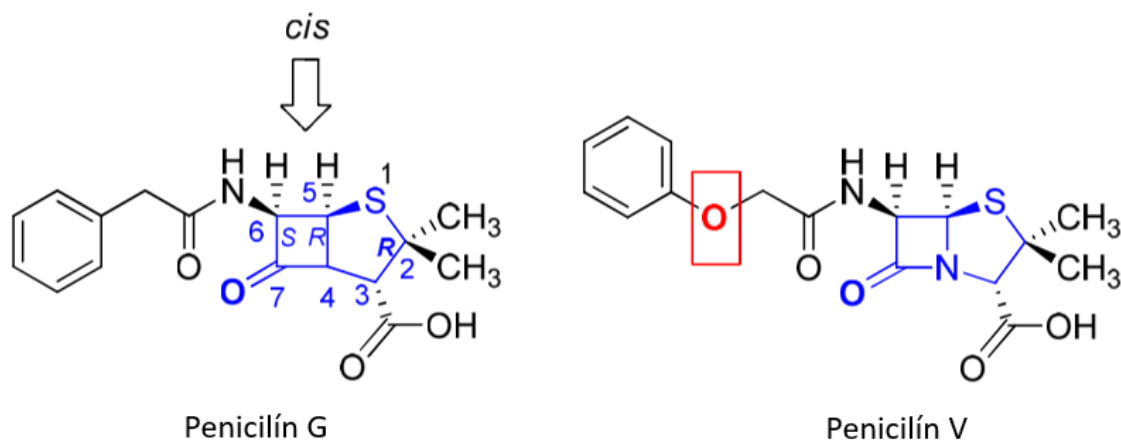


Obrázok 3 Základná štruktúra β -laktámových antibiotík^[8]

2.1.3.1 Penicilíny

Skupina penicilínov je jednou z najcennejších skupín antibiotík v primárnej starostlivosti. Sú to baktericídne látky, ktoré sa dobre distribuujú organizmom a sú vysoko účinné proti citlivým patogénom. Vývoj syntetických penicilínov rozšíril spektrum aktivity a zvýšil účinnosť týchto liečiv. Výskyt rezistentných kmeňov však v posledných rokoch obmedzil používanie penicilínov. Napriek tomu penicilíny zostávajú liekmi prvej voľby pri mnohých miernych, lokalizovaných infekciách mäkkých tkanív a sú obzvlášť dôležité v špecifických situáciách počas tehotenstva^[9].

Penicilínové antibiotiká (väčšina z nich končí na príponu -icilín) obsahujú jadro 6-aminopenicilanového kruhu (laktám + tiazolidín) a ďalšie reťazce na konci kruhu. Manipuláciou bočným reťazcom je možné vyrobiť stabilnejšie druhy penicilínu. Jedným z prvých penicilínov používaných v klinickej praxi bol benzylpenicilín (penicilín G) a fenoxymetylpenicilín (penicilín V) (viď. Obrázok 4). Penicilín V sa stále používa na liečbu menších infekcií spôsobených citlivými kmeňmi *Streptococcus* spp., je však nahrádzaný stabilnými penicilínmi ako meticilín alebo oxacilín v dôsledku rozsiahleho nárastu kmeňov produkujúcich penicilinázu. Až do objavenia meticilín-rezistentného *Staphylococcus aureus* (MRSA) v roku 1979 boli všetky tieto látky používané ako prvá voľba pri stafylokokových infekciách^[7].



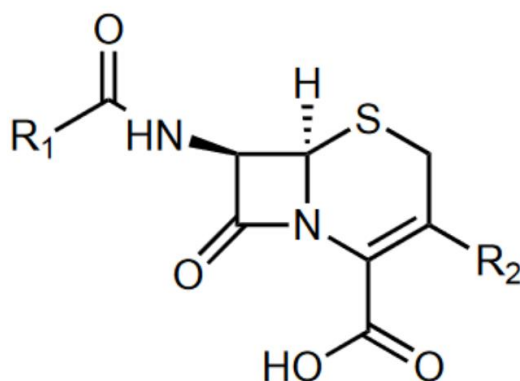
Obrázok 4 Rozdiel medzi penicilínom G a penicilínom V^[1]

2.1.3.2 Cefalosporíny

Táto skupina antibiotík predstavuje veľkú skupinu baktericídnych antimikrobiálnych látok a patrí medzi najčastejšie používané širokospektrálne antibiotikum. Kvôli ich nestabilnej štruktúre však môžu predstavovať vážne zdravotné riziko, ako aj znečistené životné prostredie zapríčinené nesprávnym používaním^[10].

Cefalosporíny sú antimikrobiálne látky rozdelené do piatich generácií na základe ich spektra pôsobenia proti grampozitívnym a gramnegatívnym baktériám. Cefalosporíny prvej generácie sú používané proti väčšine grampozitívnych baktérií, ako aj proti niektorým gramnegatívnym baktériám (napr. *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* a *Klebsiella pneumoniae*). Cefalosporíny druhej generácie sa aplikujú proti *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* a *Bacteroides* spp. Cefalosporíny tretej generácie sú menej využívané proti väčšine grampozitívnych organizmov, ale viac sa používajú proti *Enterobacteriaceae*, *Neisseria* spp. a *Haemophilus influenzae*. Štvrtá generácia cefalosporínov má podobnú aplikáciu ako tretia generácia, ale s dodatočným pokrytím proti gramnegatívnym baktériám s antimikrobiálnou rezistenciou, napr. producentom β -laktamáz. Posledná generácia cefalosporínov sa používa proti meticilín rezistentným stafylokokom a penicilín rezistentným pneumokokom^[11].

Cefalosporíny obsahujú jadro kyseliny 7-aminocefalosporanovej a bočný reťazec obsahujúci 3,6-dihydro-2H-1,3-tiazán (vid'. Obrázok 5). Patria medzi antibiotiká poslednej voľby (rezervné antibiotiká)^[12].

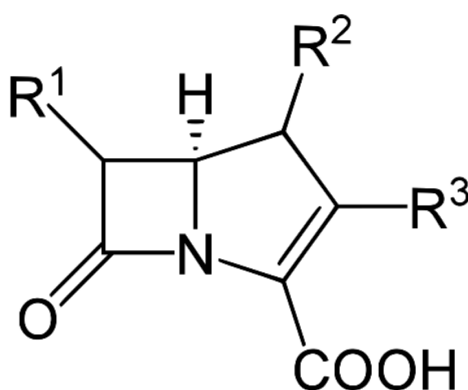


Obrázok 5 Všeobecná chemická štruktúra cefalosporínov^[12]

2.1.3.3 Karbapenémy

Karbapenémy sú podtrieda β -laktámov, ktoré patria medzi vysoko účinné antibiotiká, najmä proti grampozitívnym a gramnegatívnym baktériám. Používajú sa hlavne na liečbu infekcií spôsobených multirezistentnými kmeňmi. Majú jedinečnú verziu jadrovej molekulovej štruktúry. Okrem β -laktámového kruhu obsahujú aj karbapeném, ktorý im dodáva výnimočnú stabilitu voči väčšine enzýmov β -laktamáz, ktoré dokážu inaktivovať nižšie triedy β -laktámov^[13].

Karbapenémové antibiotiká majú podobnú štruktúru ako penicilíny. Ich štruktúra pozostáva z nenasýteného 5-členného kruhu spojeného s β -laktámovým kruhom (vid'. Obrázok 6). Rozdiel sa nachádza v dvojitej väzbe medzi uhlíkom C2 a C3 a v prítomnosti uhlíka miesta síry na C1^[14]. Táto štruktúra poskytuje ochranu proti väčšine β -laktamáz, hoci rezistencia na β -laktámy je významným problémom a vyskytuje sa najmä medzi gramnegatívnymi patogénmi (napr. *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Acinetobacter baumannii*)^[5]. Karbapenemázu produkujúce enterobaktérie sa tiež nazývajú ako „superbaktérie“, pretože vykazujú rezistenciu voči triedam karbapenémom, ktoré sa používajú ako lieky poslednej voľby pri závažných infekciách. Mnohé z génov kódujúcich karbapenemázu sa nachádzajú na plazmidoch, ktoré sa môžu prenášať medzi baktériami. Produkcia karbapenemáz bola detekovaná napríklad u kmeňov *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* a *Enterobacter cloacae*^[15].



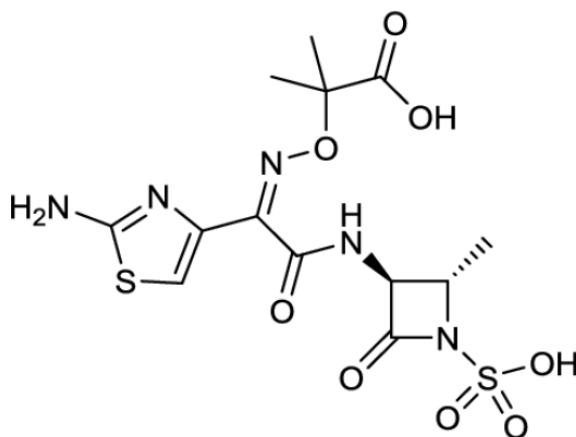
Obrázok 6 Všeobecná chemická štruktúra karbapenémov^[16]

2.1.3.4 Monobaktámy

Táto skupina antibiotík je najviac účinná proti gramnegatívnym baktériám a ich klinická účinnosť spočíva najmä v ich antipseudomonálnej aktivite. O tieto liečivá je čoraz väčší záujem, kvôli ich účinkom na bunky cicavcov. Niekoľko monobaktámov bolo syntetizovaných ako potenciálne protirakovinové látky, niektoré deriváty môžu indukovať apoptózu v širokom spektre nádorových buniek, s malým účinkom na zdravé bunky. Teda, nežiaduci vedľajší účinok na bunky cicavcov sa môže zmeniť na žiaduci účinok na rakovinové bunky. N-metylované deriváty monobaktámov môžu tak spôsobovať poškodenie DNA, zastavenie rastu a apoptózu v bunkových kultúrach cicavcov^[17].

Monobaktámové antibiotiká sú tiež nazývané monocyklické β -laktámy, pretože z hľadiska chemickej štruktúry sú najjednoduchšou triedou β -laktámov. β -laktámový kruh nie je spojený s iným kruhom, a preto vykazuje len malú diverzitu vzhľadom na jeho bočné reťazce. Monocyklické β -laktámové zlúčeniny patria medzi syntetické látky, hoci sa našli v prírode v rôznych pôdnych baktériách. Prvým monobaktámom uvedeným na trh bol aztreonam (vid'. Obrázok 7). V čase jeho uvedenia vykazoval vysokú stabilitu voči hydrolytickým β -laktamázam, avšak k zvýšeniu rezistencie voči tejto látke prispel aj vznik β -laktamáz s rozšíreným spektrom (ESBL) a serínových karbapenemáz^[7]. V súčasnosti sa

monobaktámy používajú najmä na liečbu nozokomiálnych infekcií a je možné ich použiť u pacientov s alergiou na penicilíny^[18].



Obrázok 7 Chemická štruktúra aztreonamu^[19]

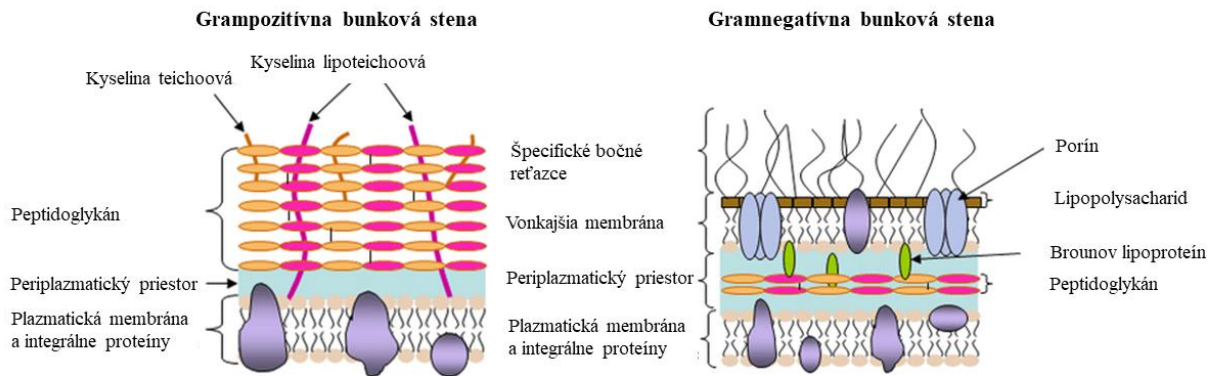
2.1.3.5 Mechanizmus účinku β -laktámových antibiotík

Pre správne pochopenie mechanizmu účinku antibiotík, je potrebné poznať štruktúru bakteriálnej bunkovej steny. Výskum bakteriálnej bunkovej steny, najmä mureínu bol hlbšie študovaný, keď sa zistila súvislosť medzi bunkovou stenou a β -laktámovými antibiotikami. Najstaršia dokumentácia o prítomnosti bakteriálnej bunkovej steny bola zaznamenaná už v 17. storočí. Neskôr dánsky bakteriológ Christian Gram vymyslel postup farbenia, vďaka ktorému mohol pozorovať farebné zmeny pod svetelným mikroskopom. Odvtedy sa stala jeho technika populárna a používaná na klasifikáciu baktérií do dvoch kategórií: gramnegatívne a grampozitívne baktérie^[6].

Peptidoglykán alebo mureín tvoria dôležitú zložku bakteriálnej bunkovej steny, ktorá zabezpečuje jej mechanickú stabilitu (viď. Obrázok 8). U grampozitívnych baktérií je vrstva peptidoglykánového omnoho hrubšia štruktúra (≥ 10 vrstiev), zatiaľ čo u gramnegatívnych baktérií je tenká (jedna alebo dve vrstvy)^[20]. Pokiaľ ide o samotnú štruktúru peptidoglykánového, skladá sa z glykánových reťazcov z disacharidových podjednotiek N-acetylglukozamínu a kyseliny N-acetylmuramínovej. N-acetylmuramínová časť je spojená s vysoko konzervovanými pentapeptidovými alebo tetrapeptidovými kmeňmi (L-alanín-D-izoglutamín-L-lyzín-D-alanín-[D-alanín])^[5].

β -laktámové antibiotiká pôsobia tak, že inhibujú syntézu peptidoglykánovej vrstvy bakteriálnych bunkových stien. Konečný transpeptidačný krok pri syntéze peptidoglykánového uľahčujú transpeptidázy známe ako proteíny viažuce penicilín (PBPs). PBPs sa líšia svojou afinitou k väzbe penicilínu alebo iných β -laktámových antibiotík a zároveň množstvo PBPs sa líši medzi jednotlivými druhmi antibiotík. Štruktúra karbapenémov a ďalších β -laktámov je podobná terminálnemu aminokyselinovému zvyšku D-alanyl-D-alanínu, ktorý sa nachádza na peptidoglykáne. To umožňuje ireverzibilné naviazanie β -laktámov do aktívnych miest PBPs, čím dochádza k inhibícii procesu transpeptidácie peptidoglykánovej vrstvy^[21].

Smrť baktérií je zapríčinená pôsobením β -laktámov inhibujúcich syntézu bunkovej steny a autolytických procesov, ktorých úlohou je tvorba trhlín v bunkovej stene, ktoré slúžia ako miesta pripojenia peptidoglykánových jednotiek. Vďaka tomu dochádza k vytvoreniu slabých miest v štruktúre bunkovej steny, cez ktorú preniká cytoplazmatická membrána. Tá však nie je taká silná aby udržala osmotický tlak bunky, a tak dochádza k jej pretrhnutiu^[22].



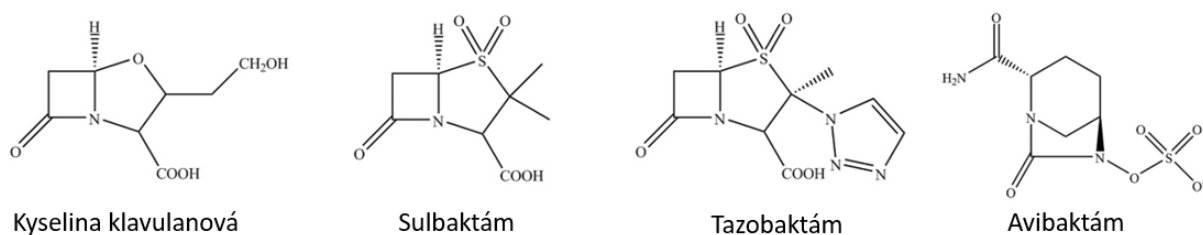
Obrázok 8 Schematická štruktúra grampozitívnej a gramnegatívnej bunkovej steny^[23]

Grampozitívna bunková stena obsahuje iba jednu lipidovú plazmatickú membránu a hrubú peptidoglykánovú vrstvu prepojenú s kyselinami teichoovými a lipoteichoovými, zatiaľ čo gramnegatívne baktérie majú vnútornú a vonkajšiu bunkovú membránu a iba tenkú vrstvu peptidoglykán v periplazmatickom priestore. Vonkajšiu membránu gramnegatívnych baktérií lemuje vrstva lipopolysacharidu.

2.1.4 β -laktamázové inhibítory

β -laktamázové inhibítory sú liečivá, ktoré sa podávajú spolu s β -laktámovými antibiotikami s cieľom zabrániť antimikrobiálnej rezistencii. Tieto látky pôsobia predovšetkým inaktiváciou serínových β -laktamáz, čo sú enzýmy, ktoré hydrolyzujú a inaktivujú β -laktámový kruh (najmä u gramnegatívnych baktérií). Medzi tieto látky patria inhibítory prvej generácie (kyselina klavulanová, sulbaktám a tazobaktám) a novšie avibaktám a vaborbaktám (viď. Obrázok 9), ktoré sú účinné proti karbapenémázam, ako je napríklad KPC^[5].

Inhibítory β -laktamáz pôsobia dvoma spôsobmi. Môžu sa stať substrátom, ktorý viažu s vysokou afinitou enzým β -laktamázu, ale vytvárajú stéricky nepriaznivé interakcie, ako je acylenzým. Môžu sa tiež stať „samovražednými inhibítormi“, ktoré natrvalo inaktivujú enzým sekundárnymi chemickými reakciami v aktívnom mieste. Avibaktám funguje prvým mechanizmom, zatiaľ čo sulbaktám, tazobaktám a kyselina klavulanová fungujú druhým mechanizmom. Inhibítory β -laktamázy sa vo všeobecnosti vylučujú obličkami a nepodliehajú významnému metabolizmu pri prechode pečeňou alebo gastrointestinálnym traktom. Ich metabolizmus a farmakokinetické vlastnosti sú ovplyvnené súbežným podávaním β -laktámových antibiotík, ako aj dĺžkou infúzie, keďže väčšina sa podáva intravenózne^[24].

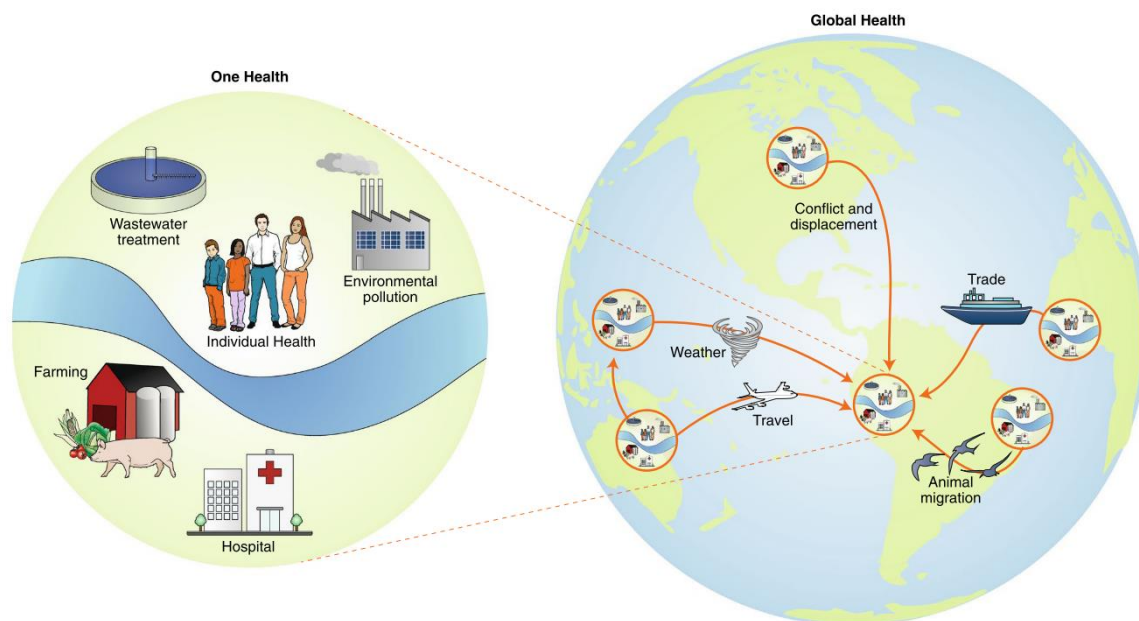


Obrázok 9 Chemická štruktúra inhibitorov β -laktamáz^[25]

2.2 Antimikrobiálna rezistencia

Antimikrobiálna rezistencia (AMR) je považovaná za jednu z hlavných globálnych výziev v oblasti zdravia v 21. storočí všetkými významnými regulačnými, hospodárskymi a politickými orgánmi, vrátane Medzinárodného menového fondu, WHO, Svetovej banky a skupiny G8. Všetky sa stotožňujú s vedeckým názorom, že AMR už nemožno riešiť len štúdiom problému v zdravotníckych zariadeniach, pretože väčšina ekosystémov prispieva k vzniku, získaniu a šíreniu AMR. Na problém AMR sa preto v súčasnosti pozerá z dvoch vzájomne sa dopĺňajúcich koncepcií, „One Health“ a „Global Health“, ktoré sa používajú na riešenie problémov všeobecne s infekčnými chorobami a najmä s AMR. Oba princípy sú holistické a interdisciplinárne a vychádzajú z myšlienky, že zdravie ľudí a zvierat je vzájomne závislé a zároveň je prepojené so zdravím ekosystémov, ktorých sú súčasťou (viď. *Obrázok 10*). Koncepcie „jedno zdravie“ a „globálne zdravie“ zahŕňajú poznatky o biologických prvkoch potrebných na pochopenie vývoja AMR vrátane mikroorganizmov alebo vektorov, ktoré sa podieľajú na jej vzniku a šírení, hostiteľských organizmov (ľudí alebo zvierat), príslušných prostredí a kultúrnych a sociálno-ekonomických charakteristík, ktoré môžu uľahčiť jej šírenie^[26, 27].

Rozdiely medzi „One Health“ a „Global Health“ nie sú vždy jasné. Jedno sa zameriava na úlohu vzájomne prepojených (a teda geograficky blízkych) ekosystémov pri vzniku a šírení AMR, a preto sa zaoberá AMR na miestnej úrovni, ako aj zameraním sa na vykonávanie integrovaných intervencií na boj proti AMR, napríklad na úrovni mesta alebo regiónu. Globálne zdravie sa naopak zaoberá globálnymi podmienkami, ktoré uľahčujú celosvetové šírenie AMR, a vychádza z myšlienky, že kontrola AMR si vyžaduje integrované politické a sociálno-ekonomické opatrenia, ktoré musia prijať krajiny, medzinárodné organizácie a ďalší aktéri na globálnej úrovni^[26].



Obrázok 10 Rozdiel medzi „One Health“ a „Global“ Health^[26]

Objavenie antibiotík viedlo k optimizmu, že infekcie možno kontrolovať a predchádzať im. Infekcie sú však stále hlavnou príčinou úmrtí v rozvojových krajinách. Je to spôsobené vznikom nových ochorení, opätovným výskytom ochorení, ktoré boli kedysi kontrolované, a najmä výskytom AMR. Zdá sa, že vznik antimikrobiálnej rezistencie je nevyhnutný takmer pre každý nový liek a je považovaný za hlavný problém pri liečbe mikrobiálnych infekcií v nemocniciach aj v komunite^[28].

Medzi faktory, ktoré prispievajú k vzniku a šíreniu antimikrobiálne rezistentných baktérií (ARB), patrí nadmerné alebo nesprávne používanie antimikrobiálnych látok, nedostatočná prevencia a kontrola

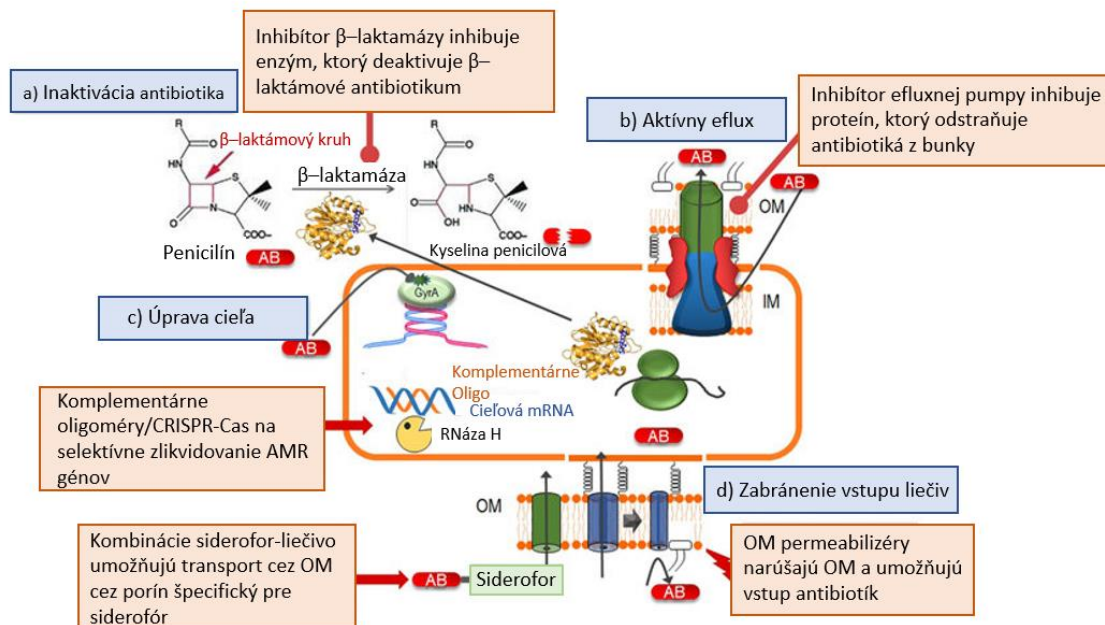
infekcií v zdravotníckych zariadeniach, nedostatočný prístup k čistej vode, sanitácii a hygiene pre ľudí a zvieratá, nedostatok vedomostí a nedostatočné presadzovanie právnych predpisov. Okrem toho rýchle globálne šírenie ARB, ktoré získali nové mechanizmy rezistencie, alarmujúco viedlo k vzniku multirezistentných baktérií. V dôsledku toho na liečbu ľudských infekcií týmito baktériami zostáva len niekoľko antibiotík. WHO preto navrhuje, že na zníženie šírenia ARB sú potrebné metódy prevencie a obmedzenia šírenia, ktoré zahŕňajú zlepšenie metód predpisovania antibiotík, reguláciu používania antibiotík, vývoj nových antimikrobiálnych liekov a vakcín a zlepšenie dohľadu nad ARB^[29].

Patogénne baktérie, najmä gramnegatívne baktérie, disponujú viacerými mechanizmami rezistencie. Baktérie môžu byť prirodzene rezistentné voči niektorým antibiotikám, vtedy hovoríme o primárnej rezistencii. Táto rezistencia je zapríčinená prirodzenými vlastnosťami baktérie, čo zahŕňa napríklad rezistenciu na glykopeptidy v dôsledku nepriepustnosti vonkajšej membrány v obale gramnegatívnej bakteriálnej bunky. Avšak omnoho nebezpečnejšia je sekundárna rezistencia, kedy pôvodne citlivé baktérie sa stávajú rezistentnými. Tieto baktérie získavajú rezistenciu mutáciou alebo získaním nového genetického materiálu z exogénneho zdroja^[30].

2.3 Mechanizmy antimikrobiálnej rezistencie

Rezistencia na antibiotiká môže byť spôsobená štyrmi rôznymi mechanizmami (viď. Obrázok 11)^[31]:

- inaktivácia antibiotika produkciou enzýmov
- export antimikrobiálnych látok z periplazmy do vonkajšieho prostredia pomocou efluxných púmp
- zmeny v proteínoch viažúcich penicilín, ktoré sú cieľom β -laktámov a vedú k nižšej afinite antimikrobiálnych látok
- zníženie permeability membrány stratou alebo zmenou štruktúry porínov



Obrázok 11 Mechanizmy antimikrobiálnej rezistencie u gramnegatívnych baktérií^[32]

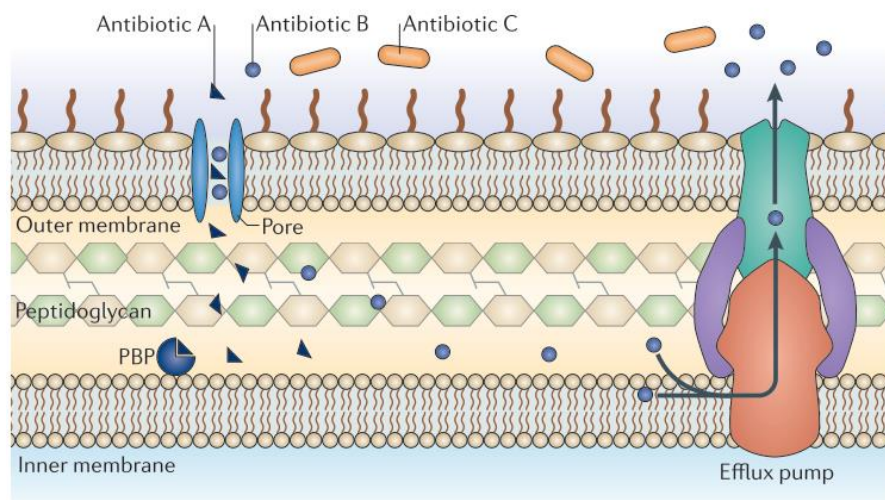
2.3.1 Inaktivácia antibiotika produkciou enzýmov

Mnohé antibiotiká majú hydrolyticky citlivé chemické väzby (napr. estery a amidy), ktorých integrita tvorí základ biologickej aktivity. Existuje niekoľko prípadov enzýmov, ktoré sa vyvinuli na štiepenie týchto väzieb a v dôsledku toho poskytujú prostriedky na zničenie antibiotickej aktivity. Hlavnými z nich sú amidázy, ktoré štiepia β -laktamový kruh penicilínov a cefalosporínov. Medzi ďalšie patria esterázy, ktoré sú spojené s rezistenciou na makrolidové antibiotiká a epoxidázami otvárajúcimi kruh fosfomycínu. Keďže tieto enzýmy vyžadujú ako ko-substrát vodu, ktorá môže byť často vylučovaná baktériami, tak dochádza k zachytávaniu antibiotika skôr, ako sa dostanú do kontaktu s baktériou^[33].

2.3.2 Efluxné pumpy

Efluxné pumpy sú energeticky závislé komplexné bakteriálne systémy, ktoré sú prítomné v cytoplazmatickej membráne. Prvá efluxná pumpa pumpujúca tetracyklín z bakteriálnej bunky *E. coli* bola opísaná v roku 1980. Odvtedy bolo identifikovaných množstvo efluxných systémov podieľajúcich sa na rezistencii. Ich úlohou je aktívne prenášať mnohé antibiotiká von z bunky a sú hlavnými prispievateľmi vnútornej rezistencie gramnegatívnych baktérií voči mnohým liekom, ktoré sa môžu používať na liečbu grampozitívnych bakteriálnych infekcií (viď. Obrázok 12). V prípade nadmernej expresie môžu efluxné pumpy spôsobiť aj vysokú úroveň rezistencie na predtým klinicky užitočné antibiotiká. Niektoré efluxné pumpy majú úzku substrátovú špecifickosť (napríklad pumpy Tet), ale

mnohé transportujú širokú škálu štrukturálne odlišných substrátov a sú známe ako efluxné pumpy s multirezistenciou^[30].



Obrázok 12 Vnútorňý mechanizmus rezistencie pomocou efluxnej pumpy^[34]

Zobrazený príklad sa týka β -laktámových antibiotík zameraných na PBP. Antibiotikum A môže vstúpiť do bunky cez membránu porínového proteínu, dosiahnuť svoj cieľ a inhibovať syntézu peptidoglykánu. Antibiotikum B môže tiež vstúpiť do bunky prostredníctvom porínu, ale na rozdiel od antibiotika A sa účinne odstraňuje efluxom. Antibiotikum C nemôže prejsť cez vonkajšiu membránu, a preto sa nemôže dostať k cieľovému PBP.

2.3.3 Modifikácia cieľovej molekuly

Medzi bežné mechanizmy rezistencie patria aj prirodzené alebo získané zmeny v cieľových miestach antimikrobiálnych látok. Zmeny sú často výsledkom spontánnej mutácie bakteriálneho génu na chromozóme. Keďže interakcia antibiotika s cieľovou molekulou je vo všeobecnosti dosť špecifická, drobné zmeny cieľovej molekuly môžu mať významný vplyv na väzbu antibiotika^[35].

2.3.4 Znížená permeabilita vonkajšej membrány

V porovnaní s grampozitívnymi druhmi sú gramnegatívne baktérie prirodzene menej priepustné pre mnohé antibiotiká. Na svojej vonkajšej membráne obsahujú poríny, čo sú membránové proteíny, ktoré patria do skupiny OMP (z ang. *outer membrane proteins*)^[36].

Hydrofilné antibiotiká prechádzajú cez vonkajšiu membránu difúziou cez porínové proteíny vonkajšej membrány. U väčšiny *Enterobacteriaceae* sa predpokladá, že hlavné poríny, ako sú proteíny vonkajšej membrány OmpF a OmpC fungujú ako nešpecifické kanály. Preto zníženie priepustnosti vonkajšej membrány a obmedzenie vstupu antibiotík do bakteriálnej bunky sa dosiahne znížením regulácie porínov alebo nahradením porínov selektívnejšími kanálmi. Mechanizmus vnútornej rezistencie na antibiotiká u gramnegatívnych baktérií bol preskúmaný už skôr, avšak nedávne údaje ukázali, že u *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. a *Acinetobacter* spp. zníženie expresie porínov významne prispieva k rezistencii voči novším liečivám, ako sú karbapenémy a cefalosporíny, voči ktorým je rezistencia zvyčajne sprostredkovaná enzymatickou degradáciou^[34].

2.4 Rezistencia k β -laktámom

β -laktámy sú najpoužívanejšou skupinou antibiotík. Od objavu benzylpenicilínu v roku 1920 vznikli tisíce nových derivátov penicilínu a príbuzných β -laktámových tried cefalosporínov, karbapenémov a monobaktámov. Každá nová trieda β -laktámov bola vyvinutá buď na rozšírenie spektra účinku aby zahŕňala ďalšie druhy baktérií, alebo aby sa zaoberala špecifickými mechanizmami rezistencie, ktoré sa objavili v cieľovej populácii baktérií^[37]. Rezistencia voči β -laktámom je predovšetkým spôsobená bakteriálne produkovanými enzýmami β -laktamázami, ktoré hydrolyzujú β -laktámový kruh, čím sa liečivo inaktivuje^[38].

2.4.1 β -laktamázy

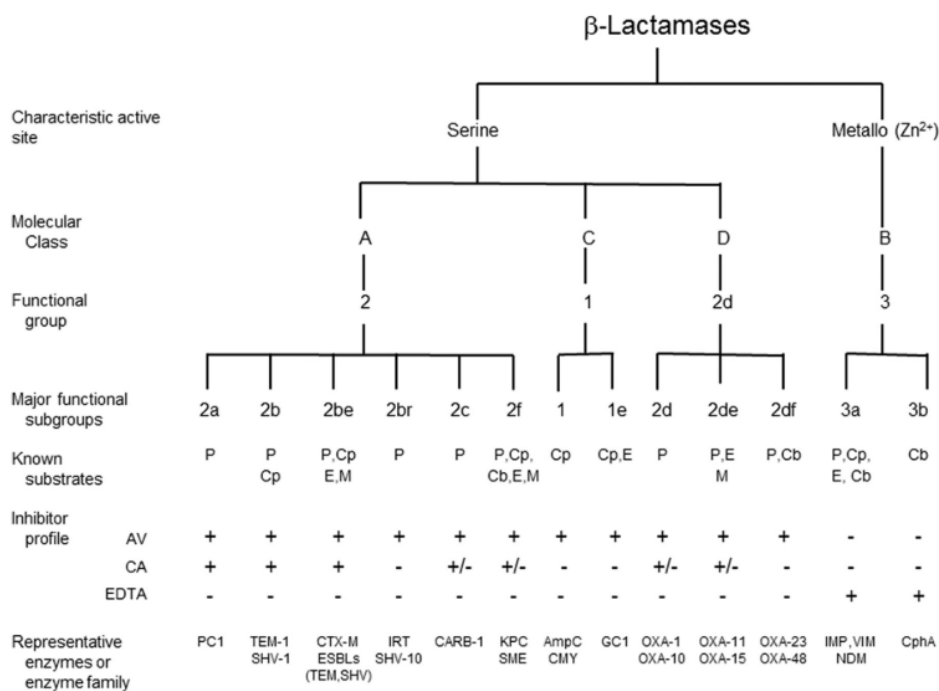
β -laktamázy sú univerzálne enzýmy s obmedzeným rozsahom molekulárnych štruktúr, ktoré sa nachádzajú v rôznych bakteriálnych zdrojoch^[39]. Ako je znázornené na *Obrázok 13*, β -laktamázy sa biochemicky klasifikujú do dvoch základných delení podľa mechanizmu, ktorým vykonávajú hydrolyzu. Môže to byť prostredníctvom tvorby acyl enzýmu so serínom na aktívnom mieste (patria sem enzýmy triedy A, C a D), alebo prostredníctvom hydrolytickej reakcie katalyzovanej jedným alebo dvoma esenciálnymi iónmi zinku v aktívnych miestach metalo- β -laktamáz (MBL), ktoré spadajú do triedy B. Po sprístupnení sekvenčných analýz boli β -laktamázy nakoniec rozdelené na základe veľkosti molekuly a homológie medzi aminokyselinami. Okrem toho β -laktamázy možno rozdeliť do 4 tried na základe ich substrátových špecifik: penicilinázy, cefalosporinázy typu AmpC, β -laktamázy s rozšíreným spektrom (ESBL) a karbapenemázy^[40, 41].

β -laktamázy triedy A môžu mať úzke spektrum alebo môžu získať rozšírené spektrum antibiotickej aktivity prostredníctvom bodových mutácií. Laktamázy s úzkym spektrom (NMC-A, IMI-1, SME) sú aktívne najmä proti penicilínom a môžu byť inhibované klavulánmi, zatiaľ čo β -laktamázy ESBL (KPC) môžu hydrolyzovať cefalosporíny s rozšíreným spektrom, ako sú ceftazidím, ceftriaxón, cefotafím a aztreonam^[42]. Enzýmy *Enterobacteriaceae* so svojou schopnosťou hydrolyzovať prakticky všetky penicilíny a cefalosporíny viedli k častejšiemu používaniu karbapenémov. Karbapenemázy však tiež dosahujú vysokú prevalenciu. Tieto enzýmy majú vysokú mieru inaktivácie karbapenémov širokospektrálnych β -laktámov. Najväčšie obavy vyvolávajú „získané karbapenemázy“, ktoré sa môžu prenášať medzi druhmi a ťažko detekujú v klinických izolátoch^[43].

Trieda B alebo metalo- β -laktamázy (IMP, VIM, NDM) sú kódované mobilnou DNA (plazmidmi a integrónmi) a ako jediná trieda, majú MBL na aktívnom mieste Zn^{2+} . MBL hydrolyzujú väčšinu β -laktámov vrátane karbapenémov, ale sú citlivé na monobaktámy a chelátové činidlá ako napr. EDTA^[44].

AmpC z triedy C hydrolyzujú väčšinu cefalosporínov vrátane rozšíreného spektra cefalosporínov, ale sú menej účinné na penicilíny a monobaktámy. Chromozomálne kódované AmpC vykazujú slabú aktivitu, ale môžu byť indukované v prítomnosti β -laktámov. Mechanizmy rezistencie AmpC β -laktamáz možno rozdeliť do 3 kategórií: (1) indukovateľná rezistencia prostredníctvom chromozomálne kódovaných génov AmpC (napr. *E. cloacae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *P. aeruginosa* atď.), (2) neindukovateľná chromozómová rezistencia spôsobená mutáciami promotora a/alebo alternátora (napr. *E. coli*, *Shigella species*, *A. baumannii*), (3) alebo plazmidom podmienená rezistencia (napr. *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella* spp. atď.). Expozícia β -laktámom môže spustiť kaskádu udalostí vedúcich k významnej produkcii AmpC a rezistencii voči β -laktámom, a to aj v prípade infekcií spôsobených pôvodne citlivými izolátmi^[45].

β -laktamázy triedy D (OXA-23, OXA-48), nazývané aj oxacilinázy alebo karbapeném hydrolyzujúce β -laktamázy triedy D (CHDL) sú enzýmy serín-dependentné, rovnako ako β -laktamázy triedy A a C. Okrem toho β -laktamázy triedy D zvyčajne nemožno inhibovať kyselinou klavulánovou, sulbaktámom a tazobaktámom^[42].



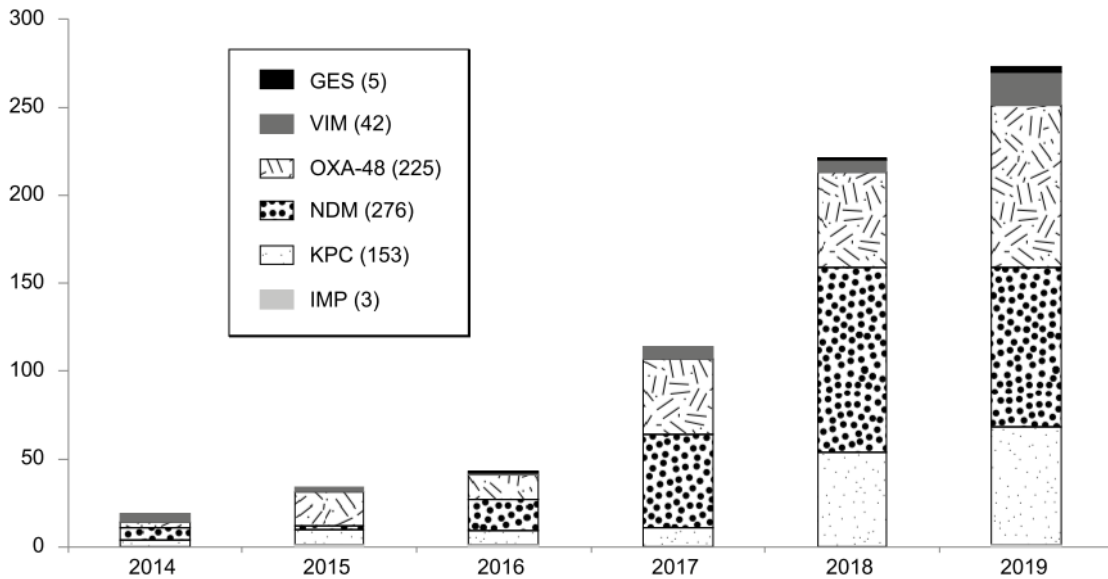
Obrázok 13 Molekulárne a funkčné vzťahy medzi β-laktamázami^[40]

2.4.2 Výskyt karbapenemáz v Českej republike

V súčasnosti dochádza v mnohých krajinách k výraznému šíreniu multirezistentných gramnegatívnych baktérií predovšetkým druhov *P. aeruginosa*, *A. baumannii* a príslušníkov čeľade *Enterobacteriaceae*. Najčastejším a z epidemiologického hľadiska najvýznamnejším typom rezistencie je produkcia karbapenemáz, ktoré hydrolyzujú väčšinu β-laktámových antibiotík, vrátane karbapenémov. Rozšírenie kmeňov produkujúcich karbapenemázy významne komplikuje liečbu a zvyšuje náklady na zdravotnú starostlivosť^[46].

Rezistencia ku karbapenémom môže byť spôsobená viacerými mechanizmami, pričom k epidemiologicky najzávažnejším patrí produkcia karbapenemáz. K najviac zastúpeným typom karbapenemáz u enterobaktérií patria metalo-β-laktamázy (predovšetkým typu NDM alebo VIM), serínové karbapenemázy (typu KPC, IMP, IMI a GES) alebo oxacilinázy (typu OXA-48). U kmeňov s produkciou karbapenemáz dochádza tiež často ku kombinácii s ďalšími mechanizmami rezistencie voči β-laktámovým antibiotikám (napr. produkcia β-laktamáz typu ESBL a/alebo AmpC, strata permeability v dôsledku alternácie porínov a ďalších), čo vedie k výraznej rozmanitosti fenotypov rezistencie^[47].

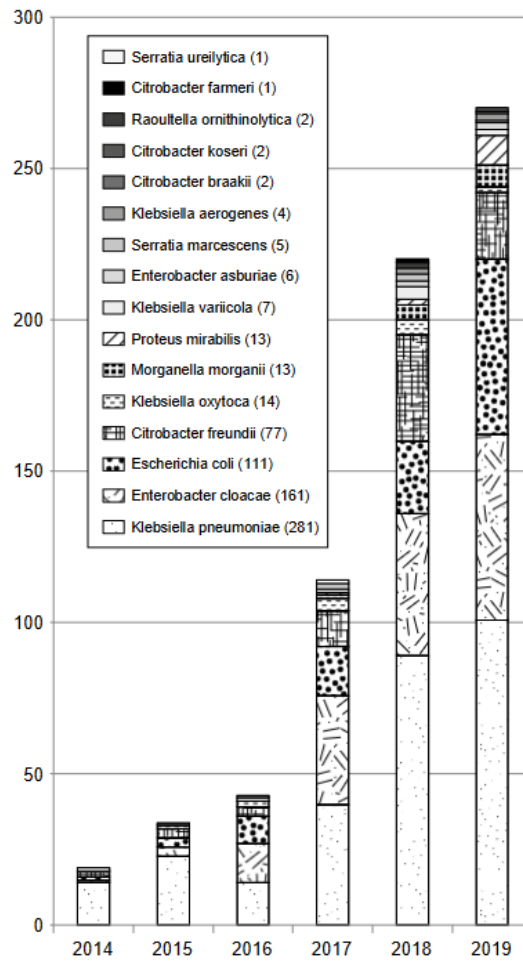
Prvá získaná karbapenemáza bola v ČR zaznamenaná u izolátu *P. aeruginosa* v roku 2008^[48]. Výskyt producentov karbapenemáz z nemocničných zariadení je v Českej republike systematicky monitorovaný od roku 2011. Zatiaľ čo v rokoch 2011 – 2013 bolo zaznamenaných celkom 49 prípadov (2011 – 16 prípadov, 2012 – 18 prípadov, 2013 – 15 prípadov), v roku 2014 bolo v ČR evidovaných celkom 19 prípadov kolonizácie alebo infekcie *Enterobacterales* produkujúcich karbapenemázu (CPE z angl. *carbapenemase producing Enterobacterales*), v roku 2015 to bolo 30 prípadov^[46]. Rovnako tak v roku 2016 bolo zaznamenaných celkom 30 prípadov kolonizácie alebo infekcie CPE, kedy v 10 prípadoch sa jednalo o importovanú nákazu. V ďalších rokoch došlo v Českej republike k plošnému nárastu počtov prípadov. V roku 2017 bol počet prípadov 114, v roku 2018 bolo 220 prípadov a v roku 2019 bolo zaznamenaných 270 prípadov (vid'. *Obrázok 14* a *Obrázok 15*). Dáta z rokov 2020 a 2021 doposiaľ neboli publikované^[47].



Obrázok 14 Prehľad zachytených typov karbapenemáz v ČR v rokoch 2014–2019^[47]

Výskyt CPE v Českej republike je stále nízky v porovnaní s ďalšími európskymi štátmi, no napriek tomu sa situácia nesmie podceňovať. Od roku 2016 je značný trvalý nárast výskytu CPE a to ako z dôvodu niekoľko epidemiologických epizód v nemocniciach, tak aj rozšírením CPE do väčšieho počtu zdravotníckych zariadení. Najviac sú v ČR zastúpené karbapenemázy typu NDM a OXA-48. Z časového hľadiska je vidieť, že ich počet každým rokom niekoľkonásobne stúpa. Za nimi nasleduje karbapenemáza typu KPC, ktorej počet takisto narastá. Menšiu časť tvorí karbapenemáza typu VIM, ktorej počet sa výrazne nelíši so vzájomným porovnaním rokov. Najmenšiu časť vytvára karbapenemáza typu GES a IMP, ktorej bol zachytený minimálny počet^[47].

Medzi najpočetnejšie druhy produkujúce karbapenemázy v rokoch 2014–2019 bola zachytená *K. pneumoniae* (n=281), ďalej *Enterobacter cloacae* (n=161), *E. coli* (n=111) a *Citrobacter freundii* (n=77). Taktiež bol zachytený výskyt aj mnoho iných bakteriálnych druhov produkujúcich karbapenemázy, no ich počet bol omnoho nižší (vid'. Obrázok 15)^[47].



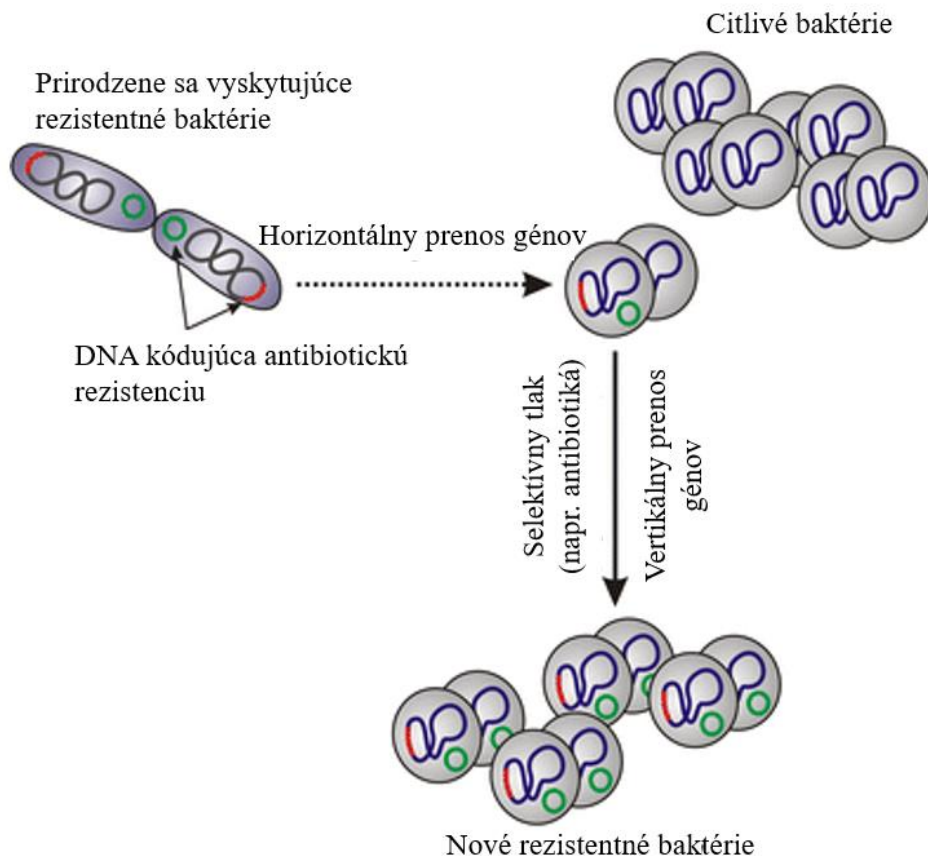
Obrázok 15 Prehľad jednotlivých druhov produkujúcich karbapenemázy v rokoch 2014–2019^[47]

2.5 Génová podstata prenosu rezistencie

AMR je v mikroorganizmoch buď kódovaná chromozomálne a prenášaná vertikálne alebo na mobilných genetických elementoch, napr. integrónoch, transpozónoch a plazmidoch, ktoré sa navyše šíria horizontálnym prenosom génov HGT (z ang. *horizontal gene transfer*) (viď. Obrázok 16). Plazmidy patria medzi jedny z najdôležitejších prvkov pre bakteriálnu genetickú adaptáciu a evolúciu, a je známe, že hrajú hlavnú úlohu ako nosiče génov pre AMR. Nesú gény kódujúce ďalšie špeciálne vlastnosti, ako je odolnosť voči extrémnym teplotám alebo ťažkým kovom, čím poskytujú hostiteľským bunkám adaptačnú výhodu. Aby sme vyriešili rastúci problém AMR, musíme pochopiť, ako baktérie získavajú a prenášajú rezistentné gény v klinickom prostredí^[49].

U vertikálneho prenosu sa gény rezistencie priamo prenášajú do všetkých potomkov baktérií počas replikácie DNA. Tento proces je striktno záležitosťou Darwinovskej evolúcie riadenej princípmi prirodzeného výberu. Spontánna mutácia v bakteriálnom chromozóme prepožičiava kmeňu rezistenciu. V selektívnom prostredí antibiotika sa nachádza divoký typ (nemutovaný), ktorý neprežije a rezistentný mutant, ktorý prežije a ďalej rastie^[50].

Na druhej strane HGT umožňuje mikrobiálnym druhom získať nový genetický materiál mimo ich klonálnej línie. HGT sa vyskytuje aj medzi vzdialene príbuznými druhmi, čo ovplyvňuje evolúciu bakteriálnych populácií a ich schopnosti prispôbiť sa nepriateľským podmienkam^[51]. Proces HGT môže byť oveľa rýchlejší ako spontánne mutácie. Existujú tri typy HGT pre zisk a začlenenie novej genetickej sekvencie do genómu baktérie: transformácia, transdukcia a konjugácia (viď. Obrázok 17)^[50].



Obrázok 16 Horizontálny a vertikálny prenos génov^[52]

2.5.1 Konjugácia

Konjugácia je bežný mechanizmus horizontálneho prenosu génov v baktériách, ktorý je nástrojom šírenia rezistencie na antibiotiká medzi baktériami. Väčšina génov rezistencie sa nachádza na mobilných genetických prvkoch a primárne sa šíri konjugáciou. Okrem toho môžu konjugatívne elementy pôsobiť ako rezervoár na udržanie antibiotickej rezistencie v bakteriálnej populácii aj v neprítomnosti antibiotickej selekcie. Po zavedení selektívneho tlaku (antibiotiká) sa procesom konjugácie môžu rýchlo rozšíriť gény kódujúce antibiotickú rezistenciu medzi baktériami mikrobiómu a patogény^[53].

Konjugácia predstavuje jednosmerný prenos DNA z donorovej bunky do bunky recipientnej prostredníctvom špeciálnych štruktúr, tzv. konjugačných pilusov (sex-pilusov). Tento proces vyžaduje priamy bunkový kontakt, a z toho dôvodu nie je ovplyvnený prítomnosťou nukleáz v kultivačnom médiu. Konjugácia baktérií je analogická kríženiam eukaryotických organizmov a nazýva sa aj parasexuálny proces. Výmena génov nastáva rekombináciou, ktorá nie je recipročná ako u eukaryotov, ale prebieha len z plazmidu do bakteriálneho chromozómu pomocou jedného (ak je plazmid kruhová molekula) alebo dvoch crossing-overov (ak je donorová molekula lineárna)^[54, 55].

Konjugácie sú schopné len bunky, ktoré vlastnia tzv. *F* faktor (*F* pre fertilitu, čiže plodnosť). Je to plazmidová DNA, ktorá obsahuje informáciu pre syntézu spomenutých sex-pilusov a ďalších molekúl potrebných pre transfer DNA. Plazmid s *F* faktorom sa prenáša len z donorových buniek (označené F^+) do recipientných, ktoré tento plazmid nemajú (*F*⁻). Pri prenose plazmidu dochádza zároveň k jeho replikácii, takže z donorovej bunky sa plazmid nevytráca. Následne po konjugácii získajú recipientné bunky fenotyp F^+ a samy môžu byť donorom tohto plazmidu pre ďalšie bunky^[56].

2.5.2 Transdukcia

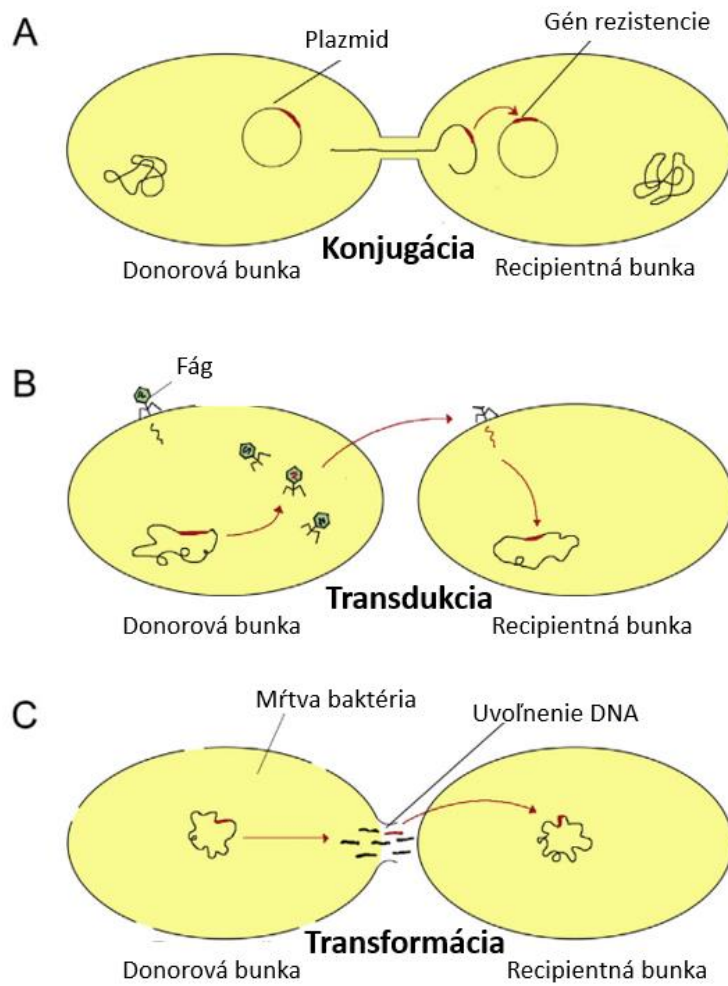
Transdukcia predstavuje prenos DNA medzi bunkami prostredníctvom bakteriálnych vírusov – bakteriofágov a považuje sa ako prispievateľ k rozšíreniu AMR, najmä medzi členmi rovnakého druhu^[57]. Využitím nepresností v nabaľovaní DNA do vírusových častíc (viriónov), možno docieľiť transfer vlastných génov bakteriálnej bunky do iných buniek práve prostredníctvom infekcie fágmi. S určitou pravdepodobnosťou sa totiž stáva, že fágy do svojich proteínových hlavičiek nenabalia vlastnú zreplikovanú DNA, ale cudziu, ktorú potom úspešne prenášajú do iných buniek ako vlastnú. Bunky, ktoré prijali od fágov cudzorodú DNA, sa nazývajú transduktanty. Keďže DNA je počas transdukcie chránená fágovou časticou, nie je tento proces citlivý k nukleázam. Transdukciu sprostredkujú fágy, takže k prenosu DNA nie je potrebný bunkový kontakt^[55].

V súčasnosti existujú len nepriame dôkazy o tom, že k transdukcii dochádza v nemocniciach. Zistilo sa, že bakteriofágy izolované z infekcií MRSA získanými v nemocnici ľahko transdukujú AMR na citlivé kmene v laboratóriu. Podobne by mohli byť gény rezistencie na tetracyklín a penicilín transdukované medzi nemocničnými izolátmi^[50].

2.5.3 Transformácia

Transformácia bola prvým opísaným procesom všetkých mechanizmov HGT. Jedná sa o transfer holej DNA v médiu do bakteriálnych buniek bez konkrétnych vektorov (napr. fágy). Tento proces je citlivý voči nukleázam, pretože DNA nie je žiadnym spôsobom chránená. Bunkový kontakt pre transformáciu nie je potrebný. Bunky sa prijatiu cudzej DNA snažia za normálnych okolností vyhnúť, takže ich stena nie je pre DNA priepustná (DNA k tomu ani nemá chemické predpoklady). Okrem toho sa v bunke nachádza účinný restriktívno-modifikačný systém, ktorý pozostáva z enzýmov degradujúcich cudzorodú DNA a chrániacich vlastnú DNA pred degradáciou^[58].

Za určitých okolností sa však môže stať, že bunky sa stávajú kompetentnými, a teda ochotnými prijať cudzorodú DNA. Každý druh baktérie požaduje iné podmienky pre vznik kompetencie. Bunky, ktoré úspešne prijali cudzorodú DNA pomocou transformácie, sa nazývajú transformanty^[59, 60].



Obrázok 17 Mechanizmy horizontálneho prenosu génov^[41]

(A) Konjugácia je proces, ktorý prenáša DNA priamym fyzickým kontaktom medzi bunkou darcu a bunkou príjemcu. (B) Transdukcia je prenos DNA z jednej baktérie do druhej prostredníctvom baktériofágov. (C) Pri transformácii baktérie prijímajú voľné fragmenty DNA uvoľnené do prostredia a začleňujú ich do svojho vlastného genómu.

2.6 Mobilné genetické elementy

Okrem bakteriálneho chromozómu ako hlavného nositeľa deoxyribonukleovej kyseliny v bunke sa u baktérií vyskytujú tiež extrachromozomálne formy DNA – mobilné genetické elementy (MGE). MGE sú identifikované ako fragmenty DNA kódujúce enzýmy a iné proteíny, ktoré sprostredkujú pohyb DNA v genóme (intracelulárna mobilita) alebo medzi bakteriálnymi bunkami (medzibunková mobilita)^[61].

Prvýkrát boli opísané v genóme kukurice koncom 40. rokov 20. storočia a sú dôležitým prostriedkom na prenos genetickej informácie^[52]. Zástupci tejto skupiny, ako sú plazmidy, transpozóny, integróny a ďalšie, sú často spájané s prítomnosťou génov, ktoré dávajú baktérii nejakú výhodu, napr. virulentné faktory, rezistenciu k ťažkým kovom či antibiotikám^[62].

2.6.1 Plazmidy

Plazmid tvorí súbor funkčných genetických modulov, ktoré sú organizované do stabilných, samoreplikujúcich jednotiek alebo „replikónov“, ktoré sú menšie ako bunkový chromozóm (menej ako 1 kb až niekoľko Mb) a zvyčajne neobsahuje gény potrebné pre základné bunkové funkcie. Klasické plazmidy majú uzavretý kruhový tvar s dvojvláknovou molekulou DNA, ale existujú aj lineárne dvojvláknové DNA plazmidy^[63].

Plazmidy sa šíria prostredníctvom bakteriálnych populácií predovšetkým procesom konjugácie. Tvoria genetické prvky, ktoré zohrávajú úlohu v evolúcii baktérií tým, že baktérii poskytujú nové gény, ktoré podporujú prispôbenie sa rôznym podmienkam. Pretrvávanie týchto genetických prvkov závisí od potreby hostiteľskej bunky, ako napríklad gény antibiotickej rezistencie v prítomnosti antibiotík. Plazmidom sprostredkovaná rezistencia na β -laktámové antibiotiká poskytuje hlavné príklady toho, ako HGT zhoršuje stavy AMR v nemocničnom prostredí. Gény β -laktámovej rezistencie sa bežne nachádzajú na plazmidoch a šíria sa medzidruhovou aj vnútrodruhovou konjugáciou napr. u *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. a *Acinetobacter* spp.^[50].

2.6.2 Transpozóny

Transponovateľné prvky sú definované ako „špecifické úseky DNA, ktoré je možno opakovane vkladať do jednej alebo viacerých lokalít v jednom alebo viacerých genómoch“^[64]. Sekvencie transpozónov môžu mať rôznu veľkosť (3 – 40 kbp). Transpozóny produkujú enzým transpozázu kódovaný génom *tnp*, ktorý je zodpovedný za intracelulárny prenos medzi replikónmi excíziou a miestne špecifickou inzerciou. Na rozdiel od plazmidov, transpozóny nie sú schopné autonómnej replikácie. Pre prenos do inej bakteriálnej bunky sa zvyčajne integrujú do genómu plazmidov alebo bakteriofágov^[55].

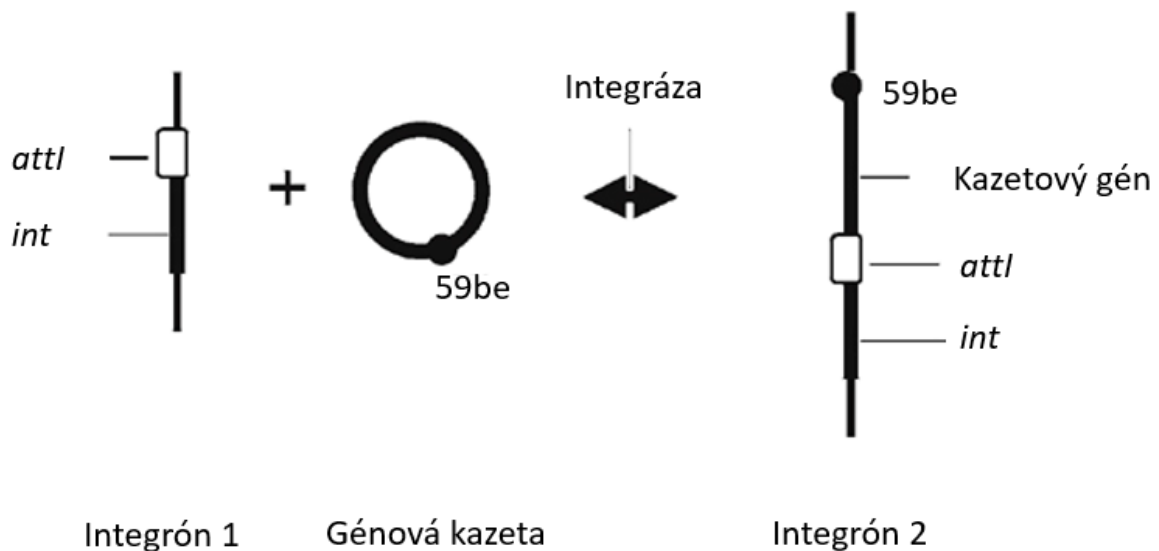
Inzerčné sekvencie (IS) sú základným a najjednoduchším typom transpozónov (obvykle menšie ako 2,5 kbp). Pozostávajú iba z génu pre enzým transpozázu, ktorý je ohraničený z oboch strán invertovanými opakovaniami. Napriek ich jednoduchej štruktúre a neprítomnosti determinantov antibiotickej rezistencie hrajú IS dôležitú úlohu v evolúcii bakteriálnych genómov. Podieľajú sa na reorganizácii genetického materiálu v rámci chromozómu, integrácii plazmidov a sú súčasťou kompozitných transpozónov, ktorým prepožičiavajú transpozázu pre ich prenos^[65]. Tiež bolo pozorované, že plazmidy nesúce gény AMR obsahujú viac inzerčných sekvencií ako plazmidy bez týchto génov. Jednou z najbežnejších inzerčných sekvencií je IS26, ktorá je spájaná až s 33 rôznymi génmi AMR, ako napríklad *bla*_{CTX-M} kódujúci produkciu ESBL^[66].

Konjugatívne transpozóny majú zložitejšiu štruktúru ako inzerčné sekvencie. Údajne sú schopné vyčleniť sa z donorovského chromozómu a použiť konjugáciu na prenos do hostiteľskej bunky, kde sa integrujú do jej chromozómu. Zložené transpozóny sa skladajú z dvoch inzerčných sekvencií zodpovedných za transpozíciu DNA. Sú veľmi dôležité pre prenos rezistentných génov^[67].

2.6.3 Integróny a génové kazety

Integróny boli definované Hallom a Collisom ako prvky, ktoré obsahujú genetické determinanty komponentov miestne špecifického rekombinačného systému, ktorý rozpoznáva a zachytáva mobilné génové kazety (vid'. *Obrázok 18*). Génové kazety sú malé mobilné prvky (0,5–1 kbp) pozostávajúce z jedného génu (príležitostne dvoch) a z miesta rekombinácie *attC*. Zvyčajne nie sú schopné autonómnej replikácie, pretože im chýba promotor^[68].

Aj napriek tomu môžu existovať aj vo voľnej kruhovej forme a spravidla sú vložené do integrónov. K tomuto javu dochádza prostredníctvom rekombinácie medzi rekombinačným miestom génovej kazety *attC* a rekombinačným miestom integrónu *attI*. Celý proces je katalyzovaný expresiou génu *intI* uloženého na integróne, čím dochádza k produkcii atypickej a miestne špecifickej tyrozín rekombinázy. Integróny môžu niesť niekoľko génových kaziet, prenášajú tak gény kódujúce rezistenciu k viac antimikrobiálnym látkam naraz a podieľajú sa na šírení multirezistentných bakteriálnych kmeňoch^[67]. V súčasnej dobe sú integróny klasifikované do piatich tried na základe rozdielu sekvencie génu *intI* a u všetkých bola zaznamenaná spojitosť s antibiotickou rezistenciou. Hlavné integróny prvej triedy sú nachádzané u klinických izolátov^[69].



Obrázok 18 Bakteriálne integróny, zachytenie a uvoľnenie génových kaziet^[67]

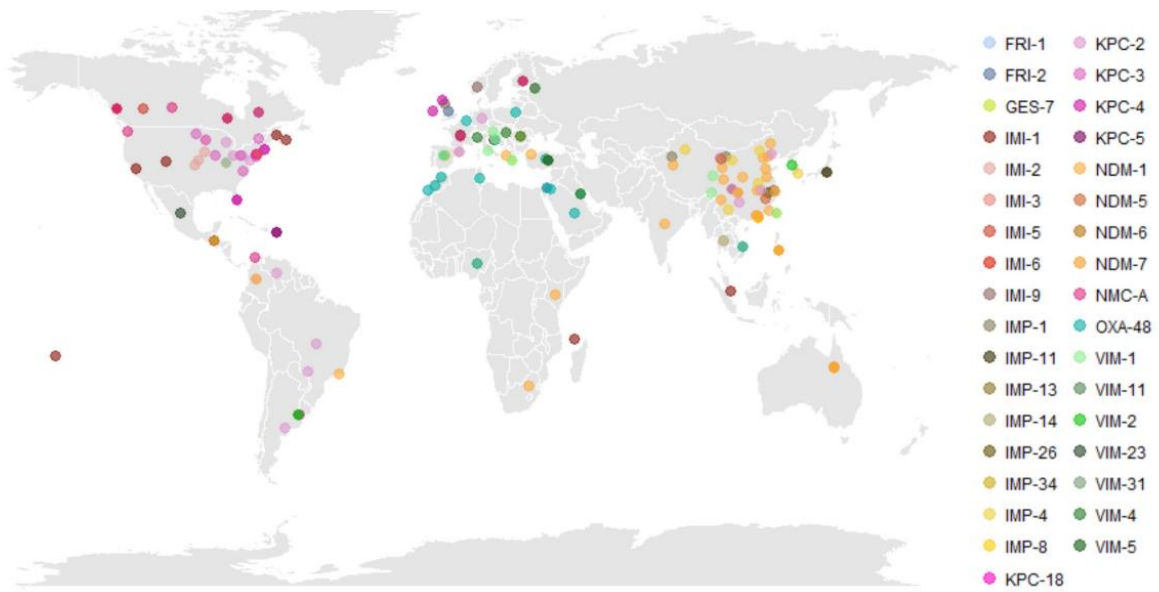
2.7 *Enterobacter* spp.

Enterobacter je rod gramnegatívnych baktérií, ktorý je tretím najbežnejším patogénnym druhom čeľade *Enterobacteriaceae* u ľudí po rodoch *Escherichia* a *Klebsiella*. Rod *Enterobacter* patrí do skupiny ESKAPE patogénov (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* a *Enterobacter* spp.), ktorá sa považuje za vedúcu etiológiu infekcií získaných v nemocničnom prostredí, spôsobených rezistentnými baktériami^[70]. ESKAPE bola prvý krát opísaná v roku 1960 a odvtedy prešiel rod *Enterobacter* mnohými zmenami s príchodom vylepšených fenotypových a genotypových analýz^[71]. Taxonómia rodu *Enterobacter* spp. je veľmi komplikovaná. Je dôležité poznať jej presné druhové a poddruhové priradenie, ktoré tvorí základ pre pochopenie epidemiológie, patogenézy a mikrobiologických vlastností baktérií. Taktiež zohráva dôležitú úlohu pre diagnostiku, liečbu, prognózu a prevenciu^[72]. Dnes je v tomto rode známych 22 druhov *Enterobacter*. Spomedzi týchto 22 druhov sú v klinickom prostredí najčastejšie (99% prípadov) tie, ktoré patria do komplexu *Enterobacter cloacae* (ECC) a *Enterobacter aerogenes*^[71]. ECC pozostáva z bakteriálnych druhov: *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter nimipressuralis*, *Enterobacter mori* a mnoho iných, ktoré patria do *Enterobacteriaceae* široko sa vyskytujúcich v životnom prostredí. ECC sa ako oportúnný patogén umiestnil na prvom mieste v rebríčku enterobaktérií pri nemocničných infekciách. Zistilo sa, že ECC sa podieľajú na viacerých infekciách, ako je bakteriémia, infekcie dýchacích a močových ciest, nozokomiálne infekcie a iné^[73].

Enterobacter spp. je spojený s rôznymi environmentálnymi biotopmi. Bežne sa nachádzajú vo vode, v odpadových vodách, v pôde, v rastlinách alebo vo výkaloch zvierat. Okrem toho, sú tiež prirodzenými obyvateľmi črevnej mikrofóry a patria medzi najčastejšie ľudské patogény spôsobujúce infekcie po cystídy, pneumóniu, meningitídu a iné infekcie, zvyčajne spojených s invazívnymi procesmi a infekciami krvného riečiska^[74]. Tieto patogény sú často spájané s multirezistentným fenotypom kvôli ich adaptácii na nemocničné prostredie a ich schopnosti ľahko získať genetické mobilné elementy obsahujúce gény rezistencie a virulencie^[71].

2.7.1 Rezistencia *Enterobacter* spp.

Enterobaktérie rezistentné na karbapenamázy sú podľa WHO jednou z najvýznamnejších celosvetovo rastúcich zdravotných hrozieb. Okrem karbapenemázových génov, majú karbapenemázu produkujúce *Enterobacterales* (CPE) zvyčajne zhromaždené aj iné gény rezistencie a často sú rozsiahlo rezistentné na liečivá, čo obmedzuje možnosti liečby a následne vedie k vysokej úmrtnosti^[75]. Vznik a rozšírenie kmeňov komplexu *Enterobacter cloacae* produkujúci karbapenamázy je spôsobený vysokou diverzitou jeho klonálnych línií a širokou škálou detekovaných karbapenemáz u tohto rodu (viď. *Obrázok 19*)^[74,76]. V Spojených štátoch a Kanade sa väčšinou vyskytovali ECC nesúce *bla_{KPC}*, zriedkavo boli nájdené izoláty produkujúce IMI a NMC-A. Izoláty obsahujúce *bla_{KPC}*, boli tiež detekované v Európe a Južnej Amerike. Zatiaľ čo NDM-1 je endemická na indickom subkontinente, v nemocniciach vo východnej Číne bolo zistených viacero variant NDM v spojitosti s ECC. Gény kódujúce produkciu IMP boli u ECC vo veľkej miere zaznamenané v juhovýchodnej Ázii, vrátane Číny, Japonska, Kórey, Filipín, Taiwanu a Austrálie a predpokladá sa, že sú v tejto oblasti endemické. ECC produkujúce VIM sú rozšírené skôr v Európe, pričom v oblasti Južnej Ameriky a juhovýchodnej Ázie sú detekované minimálne. Karbapenamázy OXA-48, o ktorých sa predpokladá, že pochádzajú z Turecka, sa rozšírili na blízky východ, do severnej Afriky a Európy^[77].



Obrázok 19 Globálne rozšírenie karbapeném rezistentného komplexu *Enterobacter cloacae*^[77]

2.8 Odpadové vody

V dôsledku ľudskej činnosti sa znečistenie vôd stalo celosvetovým problémom. V Európe dostávajú hospitalizovaní pacienti až v 20–30% prípadoch antibiotickú liečbu, čo vytvára dobré podmienky pre rozvoj AMR. Baktérie odolné voči antibiotikám sa môžu z týchto zariadení dostať do kanalizácie^[78]. Táto situácia sa môže zhoršiť, keď sa odpadové vody zo zdravotníckych zariadení vypúšťajú priamo bez predchádzajúceho čistenia do siete odpadových vôd. Vo všeobecnosti je nereálne očakávať pokles výroby alebo využívania niektorých dominantných liekových skupín (najmä antibiotiká, antidepresíva alebo lieky na kardiovaskulárne ochorenia) v blízkej budúcnosti. Kanalizačné systémy zhromažďujú odpadové vody nielen z domácností, ale aj z nemocníc, psychiatrických ambulancií, domovov dôchodcov a iných zdravotníckych zariadení, ktoré sú významným zdrojom liečiv^[77]. Ďalším významným zdrojom AMR predstavujú odpadové vody z poľnohospodárstva. Odpadové vody hospodárskych zvierat obsahujú organické látky, patogénne mikroorganizmy, ťažké kovy a iné znečisťujúce látky, čo vo veľkej miere vzbudilo pozornosť na vážne znečistenie životného prostredia^[79]. Dostupnosť pitnej vody, vhodný kanalizačný systém a čistenie odpadových vôd tvoria základ pre udržanie a zlepšenie verejného zdravia. Čistiarne odpadových vôd (ČOV) predstavujú miesta, kde dochádza k interakcii všetkých odpadových vôd. Bežné ČOV majú schopnosť redukovať baktérie iba 10–100 násobne, čo umožňuje šírenie baktérií prostredníctvom upravenej vody. Preto sú ČOV považované za ohniská šírenia antimikrobiálne rezistentných baktérií a génov antimikrobiálnej rezistencie v prostredí, kde sa prenášajú pomocou HGT počas procesu čistenia^[80]. Hoci je anaeróbna digestia kľúčovým krokom v niektorých ČOV a dokáže znížiť počet väčšiny ľudských patogénov o 70–95%, u baktérií nesúcich antibioticky rezistentné gény (ARG) dokáže tento proces znížiť iba o 20–52 %^[81]. Vysoká koncentrácia antibiotík a s nimi súvisiacich ARB a ARG v odpadových vodách z ČOV sa dostáva do životného prostredia prostredníctvom vypúšťania odpadových vôd z ČOV do riek, opätovného využívania odpadových vôd a zavláčovania. Gény rezistencie voči antibiotikám môžu pretrvávať v životnom prostredí aj vtedy, keď sa tam už nenachádza žiadny selektívny tlak^[82]. Odstránenie organických látok, chemických znečisťujúcich látok a nežiadúcich mikroorganizmov z odpadových vôd kombináciou fyzikálne–chemických a biologických úprav bolo významným technologickým úspechom minulého storočia, ktorý umožnil návrat kvalitnej vody do životného prostredia. Upravené odpadové vody z ČOV však nie sú ani z ďaleka sterilné, a preto šíria do životného prostredia veľké množstvo baktérií, z ktorých mnohé sú živočíšneho alebo humánneho pôvodu^[83, 84].

2.8.1 Štruktúra ČOV

Nakladanie s odpadovými vodami bolo významnou súčasťou civilizácií po celé tisícročia, čoho sú dôkazom mnohé sociologické aspekty a technologické pokroky v priebehu minulosti. V polovici 19. storočia sa v Európe skonštruovali prvé moderné čistiarne odpadových vôd. Hospodárenie s odpadovými vodami v ČR je pomerne špecifické. Väčšina vyprodukovaných odpadových vôd je odvádzaná do centrálnych ČOV, kde sú ďalej spracovávané za využitia mechanicko–biologických procesov. Procesy čistenia v ČOV možno rozdeliť do troch základných stupňov. Ako prvý prebieha mechanický stupeň, následne za ním biologický stupeň a na záver chemický stupeň čistenia odpadových vôd (viď *Obrázok 20*)^[85].

2.8.1.1 Mechanické čistenie vody

V prvej fáze sa mechanicky čistí ešte neupravená odpadová voda. Odstráni sa pri tom asi 20–30 % obsiahnutých tuhých látok. V tomto procese sa odpadová voda dostane do triediaceho zariadenia, kde hrablice a bubnové sito odfiltrujú hrubé nečistoty, ako sú listy, papier alebo textilie. Predbežne vyčistená voda potom prechádza do tzv. lapača piesku. V technológii čistenia odpadových vôd sa na odstránenie hrubých častíc, ako sú kamene, sklenené úlomky, piesok alebo aj hrubý organický materiál, ktorý nebol oddelený sitami používa sedimentačná nádrž^[86]. Za lapačom piesku sa v odôvodnených prípadoch,

najmä tam, kde pritekajú odpadové vody z potravinárskeho priemyslu navrhuje lapač tuku. Z ekonomického hľadiska je výhodnejšie odstraňovať tuk priamo v zdroji, nie až v čistiarni odpadových vôd. Menšie množstvo tuku je odstránené spolu s plávajúcimi nečistotami v usadzovacej nádrži^[79]. Usadzovaním v sedimentačnej nádrži vzniká primárny kal. Pomocou čerpadla je kal dopravený do tzv. vyhnívacej komory. Vo vyhnívacej komore vzniká v štyroch fázach metán (hydrolyza, acidifikácia, acetónový gén a metanogénna fáza). V teplárňach sa premieňa na elektrickú energiu a môže sa použiť na zásobovanie závodu energiou. Proces vyhnívania je ukončený po štyroch týždňoch, kde výsledkom je kal bez zápachu, ktorý sa často používa v poľnohospodárstve po odvodnení odstredivkou alebo filtrom^[86, 87].

2.8.1.2 Biologické čistenie vody

Dnes už samozrejmomou časťou čistiaceho procesu je aj biologické čistenie (sekundárne čistenie). Pri biologickom čistení odpadových vôd v aeróbných podmienkach (odpadové vody sa dajú čistiť aj v podmienkach anaeróbných, aj keď s nižšou účinnosťou, veľká časť však pracuje v aeróbných podmienkach), kde sa uplatňujú biochemické procesy podmienené činnosťou mikroorganizmov, ktoré oxidáciou kyslíkom rozkladajú organické látky (substrát) v odpadovej vode. V praxi sa tieto procesy realizujú tzv. aktivačným systémom. V aktivačnej nádrži je udržiavaná určitá koncentrácia kalu – biomasy, ktorá pomocou svojho metabolizmu rozkladá organické látky v odpadových vodách na H₂O a CO₂. Oxidáciou organických zlúčenín a redukovaných anorganických zlúčenín získavajú mikroorganizmy energiu. V dôsledku získavania živín mikroorganizmy rastú. Rast mikroorganizmov teda spôsobuje odstránenie substrátu (znečisťujúcich látok), ale tiež zvyšovanie koncentrácie kalu v systéme. Preto je potrebné kal zo systému odoberať, aby bola jeho koncentrácia v systéme udržiavaná na približne konštantnej hodnote. Tomuto odstraňovanému kalu sa hovorí prebytočný kal (alebo tiež sekundárny kal), ktorý je ďalej spracovávaný v kalovom hospodárstve^[79].

Po biologickom čistení sa približne 90 % odpadovej vody vyčistí od biologicky rozložiteľných látok. V mnohých prípadoch však biologické čistenie nie je dostačujúce. V týchto prípadoch sú potrebné ďalšie procesy čistenia odpadových vôd – napríklad vo forme chemického čistenia^[88].

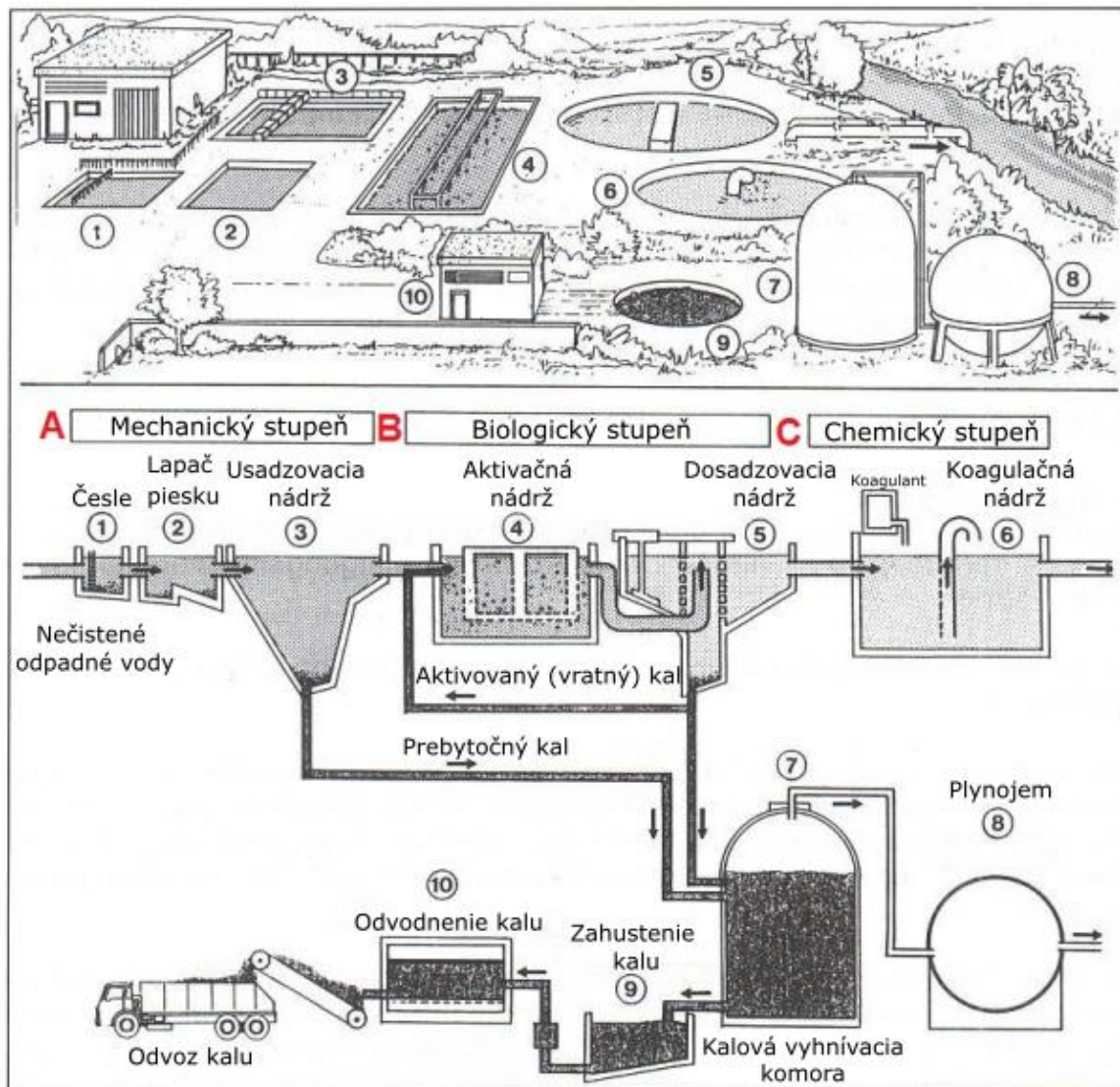
2.8.1.3 Chemické čistenie vody

V tomto štádiu čistenia odpadových vôd sa na čistenie využívajú chemické procesy. Chemické čistenie v ČOV zahŕňa neutralizáciu, dezinfekciu, zrážanie fosfátov, odstraňovanie dusíka a odstraňovanie mangánu^[79].

Neutralizáciou sa získa predpísaná hodnota pH, ktorá sa dosiahne pridaním kyseliny (napr. HCl), alebo bázy (napr. vápenné mlieko). Počas dezinfekcie sa patogény usmrcujú pridaním chlóru alebo oxidu chlórčitého. Ožarovanie odpadovej vody UV svetlom je dobrou alternatívou k používaniu chemikálií, ale nevyužíva sa tak často. Naša odpadová voda je často kontaminovaná fosfátmi z čistiacich prostriedkov, hnojív, potravinárskych prísad a fekáliami. Ak zostávajú v odpadových vodách, vedú k prehnovaniu vodných plôch a obohacovaniu živinami, čo môže viesť k zbytočnému rastu rastlín škodlivému pre ekosystém. Preto sa odstraňujú zrážaním alebo flokulačným procesom. Chemické čistenie vody zahŕňa aj elimináciu dusíka, ktorý sa odstraňuje procesom nitrifikácie a denitrifikácie. Pri nitrifikácii sa pridaním anaeróbných baktérií a kyslíka premení amónny kation na dusitan a v druhej fáze na dusičnan. Následná denitrifikácia je tiež vyvolaná anaeróbnymi mikroorganizmami. Tie prostredníctvom enzymatických aktivít rozkladajú dusičnany na plyný dusík a ten sa potom vracia do atmosféry. Mangán je zvyčajne prítomný v odpadovej vode ako hydrogenuhličitan manganatý. Pridaním kyslíku sa vytvárajú ťažko rozpustné zlúčeniny oxidu manganičitého, ktoré sa dajú ľahko z vody odstrániť^[86, 89].

2.8.1.4 Membránové procesy

Vo štvrtej a zároveň poslednej fáze čistenia sa používajú membránové a filtračné procesy. Táto fáza sa čiastočne kombinuje s chemickými procesmi zrážania a flokulácie. Do odpadovej vody sa pridávajú zrážadlá a vločkovacie činidlá na flokuláciu látok, ktoré sa budú separovať. Odpadová voda potom prechádza cez látkový alebo pieskový filter. Nanofiltrácia funguje veľmi podobným spôsobom. Na rozdiel od bežnej filtrácie však voda prechádza pod tlakom cez membránu, ktorá zadržiava aj tie najmenšie rozpustené častice, ako sú molekuly alebo ióny ťažkých kovov. To isté sa deje pri reverznej osmóze, kde sa používa ešte vyšší pracovný tlak a jemnejšie membrány. Znečisťujúce látky zadržané pri filtrácii, nanofiltrácii a reverznej osmóze sa filtrujú do kalov v podobe filtračného kalu cez primárnu čistiacu nádrž. Voda sa tak dostala do poslednej zóny ČOV – do nádrže na vyčistenú vodu. Tu sa znova odoberajú vzorky a kontroluje sa kvalita vody. Vyčistená voda sa vracia do vodného cyklu až po splnení zákonom predpísaných parametrov^[86].



Obrázok 20 Schéma komunálnej ČOV s tromi stupňami čistenia^[90]

Tento typ ČOV sa označuje ako trojstupňový: A–mechanický stupeň (1–česle, 2–lapač piesku, 3–usadzovacia nádrž); B–biologický stupeň (4–aktivačná nádrž, 5–dosadzovacia nádrž, 7– kalová vyhnivacia komora, 8–plynojem, 9–zahustenie kalu, 10–zníženie obsahu vody v kale a odvoz); C–chemický stupeň (6–koagulačná nádrž).

3 CIELE PRÁCE

V tejto diplomovej práci boli stanovené nasledovné ciele práce:

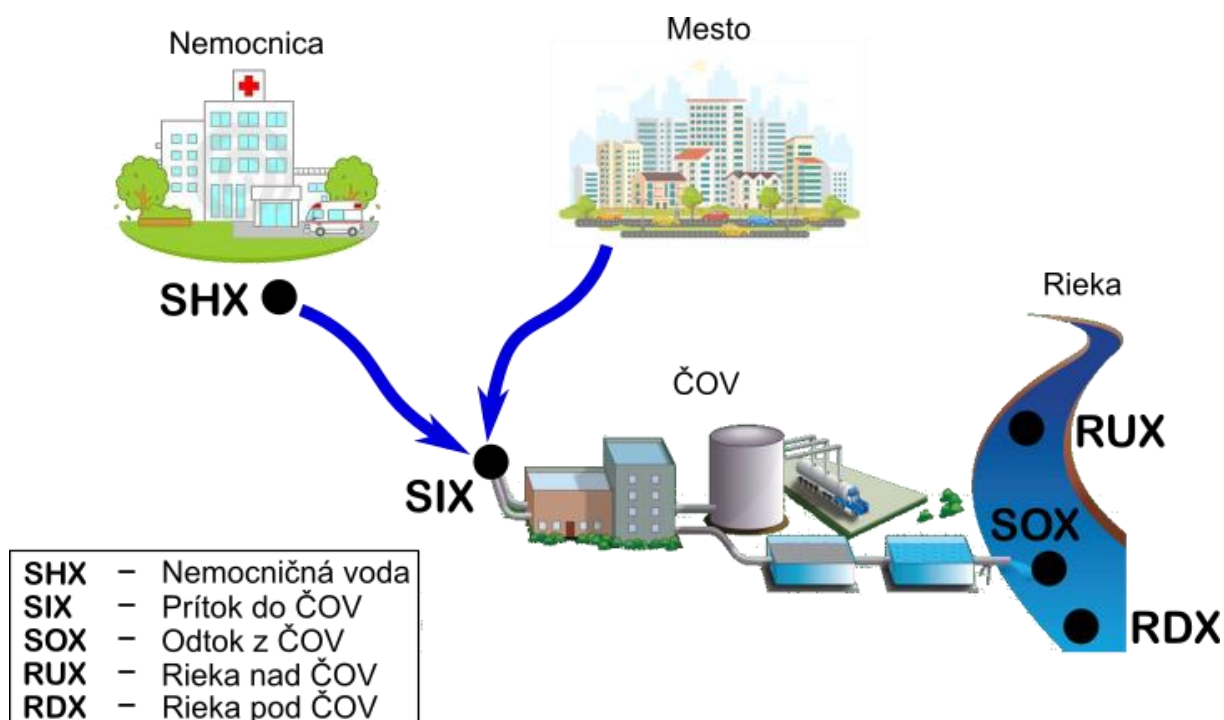
- Detekcia izolátov *Enterobacter* spp. rezistentných k β -laktamovým antibiotikám z mestských a nemocničných odpadových vôd a z rieky v blízkosti čistiarne odpadových vôd.
- U získaného súboru izolátov *Enterobacter* spp. stanoviť mechanizmus rezistencie k β -laktamovým antibiotikám a fenotypový profil rezistencie ku klinicky významným antibiotikám pomocou metód molekulárnej biológie a mikrobiológie.
- Porovnať klonálnu príbuznosť izolátov *Enterobacter* spp. s dôrazom na porovnanie izolátov pochádzajúcich z rôznych lokalít a typu vôd.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použitý materiál a prístroje

4.1.1 Zbierka *Enterobacter* spp. rezistentných k β -laktámom z odpadových vôd

V práci bolo pracované s prezumpčnou zbierkou 205 izolátov *Enterobacter* spp. rezistentných k β -laktámom. Kmene boli získané selektívnou kultiváciou zo vzoriek nemocničnej odpadovej vody, prítoku a odtoku do ČOV a rieky nad a pod ČOV z troch miest v Českej republike značených A, B, C (viď. Obrázok 21). Selektívna kultivácia bola realizovaná na pôde s prídavkom cefotaxímu (2 mg/l) alebo meropenému (0,125 mg/l) so $ZnSO_4$ (100 mg/l) a $NaHCO_3$ (4,2 g/l). Každému kmeňu bol priradený unikátny názov, ktorý v sebe zahŕňal označenie miesta odberu, poradové číslo kmeňa a antibiotikum použité na selektívnu kultiváciu.



Obrázok 21 Pôvod testovaných bakter. izolátov (pozn. X=označenie lokality, možné varianty A, B, C)
(autor Kocúrová)

4.1.2 Použité zbierkové mikroorganizmy

- prehľad zbierkových kmeňov, s ktorými bolo pracované je uvedený v *Tabuľka 1* vrátane taxonomického zaradenia a účelu použitia.

Tabuľka 1 Prehľad použitých zbierkových kmeňov

Označenie	Taxonomické zaradenie	Metodika
H9812	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar Braenderup	PFGE, hmotnostný štandard
279 e4	<i>E. coli</i> produkujúca AmpC β–laktamázu	Mastdisc™
172 DI/B	<i>E. coli</i> produkujúca ESBL	Mastdisc™
ATCC 25-922	<i>E. coli</i> citlivá k testovaným antibiotikám	Mastdisc™, MIKROLATEST
680m/10	<i>K. pneumoniae</i> produkujúca karbapenemázu KPC	Mastdisc™
V408	<i>P. aeruginosa</i> nesúci <i>bla</i> _{VIM-2}	PCR detekcia génu <i>bla</i> _{VIM}
V601	<i>K. pneumoniae</i> nesúca <i>bla</i> _{KPC-2}	PCR detekcia génu <i>bla</i> _{KPC}
V509	<i>A. baumannii</i> nesúci <i>bla</i> _{NDM-1}	PCR detekcia génu <i>bla</i> _{NDM}
36567 ENAS	<i>Enterobacter asburiae</i> nesúci <i>bla</i> _{IMI-2}	PCR detekcia génu <i>bla</i> _{IMI}
26/11	<i>K. pneumoniae</i> nesúci <i>bla</i> _{OXA-48}	PCR detekcia génu <i>bla</i> _{OXA-48}
1144 TF	transformant nesúci <i>bla</i> _{GES-5}	PCR detekcia génu <i>bla</i> _{GES}
3625	<i>P. aeruginosa</i> nesúci <i>bla</i> _{IMP-7}	PCR detekcia génu <i>bla</i> _{IMP}
CTX-M-1	<i>E. coli</i> nesúci <i>bla</i> _{CTX-M-1}	PCR detekcia génu <i>bla</i> _{CTX-M}

4.1.3 Antimikrobiálne látky pre selektívnu kultiváciu a fenotypové testy rezistencie

- cefotaxím 2 mg/l (Sigma-Aldrich, USA)
- meropeném 0,125 mg/l (Sigma-Aldrich, USA)
- súbor diskov od výrobcu pre fenotypové testy Mastdisc™ D72C a D73C (vid'. *Tabuľka 2*) (Mast Group Ltd., Nemecko)

Tabuľka 2 Zoznam použitých diskov pre fenotypové testy Mastdisc™

DISK	Typ testu a jeho detekcia	
	D72C	D73C
A	Peném	Cefpodoxím
B	Peném + MBL inhibítor	Cefpodoxím + ESBL inhibítor
C	Peném + KPC inhibítor	Cefpodoxím + AmpC inhibítor
D	Peném + AmpC inhibítor	Cefpodoxím + ESBL a AmpC inhibítor
E	Temocillín + MBL inhibítor	Cefpodoxím + ESBL inhibítor + AmpC induktor
F	–	Peném

- Súprava antibiotík od výrobcu pre stanovenie citlivosti k antibiotikám s uvedenou koncentračnou radou (viď. *Tabuľka 4* a *Tabuľka 5*), systematický prehľad použitých antibiotík a ich skratiek je uvedený v *Tabuľka 3* (Erba Lachema s.r.o. ČR)

Tabuľka 3 Použité antibiotiká pre testy MIKROLATEST

Prehľad antibiotík použitých k testom citlivosti				
Baktericídne	Aminoglykozidy		Gentamicín (GEN)	
			Amikacín (AMK)	
			Netilmicín (NET)	
			Tobramycín (TOB)	
	β-laktamové	Cefalosporíny		Cefazolín (CFZ)
				Cefuroxím (CXM)
				Cefepim (CEP)
				Cefoperazon (CPZ)
				Cefoperazon/sulbaktam (CPS)
				Ceftazidim (CAZ)
				Cefotaxim (CTX)
				Karbapenemy
		Meropenem (MER)		
		Monobaktamy		
		Penicilíny		Ampicilín (AMP)
Ampicilín/sulbaktam (AMS)				
Piperacilín (PIP)				
Piperacilín/tazobaktam (PIT)				
Chinolony		Ciprofloxacín (CIP)		
Polypeptidové		Kolistín (COL)		
Bakteriostatické	Pyrimidiny		Trimetoprim/sulfametoxazol (T/S)	
	Amfenikoly		Chloramfenikol (CMP)	
	Glycylcyklíny		Tigecyklín (TGC)	
	Tetracyklíny (TET)		Tetracyklíny (TET)	

Tabuľka 4 MIC G–I Rozloženie antibiotík a ich koncentračná rada v mg/l ^[91]

AMP	AMS	CFZ	CXM	AZT	GEN	AMK	COL	T/S	CIP	CMP	TET
ampicillin	ampicillin/sulbactam	cefazolin	cefturoxím	aztreonam	gentamicin	amikacin	colistin	trimethoprim/sulfamethoxazole	ciprofloxacín	chloramphenicol	tetracycline
128	128/64	16	64	16	32	64	16	4/76	8	32	32
64	64/32	8	32	8	16	32	8	2/38	4	16	16
32	32/16	4	16	4	8	16	4	1/19	2	8	8
16	16/8	2	8	2	4	8	2	0.5/9.5	1	4	4
8	8/4	1	4	1	2	4	1	0.25/4.75	0.5	2	2
4	4/2	0.5	2	0.5	1	2	0.5	0.12/2.38	0.25	1	1
2	2/1	0.25	1	0.25	0.5	1	0.25	0.06/1.19	0.12	0.5	0.5
1	1/0.5	0.12	0.5	0.12	0.25	0.5	0.12	0.03/0.6	0.06	0.25	control

Tabuľka 5 MIC G–II Rozloženie antibiotík a ich koncentračná rada v mg/l [91]

PIP	PIT	CTX	CAZ	CPZ	CPS	CEP	MER	ERT	TGC	NET	TOB
piperacilin	piperacilin/ tazobactam	cefotaxime	ceftazidime	cefoperazone	cefoperazone/ sulbactam	cefepime	meropenem	etapenem	tigecycline	netilmicin	tobramicin
128	128/4	8	16	64	64/32	16	16	2	8	16	8
64	64/4	4	8	32	32/16	8	8	1	4	8	4
32	32/4	2	4	16	16/8	4	4	0.5	2	4	2
16	16/4	1	2	8	8/4	2	2	0.25	1	2	1
8	8/4	0.5	1	4	4/2	1	1	0.12	0.5	1	0.5
4	4/4	0.25	0.5	2	2/1	0.5	0.5	0.06	0.25	0.5	0.25
2	2/4	0.12	0.25	1	1/0.5	0.25	0.25	0.03	0.12	0.25	0.12
1	1/4	0.06	0.12	0.5	0.5/0.25	0.12	0.12	0.015	0.06	0.12	control

4.1.4 Kultivačné médiá

- bakteriologický peptón (Difco, USA)
- MacConkey agar, MCA (OXOID, GBR)
- masopeptonový agar, MPA (OXOID, GBR)
- Mueller-Hinton agar, MH (OXOID, GBR)

4.1.5 Chemikálie na PCR, gélovú elektroforézu, pulznú gélovú elektroforézu a MALDI

- Combi PPP Master Mix (Top-Bio, ČR)
- destilovaná voda
- EDTA-Na₂·2H₂O (Sigma Aldrich, Čína)
- hmotnostný štandard 100 bp DNA ladder (Central European Bio-systems, ČR), fragmenty s veľkosťou 100-1500 bp, pred použitím sa riedi 150 µl PCR Ultra H₂O (Top-Bio, ČR)
- kyselina boritá (Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina α-kyano-4-hydroxyškoricová (Merck KGaA, Nemecko)
- Midori Green Advance MG04 (Nippon Genetics, Japonsko)
- oligonukleotidové primery (MACROGEN EUROPE)
- PCR Ultra H₂O (Top-Bio, ČR)
- SeaKem LE Agarose (Lonza, USA)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich, USA)
- 10x pufor (Takara Bio, Japonsko)
- BSA 0,1% (Takara Bio, Japonsko)
- ethidium bromid 10 mg/l (Top Bio, ČR)
- HCl 35% (Penta, ČR)
- NaOH (Sigma-Aldrich, Švédsko)
- N-lauroylsarkosin sodný (Sigma-Aldrich, USA)
- proteináza K (Serva Electrophoresis GmbH, Nemecko)
- restričná endonukleáza XbaI 50U/µl (Takara Bio, Japonsko)
- thiourea (Sigma-Aldrich, GBR)

4.1.6 Komerčné kity

- PCR DNA fragments extraction kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan)

4.1.7 Použité prístroje a software

- analytické váhy Scaltec SPB32
- analytické váhy Sartorius CPA225D
- centrifúga 5415R (Eppendorf, Nemecko)

- centrifúga 5425 (Eppendorf, Nemecko)
- centrifúga/vortex Multi-Spin MSC-6000 (BIOSAN, Litva)
- denzitometer Densi-La-Meter II (LIAP, Litva)
- digestor (Nuvia, ČR)
- dispenzor (Oxoid, GBR)
- DNA/RNA UV-dekontaminační box UVT-S-AR (BIOSAN, Litva)
- elektroforetická vaňa (Bio-Rad, USA, Thermo Fisher Scientific, USA)
- elektronická multikanálová pipeta Matrix (Thermo Fisher Scientific, USA)
- elektronická multikanálová pipeta E1 ClipTip (Thermo Fisher Scientific, USA)
- fotodokumentačný a analyzačný systém MF-ChemiBIS 3.2 (Bio-tech, ČR)
- hmotnostný spektrometer MALDI-TOF Microflex LT/SH (Bruker, USA)
- chladničky (Liebherr, Nemecko)
- inkubátor Lab Companion IB-25G (JeioTech, Južná Kórea)
- krokovacia pipeta Multipette M4 (Eppendorf, Nemecko)
- laboratórna váha PFB 600-2M (Kern, Nemecko), laboratórna váha EK-200G (A&D, Japonsko)
- laminárny box Safe 2020 Class II (Thermo Fisher Scientific, USA)
- laminárny box Safe Mate 0,9 Vision (Bioair, ČR)
- mikrocetifúga 3722L (Fisher Scientific, Južná Kórea)
- mrazák (-20 °C) (Liebherr, Nemecko)
- mrazák (-80 °C) (Liebherr, Nemecko)
- mikrovlnná trúba Hitachi MCE30 (Daewoo, Južná Kórea)
- multifunkčný modulárny reader Infinite 200 PRO (Tecan, Švajčiarsko)
- parný sterilizátor (autokláv) Sterilab (BMT Medical Technology, ČR)
- pulzná gélová elektroforéza (PFGE) CHEF-DR III (Bio-Rad, USA)
- pipeta FastPette Pro (Labnet, USA)
- sada automatických pipiet Research plus (Eppendorf, Nemecko)
- software BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Belgie)
- stolný trepačí inkubátor NB-205L (N-BIOTEK, Južná Kórea)
- sušiareň s nútenou cirkuláciou vzduchu VENTI-Line Prime (VWR, USA)
- termoblok Digital Heat Block BSH1004 (Benchmark Scientific, USA)
- termocykler Biometra Professional Trio (Analytik Jena, Nemecko)
- termocykler Veriti 96-Well fast (Thermo Fisher Scientific, USA)
- trepaný vodný kúpel NB-303 (N-BIOTEK, Južná Kórea)
- univerzálna chladená centrifúga Hermle Z326K (Hermle Labor-Technik, Nemecko)
- vodný kúpel LCB-030S (LabTech, Južná Kórea)
- vortex Vornado (Benchmark Scientific, USA), vortex V-1 Plus (BI-OSAN, Litva)
- zažehlovadlo krycích fólií na PCR platničky RS 232 (HTA, Taliansko)
- zdroj elektrického napätia Power Pac 300 Basic (Bio-Rad, USA)
- zdroj elektrického napätia Enduro 300 (Labnet, USA)

4.1.8 Použité laboratórne pomôcky

- bakteriologické filtre S-Pak Filters 0,22 µm (Merck Millipore, USA)
- filtračný papier
- formy na prípravu agarózových bločkov
- hliníková fólia
- kryokúmvavky CryoPure Tube 1,8 ml (Sarstedt, Nemecko)
- laboratorne sklo (Fisherbrand, USA; SCHOTT DURAN, Nemecko; Simax, ČR)
- latexové a nitrilové rukavice (Hartmann; OneMed)
- mikroskúmvavky 1,5 ml a 2,0 ml (Eppendorf, Nemecko)

- nožnice
- parafilm
- PCR platničky (Biologix, Čína)
- PCR stripy 200 μ l (Biologix, Čína)
- pinzety
- plastové krabičky na kryoskúmavky, mikroskúmavky a stripy
- plastové Petriho misky o priemere 90 mm (Ligamen)
- plastové stojany na skúmavky a mikroskúmavky
- plastové zámky na mikroskúmavky
- polystyrenová krabica na chladenie vzoriek ľadom
- pracovný chladiaci stojan na mikroskúmavky
- pravítko
- príslušenstvo (formy, hrebene) na prípravu gélov (Bio-Rad, USA)
- skalpely (Medin, ČR)
- sterilné Densi-La skúmavky 15 ml (Gama Group, ČR)
- sterilné dierované veká na plastové skúmavky 50 ml (Bio-Rad, USA)
- sterilné jednorazové ihly (BD Microlance™ 3, USA)
- sterilné jednorazové plastové hokejky (Biologix, Čína)
- sterilné jednorazové plastové kľučky 1 μ l a 10 μ l (Biologix, Čína)
- sterilné jednorazové plastové Pasteurove pipety (Copan, Itálie)
- sterilné jednorazové plastové sérologické pipety (Fisherbrand, Kanada)
- sterilné jednorazové špičky pre krokovaciú pipetu CombiTips advanced (Eppendorf, Nemecko)
- sterilné plastové špičky k automatickým pipetám (Top-Line, Nemecko; Neptune Scientific, USA)
- sterilné plastové skúmavky 50 ml (DispoLab, ČR)
- sterilné URIN skúmavky 10 ml (CC-CITO-CONT, ČR)
- sterilné vatové tampóny (Copan, Taliansko)
- ústne rúška (Henry Schein, Nemecko)
- zatavovacie krycie fólie na PCR platničky

4.2 Metodiky

U všetkých 205 prezumpívnych izolátov *Enterobacter* spp. bola izolovaná genómová DNA. Vzhľadom na veľké množstvo bakteriálnych izolátov bola DNA napipetovaná do 41 POOLOV po 5 kmeňoch. Následne bola u takto nachystanej DNA vykonaná simplexná PCR pre 8 hľadaných génov *bla*_{CTX-M}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMI}, *bla*_{GES} a *bla*_{OXA-48} vyhodnotená pomocou gélovej elektroforézy. Pozitívne vyhodnotené POOLY boli rozbalené a u prezumpívnych izolátov *Enterobacter* spp. bola vykonaná direct PCR na konkrétny hľadaný gén za účelom získania kolónie nesúcej záujmový gén.

Ako ďalší krok bola pozitívna kolónia z direct PCR prečistená. Vzorky boli pomocou krížového rozteru trikrát preočkované na médium MCA a štvrtýkrát na MPA. Zo štvrtej pasáže bola odobraná jedna kolónia, ktorá sa použila na identifikáciu rodu *Enterobacter* spp. pomocou MALDI-TOF. Pokiaľ sa jednalo o iný bakteriálny druh ako *Enterobacter* spp., izolát bol z tejto zbierky vyradený. Taktiež bola u kmeňov opäť overená prítomnosť hľadaného génu pomocou simplexnej PCR a prípadne Sangerovou sekvenáciou.

Všetky čisté bakteriálne izoláty nesúce záujmové gény boli zamrazené a boli ďalej charakterizované. Jednalo sa o fenotypové testy rezistencie (Mastdisc a MIC) a ich fylogenetickú príbuznosť (restrikčné štiepenie enzýmom *Xba*I s využitím pulznej gélovej elektroforézy).

4.2.1 Detekcia génov kódujúcich rezistenciu na β -laktámy

4.2.1.1 Izolácia bakteriálnej genómovej DNA

Presumptívne kmene *Enterobacter* spp. boli naočkované na MPA s prídavkom antibiotika cefotaxím (2 ml/l) alebo meropeném (0,125 mg/l) so $ZnSO_4$ (100 mg/l) a 2,1 g $NaHCO_3$ (4,2 g/l) a boli kultivované cez noc pri teplote 37 °C. Na druhý deň boli vypestované kultúry rozsuspendované v 500 μ l destilovanej vody v Eppendorfových mikroskúmavkách (1,5 ml) a boli vortexované. Mikroskúmavky boli vložené po dobu 10 minút do blokového ohrievača nastaveného na teplotu 100 °C pre lýzu bakteriálnych buniek. Po inkubácii boli mikroskúmavky vložené do centrifúgy na dve minúty pri 13 000 ot./minútu. Nakoniec bol supernatant obsahujúci izolovanú bakteriálnu genómovú DNA napipetovaný do sterilnej Eppendorfovej mikroskúmavky (1,5 ml) a bol uchovaný v mrazničke pri teplote -20 °C.

4.2.1.2 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

Prvým krokom k realizácii polymerázovej reťazovej reakcie bola príprava simplexnej PCR zmesi v PCR boxe podľa rozpisu (viď. *Tabuľka 6*).

Reakčná zmes bola pripravená zmiešaním MasterMix, PCR vody a oboch primerov. Táto zmes bola homogenizovaná pomocou vortexu a odstredená pomocou malej centrifúgy. Následne bola pripravená zmes napipetovaná do PCR platničky alebo stripov, kde do každej mikroskúmavky bolo napipetovaných 12 μ l tejto zmesi. Ďalej bolo do každej skúmavky napipetovaný 1 μ l bakteriálnej DNA a nakoniec negatívna a pozitívna kontrola. Po pridaní všetkých komponentov boli mikroskúmavky odstredené pomocou centrifúgy. Na záver boli stripy alebo platničky vložené do termocykleru, ktorý bol spustený podľa parametrov uvedených v kapitole 9 v *Tabuľka 15*. Produkty PCR reakcie boli detekované pomocou gélovej elektroforézy uvedenej v kapitole 4.2.1.4 a pozitívne PCR produkty boli overené pomocou Sangerovej sekvenácie podľa postupu uvedeného v kapitole 4.2.1.5.

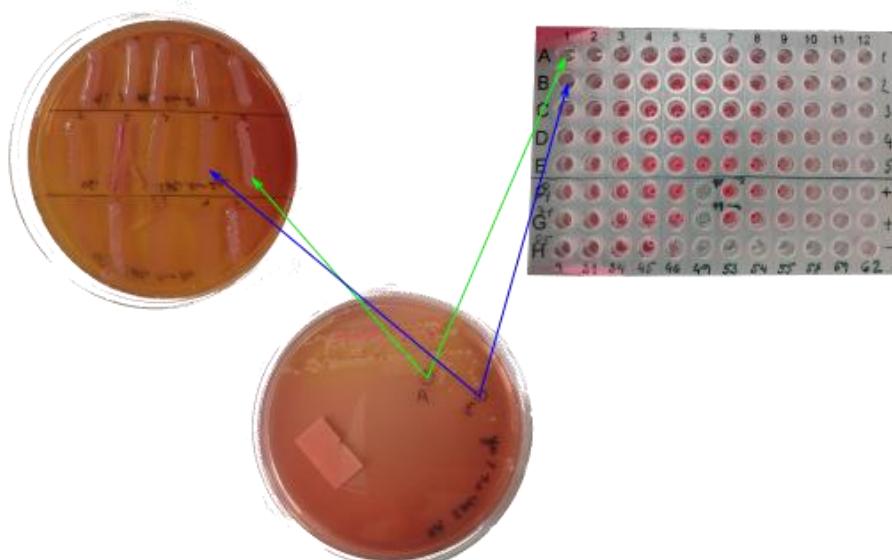
Tabuľka 6 Rozpis PCR zmesi na jednu vzorku

Komponenty	Objem komponenty [μ l]
MasterMix	6,25
PCR H ₂ O	4,75
Primer Fw (10 μ M)	0,5
Primer Rv (10 μ M)	0,5
DNA	1
Súčet	13

4.2.1.3 Direct PCR

Direct PCR slúži pre testovanie jednotlivých kolónií neprečistených kmeňov, umožňuje otestovať veľký počet kolónií, a tak zachytiť kolóniu nesúcu záujmový gén.

Do popísaných platničiek bolo sterilným špáradlom odpichnutých 5 náhodných kolónií a rovnakým špáradlom bola urobená označená čiarka na novú miskú. Do kultúry v platničke bola pridaná PCR zmes. Ďalej bola platnička uzatvorená hliníkovou fóliou a bola vložená na 1 minútu do centrifúgy. V nasledujúcom kroku bola platnička vložená do cyklieru, kedy program pre testovaný gén bol upravený v prvom kroku úvodnej denaturácie na 10 minút, aby došlo k lýze bakteriálnej kultúry. Prítomnosť génov bola overená pomocou gélovej elektroforézy uvedenej v kapitole 4.2.1.4.



Obrázok 22 Direct metóda
(autor Kocúrová)

4.2.1.4 Gélová elektroforéza

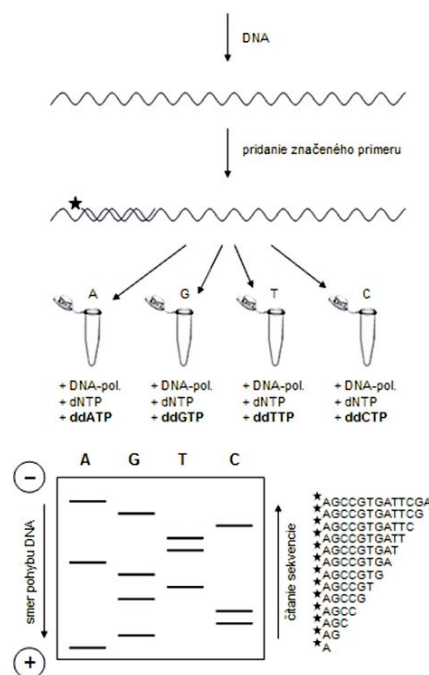
Pre vizualizáciu PCR produktov bola použitá gélová elektroforéza. Najprv bol pripravený v Erlenmeyerovej banke 1,5% agarózový gél rozpustením 1,2 g agarózy v 80 ml sterilného TBE pufru. Táto zmes bola varená v mikrovlnnej trúbe pokiaľ sa agaróza úplne nerozpustila. Následne bola zmes schladená pod prúdom studenej vody. Akonáhle sa zmes ochladila na 60 °C, pridalo sa 80 μ l zriedeného farbiva Midori Green. Celý roztok sa krátko miešal a vylial do pripravenej elektroforetickej formy s hrebeňmi. Nadbytočné bubliny boli odstránené pomocou sterilnej pipetovacej špičky. Elektroforetická vaňa bola naplnená dostatočným množstvom 1x TBE pufru, aby dosiahol približne 0,5 cm nad gél. Po 30 minútach pripravený gél stuhol a bol z neho opatrne odstránený hrebeň. Zatuhnutý gél bol prenesený do TBE pufru v elektroforetickej vani. Jamky boli naplnené 4 μ l PCR produktu a kontrol. DNA rebríčok

bol pridaný na začiatok a koniec každej línie gélu, aby bolo možné vyhodnotenie gélu. Elektroforetická vaňa bola nastavená na pomer 180 V/400 mA na 45 minút. Po ukončení procesu elektroforézy bol gél vložený do fotodokumentačného zariadenia, kde bol vyfotený a vyhodnotený.

4.2.1.5 Prečistenie PCR produktu pre Sangerovo sekvenovanie

Klasický postup Sangerovej metódy spočíva v syntéze protiľahlého reťazca DNA využitím rádioaktívne značeného primeru. Reakcia prebieha v štyroch skúmavkách, z ktorých v každej sa nachádzajú všetky štyri deoxy-nukleotidy (dNTP), ale pre každú skúmavku je špecifický malý prídavok určitého ddNTP (ddATP, ddCTP, ddTTP a ddGTP) (viď. *Obrázok 23*). Malé množstvo týchto dideoxy-nukleotidov spôsobí, že dochádza v prvom rade k začleňovaniu štandardných dNTP a len výnimočne ddNTP, ktorými sa zastavuje syntéza DNA reťazca. V konečnom dôsledku vznikne v každej skúmavke populácia rôzne veľkých DNA fragmentov zakončených konkrétnym ddNTP^[92]. Tieto fragmenty sa elektroforeticky separujú na polyakrylamidovom géli a vyhodnocujú podobne ako v prípade chemickej metódy sekvenovania DNA^[93].

Pre prečistenie PCR produktu bolo do každého stripu s PCR produktom pridaných 130 µl DF pufru. Následne bola zmes premiešaná pomocou pipety a bola prenesená na kolónku so zbernou skúmavkou. Kolónky so zbernými skúmavkami boli vložené do centrifúgy na 1 minútu pri 14 000 ot./min. Po scentrifugovaní bol supernatant vyliaty do odpadkovej kadičky. Potom bolo do kolóniek pridaných 600 µl wash pufru a opäť boli centrifugované pri 14 000 ot./min. Supernatant bol vyliaty a kolónky boli opäť centrifugované pri 14 000 ot./min. po dobu 3 minút. Následne boli kolónky vybrané zo zbernej skúmavky a boli preložené do sterilných skúmaviek Eppendorf. Do stredu každej kolónky bolo napipetovaných 25 µl predhriatej PCR vody na 65 °C. Zmes sa nechala inkubovať po dobu 5 minút. Následne boli kolónky v skúmavkách vložené do centrifúgy na 2 minúty pri 14 000 ot./min. Na záver bolo pred zaslaním pre analýzu do skúmaviek Eppendorf napipetovaných 7,5 µl DNA a 2,5 µl Fw primeru. Takto nachystaný prečistený PCR produkt s primerom bol odoslaný do firmy MacroGen (Amsterdam, Holandsko), kde bolo vykonané Sangerovo sekvenovanie. Výsledky boli následne vyhodnotené v programe Geneious 9.1.8 s pomocou dr. Sukkar.



Obrázok 23 Klasická Sangerova metóda sekvenovania DNA^[93]

4.2.2 Hmotnostná spektrometria MALDI–TOF

Hmotnostná spektrometria s laserovou desorpciou/ionizáciou za prítomnosti matrice s preletovým analyzátorom (MALDI–TOF) je používaná pre stanovenie molekulových hmotností rôznych chemických zlúčenín^[94].

Bakteriálne izoláty, u ktorých sa prostredníctvom PCR a elektroforézy potvrdila prítomnosť génov kódujúcich produkciu karbapenemáz, bolo nasledovne identifikované pomocou MALDI–TOF. Deň dopredu boli bakteriálne izoláty naočkované na médium MPA. Malé množstvo prečistenej bakteriálnej kultúry bolo nanosené v tenkej vrstve na nerezovú doštičku (vid' *Obrázok 24*). Na kultúru bolo kvapnuté malé množstvo matrice a potom sa čakalo na viditeľné uschnutie doštičky. Nerezová doštička bola vložená do prístroja, boli nastavené príslušné parametre a bol spustený proces merania, pri ktorom dochádzalo k ožarovaniu zmesi vzorky a matrice laserom. Matrica absorbovala dodanú energiu a svojím rozkladom ionizovala molekuly vzorky, ktoré sa následne separovali na základe pomeru ich molekulovej hmotnosti a náboja. Podľa doby dopadu ionizovaných častíc na detektor vznikol charakteristický profil hmotnostného spektra daného bakteriálneho kmeňa^[95].



Obrázok 24 Nanášanie bakteriálnej kolónie na nerezovú doštičku
(autor Kocúrová)

4.2.3 Fenotypové testy rezistencie

V rámci fenotypových testov rezistencie bola pomocou komerčných testov stanovená produkcia AmpC β -laktamáz, ESBL a karbapenemáz. Zároveň bola stanovená minimálna inhibičná citlivosť baktérií voči 24 antibiotikám mikrodilučnou metódou.

4.2.3.1 Mastdisc™ combi D72C AmpC, ESBL a karbapenemáza test

Na detekciu produkcie AmpC β -laktamáz, ESBL a karbapenemáz bol použitý komerčne dostupný kombinovaný test Mastdisc™.

Čisté bakteriálne kultúry boli naočkované na jednu štvrtinu MPA s príslušným antibiotikom. Ako pozitívna kontrola producenta AmpC β -laktamázy bol použitý kmeň *E. coli* CE 279 e4 (očkovaný na MPA + CTX), pozitívna kontrola producenta ESBL bol použitý kmeň *E. coli* 172 DI/B (očkovaný na MPA + CTX). Ako negatívna kontrola bol použitý kmeň *E. coli* ATCC 25922 (bez produkcie β -laktamázy, ktorý bol očkovaný na MPA bez ATB). Všetky vzorky boli inkubované pri 37 °C cez noc. Druhý deň boli sterilné skúmavky naplnené 5 ml sterilného fyziologického roztoku pomocou krokovej pipety. Niekoľko kolónií z každej vzorky bolo rozsuspendovaných a homogenizovaných vo fyziologickom roztoku pomocou vortexu. Zákal suspenzie bol zmeraný pomocou Densi–La–Metru a prípadne bol upravený pridaním kolónií alebo roztoku tak, aby zákal zodpovedal norme McFarlandovej stupnice 0,5 CFU/ml. Do sterilných misiek s agarom bolo vyliate pripravené inokulum a prebytočný roztok bol odpipetovaný plastovou Pasteurovou pipetou. Do naočkovanej misky boli sterilnou ihlou položené disky A, B, C, D, E a F podľa schémy určenej výrobcom. Po umiestnení diskov

boliisky umiestnené do termostatu a boli inkubované pri 37 °C do ďalšieho dňa. Zoznam diskov vrátane jeho detekcie je uvedený v kapitole 4.1.3.

Tretí deň boli pomocou pravítka zmerané inhibičné zóny všetkých diskov a boli zaznamenané do elektronickej kalkulačky D72C ESBL/AmpC/Carbapenemase Calculator od výrobcu. Tento protokol automaticky vypočítal rozdiely medzi jednotlivými zónami a určil fenotypový profil izolátu (producent ESBL, AmpC, obidvoch alebo žiadneho a taktiež suspektnej karbapenemázy).

4.2.3.2 Mastdisc™ combi D73C carba plus test

U bakteriálnych izolátov, kde v teste Mastdisc™ combi D72C bola zaznamenaná suspektná karbapenemáza bol pre dourčenie vykonaný ešte fenotypový test Mastdisc™ combi D73C. Pracovný postup bol podobný ako v kapitole 4.2.3.1, avšak bolo použitých 5 odlišných diskov (A, B, C, D a E) pre detekciu CPE a OXA-48. Zoznam diskov vrátane jeho detekcie je uvedený v kapitole 4.1.3. Pre vyhodnotenie bola taktiež použitá elektronickej kalkulačka od výrobcu D73C Carba plus Calculator.

4.2.3.3 Testy minimálnej inhibičnej koncentrácie MIKROLATEST

Súprava MIKROLATEST bol určený na stanovenie citlivosti k antibiotikám baktérií čeľadi *Enterobacteriaceae* na základe determinácie MIC (minimálnej inhibičnej koncentrácie), tzn. najnižšej koncentrácie, ktorá zabráni viditeľnému rastu baktérií. Princípom testu je rehydratácia antibiotík v jamkách doštičky pomocou Mueller Hinton II bujónu a pridania bakteriálnej suspenzie. Bakteriálne izoláty boli testované na 24 antibiotík (viď. *Tabuľka 3*), kde sa jednalo o dve doštičky G-I a G-II. Zoznam použitých antibiotík, vrátane koncentračnej rady a výrobcu je uvedený v kapitole 4.1.3.

V prvý deň boli naočkované bakteriálne kmene a kontrolný kmeň ATCC 25-922 ako v kapitole 4.2.3.1. Druhý deň boli sterilné skúmavky naplnené 2 ml sterilného fyziologického roztoku pomocou krokovej pipety. Niekoľko kolónií z každej vzorky bolo rozsuspendovaných a homogenizovaných vo fyziologickom roztoku pomocou vortexu. Zákal suspenzie bol zmeraný pomocou Densi-La-Metru a prípadne bol upravený pridaním kolónií alebo roztoku tak, aby zákal zodpovedal norme McFarlandovej stupnice 0,5 CFU/ml. Z bakteriálnej suspenzie bolo prenesených 60 µl do skúmaviek s 13 ml suspenzného média MIC a bol dobre homogenizovaný. Doštičky boli opatrne vybrané z alumíniového obalu a bola odstránená fólia. Doštičky boli popísané číslom vyšetrovanej kultúry a do všetkých 96 jamiek bolo napipetovaných 100 µl suspenzného média MIC pomocou multikanálovej pipety. Nainokulovaná doštička bola vložená do PE obalu, ktorého okraje boli zahnuté pod doštičku tak, aby nedochádzalo k vysychaniu inokula. Doštičky boli vložené do termostatu na dobu 16 hodín pri 37 °C. Nasledujúci deň boli doštičky z PE obalu vybrané a boli odčítané výsledky podľa *Tabuľka 7*.

Tabuľka 7 Klinické breakpointy MIC (mg/l) pre Enterobacteriaceae podľa EUCAST^{196]}

Antibiotikum	Skratka	EUCAST		
		Citlivý S	Intermediárny I	Rezistentný R
Ampicilín	AMP	≤8		>8
Ampicilín/sukbaktám	AMS	≤8/4		>8
Amikacín	AMK	≤8	16	>8
Aztreonam	AZT	≤1	2–4	>4
Cefazolín	CFZ	≤0,001		>4
Cefepím	CEP	≤1	2–4	>4
Cefoperazón	CPZ	≤16	32	≥64
Cefoperazón/sulbaktám	CPS	≤16	32	≥64
Cefotaxím	CTX	≤1	2	>2
Ceftazidím	CAZ	≤1	2–4	>4
Cefuroxím	CXM	≤0,001		>8
Ciprofloxacín	CIP	≤0,06	0,5	>0,5
Ertapeném	ERT	≤0,5	1	>0,5
Gentamicín	GEN	≤2		>2
Chloramfenikol	CMP	≤8		>8
Kolistín	COL	≤2		>2
Meropeném	MER	≤2	4–8	>8
Netimicín	NET	≤2	4	≥8
Piperacilín	PIP	≤8	16	>8
Piperacilín/tazobaktám	PIT	≤8/4	16/4	>8
Tetracyklín	TET	≤0,5		>0,5
Tigecyklín	TGC	≤0,5	2	>0,5
Tobramycín	TOB	≤2	4	>2
Trimetoprim/sulfametoxazol	T/S	≤2/38	4/76	>4

4.2.4 Určenie epidemiologickej príbuznosti metódou restričného štiepenia DNA s využitím pulznej gélovej elektroforézy

4.2.4.1 Príprava gélových bločkov z bakteriálnych kultúr

Najskôr boli naočkované čisté kultúry na MPA s prídavkom meropenému (0,125 g mg/l), ZnSO₄ (100 mg/l) a NaHCO₃ (4,2 g/l) alebo cefotaxímu (2,0 mg/l) a kontrolný kmeň *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Braenderup H9812 na MPA bez antibiotika.

Ako prvé boli zapnuté dva vodné kúpele a nechali sa temperovať na 50 °C a 55 °C. Potom bola pripravená 1,6% SeaKem gold agaróza, ktorá bola temperovaná pri teplote 55 °C. V 2 ml CSB bola pripravená pomocou kľučky suspenzia testovaných kmeňov a kontrolného kmeňa H9812 v denzila skúmavkách so zákalom 5,6 – 6 McFarlandovej stupnice. Potom bol pripravený príslušný počet mikroskúmaviek Eppendorf, do ktorých bolo napipetovaných 20 µl proteínázy K (20 mg/ml). Suspenzie so zákalom 5,6 – 6 boli zvortexované a 200 µl homogénnej suspenzie bolo prepipetovaných do príslušných mikroskúmaviek Eppendorf s proteínázou K a pipetou jemne premiešané opakovaným nasávaním a vypúšťaním. K 200 µl bunkovej suspenzie v mikroskúmavkách Eppendorf bolo pridaných 200 µl 1,6% vytemperovanej SeaKem gold agarózy a opakovaným nasatím a vypúšťaním pipetou bola zmes premiešaná. Zmes bola následne nanosená do tvorítok tak, aby sa nevytvorili žiadne bubliny, a bola ponechaná zatuhnúť 15 minút pri izbovej teplote.

4.2.4.2 Bunková lýza v agarózových bločkoch

Najskôr bolo pripravené príslušné množstvo lyzačného pufru (CLB). Potom boli bločky premiestnené do 5 ml CLB a inkubované 2 hodiny pri 54 °C vo vodnom kúpeli za stáleho trepania. Bločky museli byť celý čas pod hladinou CLB.

4.2.4.3 Premývanie agarózových bločkov

Vo vodnom kúpeli bola temperovaná destilovaná voda a TE pufoer na 50 °C. Po skončení lýzy bol vymenený CLB za destilovanú vodu a vzorky boli inkubované pri 50 °C vo vodnom kúpeli po dobu 15 minút za stáleho trepania. Tento proces bol ešte raz opakovaný. Premývací krok bol následne opakovaný 4x s predhriatým TE pufrom. Premyté bločky boli uchované v ponorenom TE pufore (v cca 1,5 ml) v kryoskúmavkách pri 4 °C až do zahájenia restričného štiepenia.

4.2.4.4 Restričné štiepenie DNA v gélových bločkoch

Restričné štiepenie DNA v bločkoch bolo vykonané s enzýmom *XbaI*. Najskôr sa nechal temperovať vodný kúpeľ na 55 °C. Bločky (vrátane kontrol) boli z kryoskúmaviek vytáňované pomocou menšej špachtličky a plastovej kľučky. Bločky boli nakrájané pomocou skalpelu, pričom ich dĺžka zodpovedala šírke jedného zubu na hrebienku. Získané rezy bločkov boli prenesené pomocou špachtličky do popísaných stripov. Následne boli bločky premývané po dobu 10 minút v 100 µl PCR H₂O. Potom bola pripravená restričná zmes (viď. *Tabuľka 8*). Následne bola odpipetovaná PCR H₂O zo skúmaviek, pipetovaním premiešaná restričná zmes a napipetovaná v objeme 100 µl do každého stripu s bločkom. Restričné štiepenie bolo realizované v termocyklere pri 37 °C po dobu 3 hodín. Počas štiepenia boli pripravené 3 litre 0,5x TBE pufru, pričom z neho bolo 150 ml použitých na prípravu gélu. K zostatku 0,5x TBE pufru bola pripadaná thiourea (cca na špičku skalpelu) a roztok bol uchovaný v chladničke. Tiež bol pripravený 1% agarózový géľ zmiešaním 1,5 g SeaKem gold agarózy so 150 ml 50x TBE (bez thiourei). Agaróza bola varená v mikrovlnnej trube a po uvarení temperovaná pri 55 °C. Po skončení štiepenia bola vymenená reakčná zmes za 100 µl sterilného 0,5x TBE pufru a bločky boli inkubované 10 minút pri izbovej teplote. Následne bol odpipetovaný TBE pufoer, bločky boli naskladané na hrebienok a boli ponechané zaschnúť asi po dobu 20 minút. Potom bol hrebienok vložený do formy, opatrne bol zaliaty 1% SeaKem gold agarózou a géľ bol nechaný zaschnúť. Na záver bola PFGE vaňa naplnená vychladeným roztokom 0,5x TBE pufrom s thiourea, zapnutá hlavná a chladiaca jednotka, vrátane pumpy, bolo nastavené chladenie na 14 °C a skontrolovaný obeh TBE pufru v systéme vane. Po zatuhnutí gélu (30 minút) bol hrebienok vytiahnutý z gélu. Géľ bol umiestnený do vane a následne bol spustený príslušný program.

Tabuľka 8 Množstvo komponentov na jednu vzorku pri štiepení enzýmom XbaI

Komponenty	Objem komponentov [µl]
Destilovaná voda	79,2
Reakčný pufoer 10x M	10
BSA	10
<i>XbaI</i> (50 U/µl)	0,8

4.2.4.5 Nastavenie programu PFGE

Podmienky pre štiepenie *XbaI* enzýmom boli nastavené nasledovne: počiatkový pulzný čas 2,2 sekundy; konečný pulzný čas 54,2 sekundy; pomer dĺžok pulzných časov 1; napätie 200 V (6 V/cm); čas behu 18 hodín.



*Obrázok 25 PGFE aparátúra
(autor Kocúrová)*

4.2.4.6 Farbenie gélu

Po skončení programu bol gél uzatvorený do vaničky s farbiacim roztokom ethidium bromidu (10 mg/l) po dobu 30 minút. V ďalšom kroku bol gél premytý v približne 1 litre chladenej destilovanej vody opäť po dobu 30 minút. Po skončení premytia bol gél vložený do fotodokumentačného zariadenia, bol vyfotený a vyhodnotený.

4.2.4.7 Vyhodnotenie gélu

Vyhodnotenie vyfotených gélov prebiehalo v programe BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Belgicko) a výsledkom bolo zostavenie dendogramov pre jednotlivé bakteriálne rody.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Vyhodnotenie selektívnej kultivácie

V tejto diplomovej práci bola skúmaná zbierka 205 prezumpčných izolátov z rodu *Enterobacter* spp. získaných selektívnou kultiváciou na pôde s prídavkom cefotaxímu alebo meropenému z rôznych typov vôd. Vzorky vody pochádzali z 3 miest v Českej republike (A, B a C). Z každého mesta boli odobrané vzorky z nemocničných odpadových vôd. V prípade prítoku a odtoku do ČOV a z riek nad a pod ČOV boli získané vzorky iba z mesta A a B. Celkovo izoláty pochádzali z 11 rôznych lokalít uvedených v *Tabuľka 9*.

Najväčšie množstvo izolátov pochádzalo z nemocničných odpadových vôd (n=78), čo tvorilo 38,0 % z celkového množstva získaných izolátov. Menšie množstvo izolátov bolo získaných z okolia ČOV. Z prítoku do ČOV bolo izolovaných 53 kmeňov, ktoré predstavovali 25,9 % z celkového zastúpenia. Podobne tak bolo aj v mieste odtoku z ČOV, kde bolo získaných 51 bakteriálnych izolátov, pričom predstavovali 24,9% zastúpenie. Najmenšie množstvo kmeňov bolo získaných z riek v okolí ČOV. Z rieky, ktorá sa nachádzala nad ČOV bolo získaných 12 kmeňov, čo tvorilo 5,9 %. Taktiež bolo získaných 11 kmeňov, ktoré pochádzali z rieky pod ČOV, čo tvorilo 5,4% zastúpenie z celkového množstva testovaných izolátov.

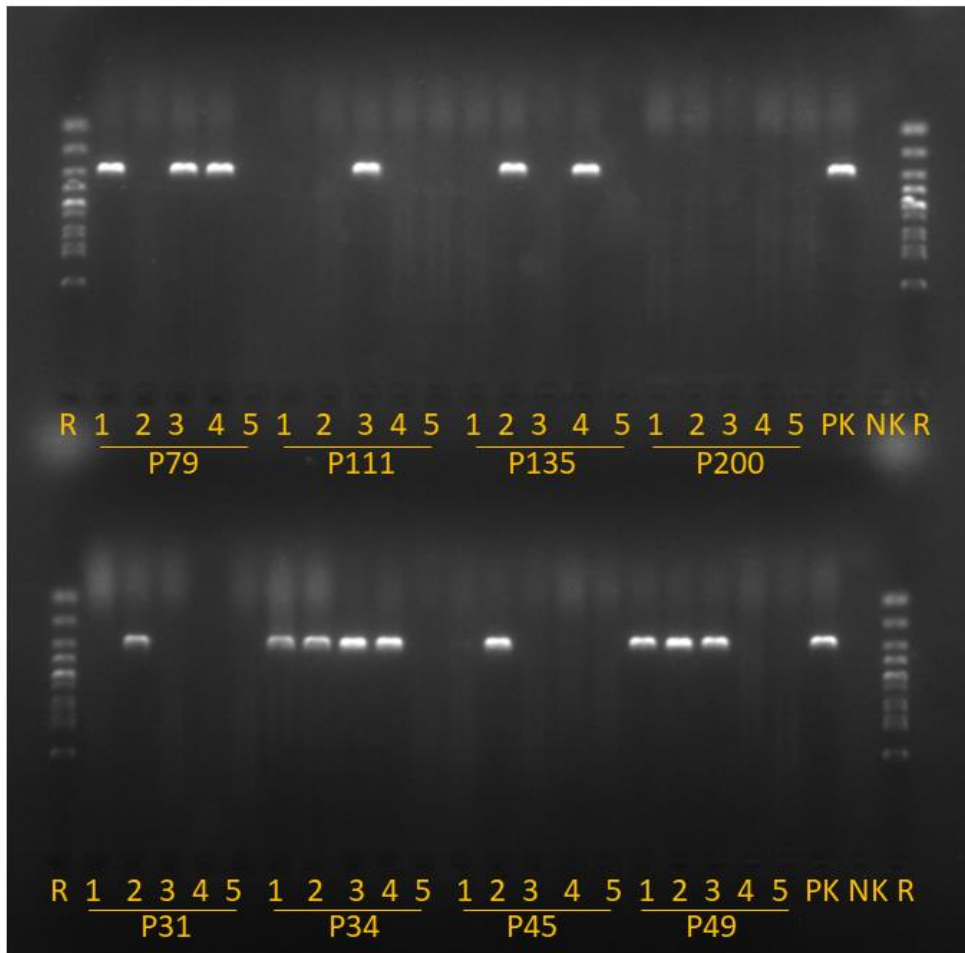
Tabuľka 9 Prehľad izolovaných bakteriálnych kmeňov na základe odberného miesta

Miesto odobratia vzoriek	Označenie miesta	Počet skúmaných izolátov [-]		Podiel zastúpenia [%]	
		Celkovo	V jednotlivých miestach	Celkovo	V jednotlivých miestach
Nemocničná voda	SHA	78	30	38,0	14,6
	SHB		2		1,0
	SHC		46		22,4
Prítok do ČOV	SIA	53	41	25,9	20,0
	SIB		12		5,9
Odtok z ČOV	SOA	51	38	24,9	18,5
	SOB		13		6,3
Rieka nad ČOV	RUA	12	12	5,9	5,9
	RUB		0		0,0
Rieka pod ČOV	RDA	11	10	5,4	4,9
	RDB		1		0,5
SUMA	-	205	205	100	100

5.2 Typizácia a charakterizácia bakteriálnych izolátov

5.2.1 Detekcia génov kódujúcich produkciu β -laktamáz

Pre detekciu génov, ktoré kódujú β -laktamázy, bola použitá metóda PCR s následnou gélovou elektroforézou (príklad vyhodnotenia gélovej elektroforézy je znázornený na *Obrázok 26* – detekcia génu *bla_{GES}*). Bakteriálne izoláty boli testované na prítomnosť génov kódujúcich produkciu ESBL (*bla_{CTX-M}*, *bla_{GES}*) a karbapenemáz (*bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMI}*, *bla_{GES}*, *bla_{OXA-48}*).

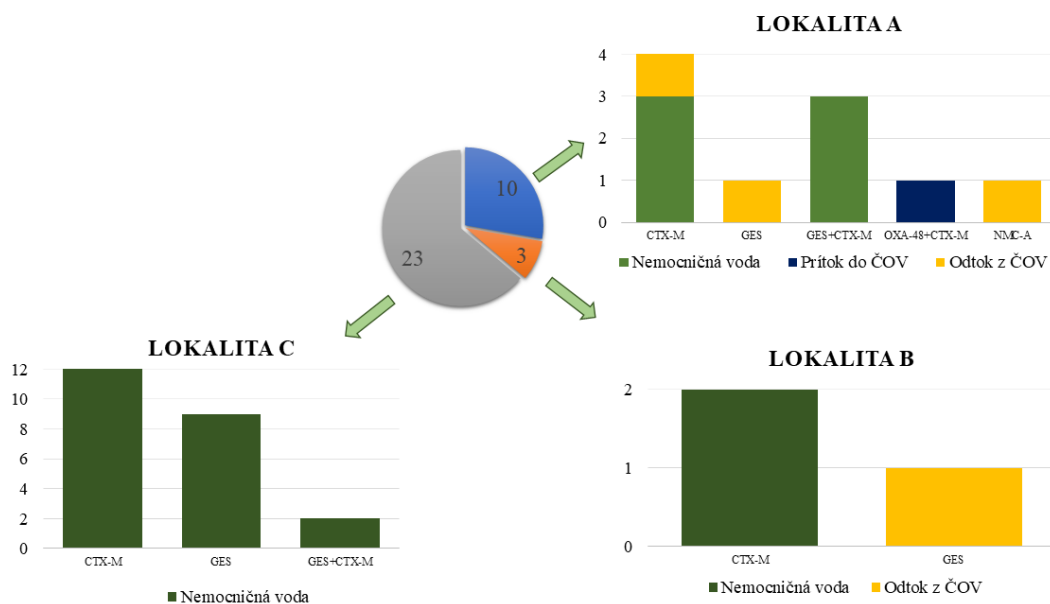


Obrázok 26 Vyhodnotenie gélovej elektroforézy z direct PCR pre gén *bla_{GES}*
R–rebríček, P–POOL, PK–pozitívna kontrola, NK–negatívna kontrola

V získanom súbore 205 bakteriálnych izolátov bola detekovaná prítomnosť týchto rezistentných génov u 36 izolátov *Enterobacter* spp. pochádzajúcich celkovo zo šiestich rôznych lokalít (vid'. *Obrázok 27* a *Tabuľka 10*). Vo zvyšných piatich miestach (rieky nad a pod ČOV v mestách A aj B a v prítoku do ČOV v meste B) nebola detekovaná prítomnosť izolátov nesúcich záujmové gény. Z celkových 36 izolátov *Enterobacter* spp. bolo 23 izolátov kultivovaných na médiu s prídavkom cefotaximu a 13 izolátov na médiu s prídavkom meropenému (vid'. *Tabuľka 13*).

Z ôsmich hľadaných génov bola nájdená iba polovica skúmaných génov. Až v 50 % prípadoch bol zachytený gén *bla_{CTX-M}*, ktorý sa hlavne nachádzal u izolátov pochádzajúcich z nemocničných odpadových vôd a v jednom prípade z odtoku ČOV v meste A. Tiež bol zachytený s kombináciou génu *bla_{GES}* (13,9 %), pričom tieto gény boli detekované opäť u izolátov z nemocničných odpadových vôd. Podobne tak bolo aj v prípade samotného génu *bla_{GES}* (30,6 %), ktorý sa nachádzal tiež u izolátov z nemocničnej odpadovej vody, avšak bol zachytený iba v meste C a v odtoku ČOV v mestách A a B.

Zároveň bola u jedného izolátu nájdená aj kombinácia génov *bla*_{CTX-M} a *bla*_{OXA-48} (2,8 %), ktorý pochádzal z odtoku ČOV v meste A. Posledný zachytený gén predstavoval *bla*_{NMC-A} (2,8 %), ktorý bol detekovaný u izolátu pochádzajúceho z odtoku ČOV z mesta A. Tento gén však nebol detekovaný pomocou PCR, ale bol identifikovaný na základe Sangerovej metódy sekvencie keďže zdieľa podobnú sekvenciu ako testovaný gén *bla*_{IMI}.



Obrázok 27 Grafické znázornenie detekovaných génov v súbore 36 izolátov *Enterobacter* spp.

Tabuľka 10 Detekované gény v súbore 36 izolátov *Enterobacter* spp.

Detekovaná varianta génu <i>bla</i>	Miesto odberu						Celkové zastúpenie [-]	Celkové zastúpenie [%]
	Nemocničná voda			Prítok do ČOV	Odtok z ČOV			
	A	B	C		A	B		
CTX-M	3	2	12	–	1	–	18	50,6
GES	–	–	9	–	1	1	11	30,6
GES+CTX-M	3	–	2	–	–	–	5	13,9
OXA-48+CTX-M	–	–	–	1	–	–	1	2,8
NMC-A	–	–	–	–	1	–	1	2,8
Súčet	6	2	23	1	3	1	36	100,0

Najčastejším záujmovým génom zachyteným v našej zbierke izolátov *Enterobacter* spp. bol gén *bla*_{CTX-M} (50,6 %) kódujúci produkciu širokospektrálnej β -laktamázy. Na celosvetovej úrovni sa výskytom širokospektrálnych β -laktamáz v odpadových vodách zaoberali Zaatout et al.^[97], ktorí porovnávali výsledky 57 štúdií zameraných na kmene z čelade *Enterobacteriaceae* produkujúcich ESBL. Zistenia tejto štúdie sú podobné s výsledkami tejto práce, kde bola pozorovaná prevalencia kmeňov produkujúcich CTX-M u 66,56 % izolátov naprieč štúdiami.

Problematikou výskytu *Enterobacteriaceae* produkujúcich karbapenemázy v Českej republike sa zaoberala aj štúdia autorov Žemličková et al.^[46, 47], ktorí skúmali výskyt CPE v ČR v rokoch 2011 – 2019. Jedným z výsledkov tejto štúdie bolo zistenie, že najviac zastúpené karbapenemázy v ČR sú OXA-48, pričom v rokoch 2014 – 2019 bol detekovaný záchyt *Enterobacter cloacae* v 161 prípadoch. V našej zbierke 36 izolátov *Enterobacter* spp. bola najčastejšie detekovaná karbapenemáza GES (30,6 %), kde síce nebola určená varianta, ale na základe fenotypových testov bolo dokázané, že tieto izoláty boli producenti karbapenemáz. Jediná ďalšia detekovaná karbapenemáza, ktorá sa často nachádza u pacientov bola OXA-48 (2,8 %). Vzorky autorov Žemličková et al. však pochádzali priamo od hospitalizovaných pacientov, narozdiel od vzoriek odpadových vôd použitých v tejto práci. Tento rozdiel je pravdepodobnou príčinou odlišnosti výsledkov.

Z publikácie autorov Wilson et al.^[98] vyplýva, že výskyt CPE a pomer výskytu génov rezistencie je v jednotlivých krajinách Európy odlišný. Autori uvádzajú, že tento rozdiel je spôsobený rôznou spotrebou antibiotík v jednotlivých krajinách a nemocniciach, pričom najvyšší výskyt CPE bol zaznamenaný v Taliansku, Turecku a Španielsku. Rozdiely v množstve izolátov nesúcich gény rezistencie boli rovnako zaznamenané aj v mojej práci. Počet pozitívne testovaných izolátov sa výrazne líšil v závislosti na lokalite odberu daných testovaných vzoriek, čo môže byť spôsobené práve odlišnou spotrebou antibiotík v konkrétnej nemocnici. Bohužiaľ informácie o konkrétnej spotrebe antibiotík v nemocniciach nie sú verejne dostupné a preto nie sme schopní túto domienku potvrdiť.

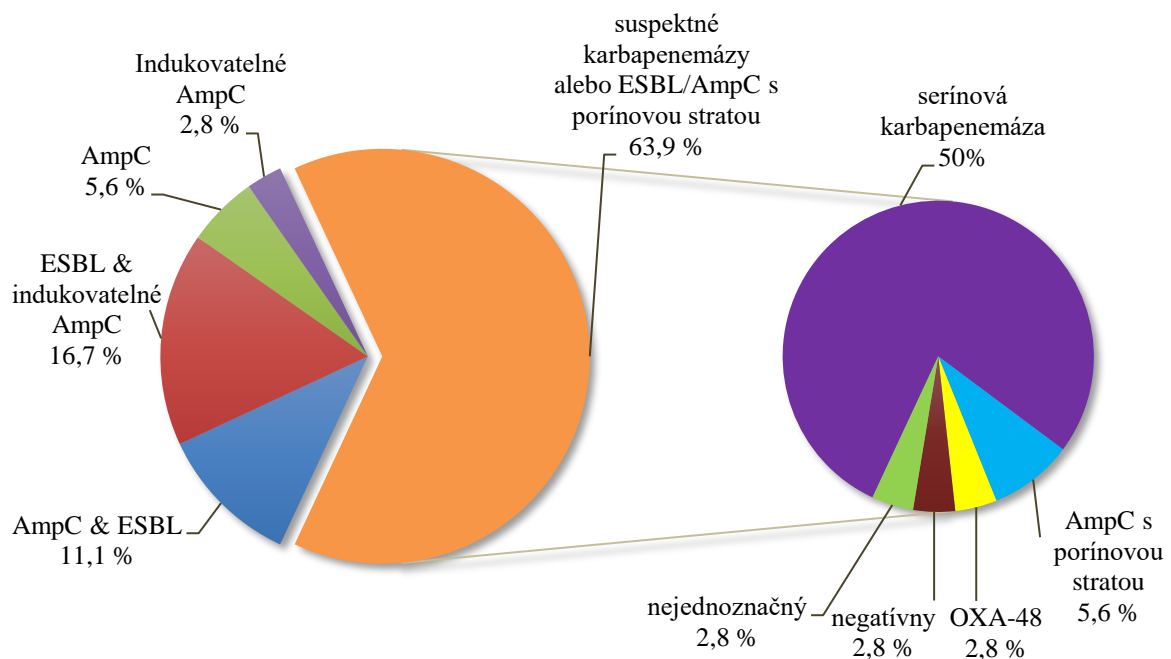
5.3 Vyhodnotenie fenotypových testov rezistencie

5.3.1 Výsledok produkcie β -laktamáz

U všetkých 36 bakteriálnych izolátov, ktoré niesli gény pre produkciu β -laktamáz bol vykonaný fenotypový test Mastdisc™. Na základe testu bola zistená produkcia AmpC β -laktamázy, ESBL a takisto aj serínové karbapenemázy a karbapenemázy OXA-48 (viď. Obrázok 28 a Tabuľka 11).

Ako prvý bol vykonaný Mastdisc™ combi D72C test pre zachytenie produkcie AmpC β -laktamázy a ESBL. V tomto prípade bola najčastejšie detekovaná produkcia ESBL & indukované AmpC (16,7 %). Hneď za ním nasledovala produkcia AmpC & ESBL (11,1 %). Iba v dvoch prípadoch bola zachytená produkcia AmpC (5,6 %) a v jednom prípade indukované AmpC (2,8 %). Vzhľadom na to, že tento test skoro v 64 % prípadoch nedokázal rozlíšiť produkciu β -laktamáz (suspektné karbapenemázy alebo ESBL/AmpC s porínovou stratou), bol vykonaný ešte doplňujúci Mastdisc™ D73C Carba plus test.

V druhom teste bolo testovaných zvyšných nejasne určených 23 izolátov. Tento test odhalil v 50 % prípadoch produkciu serínovej karbapenemázy z celkových 36 izolátov. Taktiež bola zachytená produkcia AmpC s porínovou stratou (5,6 %), OXA-48 (2,8 %), a tiež bol zaznamenaný jeden negatívny a nejednoznačný výsledok (2,8 %).



Obrázok 28 Graf produkcie β -laktamáz v súbore 36 izolátov *Enterobacter* spp.

Tabuľka 11 Produkcia β -laktamáz u súboru 36 izolátov *Enterobacter* spp.

Produkcia	Počet	Zastúpenie [%]
serínová karbapenemáza	18	50,0
ESBL & indukovateľné AmpC	6	16,7
AmpC & ESBL	4	11,1
AmpC	2	5,6
AmpC s porínovou stratou	2	5,6
Indukovateľné AmpC	1	2,8
OXA-48	1	2,8
negatívny	1	2,8
nejednoznačný	1	2,8
suma	36	100,0

Problematikou výskytu β -laktamáz v odpadových sa venovali aj autori Daoud et al.^[99] a Zaatout et al.^[97]. V štúdiu Daoud et al. pochádzali vzorky z nemocničnej odpadovej vody v Libanone. Zistili, že izoláty *E. cloacae* produkovali v 87,5 % AmpC β -laktamázu, čo v našej štúdiu bolo naopak, iba 41,8 % izolátov v našej zbierke patrilo k producentom AmpC β -laktamázy. Naopak autori Zaatout et al. skúmali celosvetovo okrem nemocničnej odpadovej vody aj komunálne odpadové vody vrátane riek v ich okolí. V ich štúdiu dospeli k záveru, že k najbežnejším producentom ESBL v odpadových vodách patrí *E. coli*, po ktorej nasleduje *Klebsiella* spp. a *Enterobacter* spp. Okrem toho tvrdia, že v nemocničných odpadových vodách bol zaznamenaný najvyšší výskyt ESBL, v našom prípade bola produkcia ESBL detekovaná u 27,8 % izolátov (viď. Tabuľka 13). Vysoký výskyt producentov ESBL môže byť spôsobený častým užívaním antibiotík 3. generácie cefalosporínov v jednotlivých nemocniciach z rôznych krajín sveta, čo následne selektuje producentov ESBL.

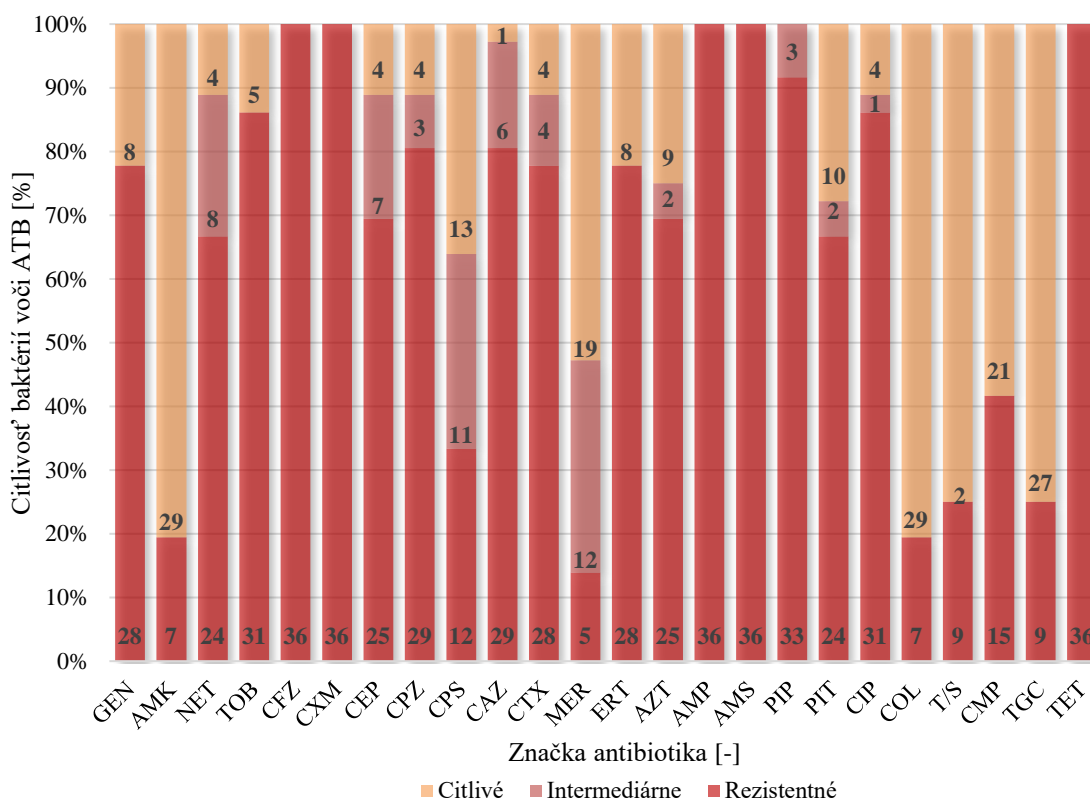
5.3.2 Vyhodnotenie fenotypu rezistencie k 24 antibiotikám

V súbore 36 izolátov *Enterobacter* spp. bola ďalej určená minimálna inhibičná koncentrácia u 24 najčastejšie používaných klinických antibiotík pomocou komerčného testu MIKROLATEST (viď. Obrázok 29 a Tabuľka 12), pričom 20 testovaných antibiotík patrilo do skupiny s baktericídnym účinkom a 4 z nich s bakteriostatickým účinkom.

Z β -laktamových antibiotík bola testovaná rezistencia voči rôznym antibiotikám patriacich do skupiny penicilínov, cefalosporínov, karbapenémov a monobaktámov. U testovaných penicilínov bolo v prípade antibiotika ampicilín a ampicilín/sulbaktám zaznamenaná rezistencia u všetkých 36 izolátov *Enterobacter* spp. (100 %). V prípade piperacilínu bola zaznamenaná rezistencia u 33 izolátov (91,7 %). Najmenej častá rezistencia z tejto skupiny antibiotík bola zaznamenaná v prípade antibiotika piperacilín/tazobaktám, kde bolo rezistentných iba 24 izolátov (66,4 %). U cefalosporínov bola všeobecne zaznamenaná vysoká rezistencia izolátov. Pre antibiotiká cefazolín a cefuroxím, patriace do 1. a 2. generácie cefalosporínov bola zaznamenaná rezistencia u všetkých izolátov (100 %). U antibiotík patriacich do 3. generácie cefalosporínov bola detekovaná rôzna miera rezistencie. Najvyššia rezistencia bola zaznamenaná u 29 izolátov k cefoperazónu a cefazidímu (80,6 %), za nimi nasledoval cefotaxím (77,8 %) a cefoperazón/sulbaktám (33,3 %). Zo 4. generácie cefalosporínov bolo testované antibiotikum cefepím, kde bola zaznamenaná rezistencia u 25 izolátov (69,4 %). Zo skupiny karbapenémov bola pozorovaná rezistencia u 28 izolátov na ertapeném (77,8 %) a u 5 izolátov na meropeném (13,9 %). Zo skupiny monobaktámov, bol testovaný aztreonam, kde bola pozorovaná rezistencia u 25 izolátov (69,4 %). Kmene boli získané selektívnou kultiváciou, a preto sa očakávalo, že budú rezistentné k penicilínovým antibiotikám a nižším triedam cefalosporínov.

U antibiotík patriacich do skupiny aminoglykozidov bola najvyššia rezistencia pozorovaná u antibiotika tobramycín (86,1 %) a gentamycín (77,8 %). Nižšia miera rezistencie bola zaznamenaná u netilmicínu (66,7 %) a amikacínu (19,4 %), kde bola rezistencia zaznamenaná iba u 7 izolátov. U chinolónového antibiotika ciprofloxacínu bola zaznamenaná rezistencia u 31 izolátov (86,1 %), naopak u polypeptidového antibiotika kolistínu bola pozorovaná rezistencia iba u 7 izolátov (19,4 %).

U antibiotík s bakteriostatickým účinkom bola pozorovaná rôzna miera antibiotickej rezistencie. Najviac kmeňov vykazovalo rezistenciu na tetracyklínové antibiotiká (100 %). Menej často bola detekovaná rezistencia v prípade amfenikolov (41,7 %), kde bolo testované antibiotikum chloramfenikol. U pirimidínových a glycylycyklínových antibiotík bola zaznamenaná rezistencia iba u 9 izolátov (25,0 %), kde boli testované antibiotiká trimetoprim/sulfametozaxol a tigecyklín.



Obrázok 29 Graf fenotypu rezistencie k antimikrobiálnym látkam 36 izolátov *Enterobacter spp.*

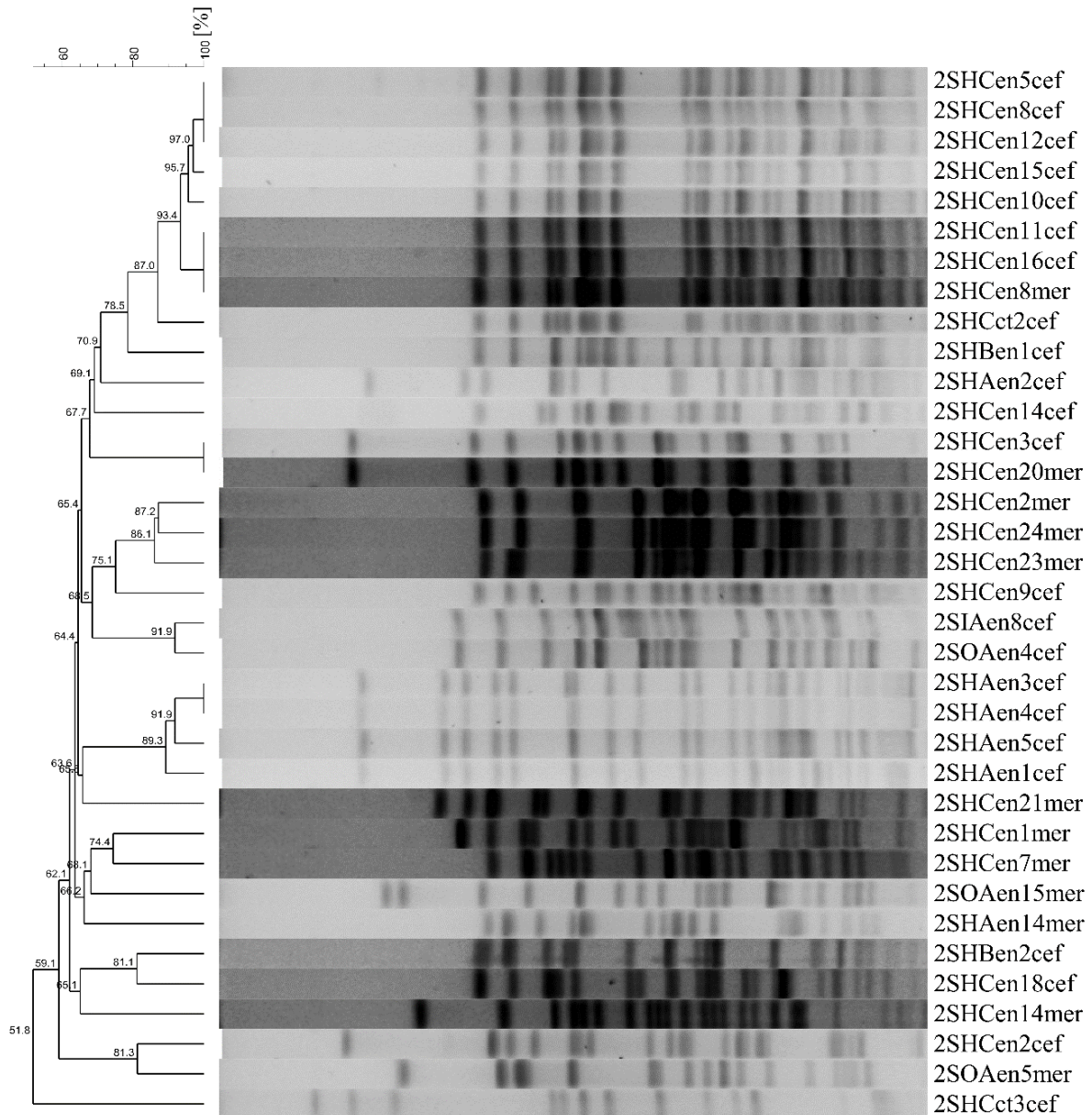
Tabuľka 12 Prehľad fenotypu rezistencie u 36 izolátov *Enterobacter spp.*

Skupina	Skratka ATB	Fenotyp rezistencie					
		Rezistentný		Intermediárny		Citlivý	
		Počet izolátov [-]	Podiel [%]	Počet izolátov [-]	Podiel [%]	Počet izolátov [-]	Podiel [%]
Aminoglykozidy	GEN	28	77,8	0	0,0	8	22,2
	AMK	7	19,4	0	0,0	29	80,6
	NET	24	66,7	8	22,2	4	11,1
	TOB	31	86,1	0	0,0	5	13,9
Cefalosporíny	CFZ	36	100,0	0	0,0	0	0,0
	CXM	36	100,0	0	0,0	0	0,0
	CEP	25	69,4	7	19,4	4	11,1
	CPZ	29	80,6	3	8,3	4	11,1
	CPS	12	33,3	11	30,6	13	36,1
	CAZ	29	80,6	6	16,7	1	2,8
	CTX	28	77,8	4	11,1	4	11,1
Karbapenémy	MER	5	13,9	12	33,3	19	52,8
	ERT	28	77,8	0	0,0	8	22,2
Monobaktámy	AZT	25	69,4	2	5,6	9	25,0
Penicilíny	AMP	36	100,0	0	0,0	0	0,0
	AMS	36	100,0	0	0,0	0	0,0
	PIP	33	91,7	3	8,3	0	0,0
	PIT	24	66,7	2	5,6	10	27,8
Chinolóny	CIP	31	86,1	1	2,8	4	11,1
Polypeptidy	COL	7	19,4	0	0,0	29	80,6
Pirimidíny	T/S	9	25,0	0	0,0	27	75,0
Amfenikoly	CMP	15	41,7	0	0,0	21	58,3
Glycylcyklíny	TGC	9	25,0	0	0,0	27	75,0
Tetracyklíny	TET	36	100,0	0	0,0	0	0,0

Antimikrobiálnej citlivosti sa vo svojej štúdií venovali autori Sib et al.^[100], kde sa zamerali na štúdium výskytu a citlivosti ECC v nemeckých nemocničných zariadeniach. V tejto štúdií bola najčastejšie zaznamenaná rezistencia na antibiotiká piperacilín, cefotaxím, ceftazidím a ciprofloxacín. Naopak, zvýšená citlivosť bola zaznamenaná u antibiotík imipeném, meropeném a trimetoprim/sulfametoaxol. Tieto výsledky sa zhodujú s našimi výsledkami uvedenými v Tabuľka 12.

5.4 Základná charakteristika jednotlivých izolátov pomocou PFGE

Pre určenie klonálnej príbuznosti izolátov bola použitá metóda restričného štiepenia za využitia pulznej gélovej elektroforézy. Na základe pulzných profilov boli kmene zoradené do 20 nepríbuzných klastrov, kde do rovnakého klastru spadali izoláty so zhodným makrorestričným profilom nad 85 % (viď. Obrázok 30). Pokiaľ bolo viac izolátov zaradených do rovnakého príbuzného klastru, vždy sa jednalo o izoláty s pôvodom z rovnakej lokality. Celkom bolo vyhodnotených 35 izolátov. Jeden izolát nebol zahrnutý do analýzy kvôli nečitateľnému výsledku.



Obrázok 30 Dendrogram izolátov *Enterobacter* spp.

5.4.1 Súhrn charakterizácie 36 izolátov *Enterobacter* spp.

Získané charakteristiky 36 izolátov *Enterobacter* spp. boli sumarizované do výslednej tabuľky (vid'. *Tabuľka 13*). V prvom klastre bolo príbuzných 9 izolátov *Enterobacter* spp. Všetky tieto izoláty pochádzali z nemocničnej odpadovej vody z lokality C, pričom všetky niesli gén *bla*_{CTX-M}. U 7 izolátov bola detekovaná produkcia serínovej karbapenemázy, aj keď CTX-M patrí do ESBL, a preto by bolo potrebné overiť tento výsledok pomocou celogenómovej sekvenácie, čo však nebolo obsahom tejto práce. U izolátu 2SHCct2cef z klastru 1e bola detekovaná kombinácia génov *bla*_{CTX-M} + *bla*_{GES} a bola u nej určená nejednoznačná produkcia karbapenemáz. U izolátu 2SHCen15cef z klastru 1b nebola zaznamenaná produkcia karbapenemázy. Do druhého klastru zapadala iba jedna vzorka, ktorá pochádzala z nemocničnej odpadovej vody z lokality B. Bol u nej detekovaný gén *bla*_{CTX-M} a pozorovaná produkcia ESBL & indukateľné AmpC. Izolát pochádzajúci z tretieho klastru pochádzal taktiež z nemocničnej odpadovej vody, ale vyskytoval sa v lokalite A. U tohto izolátu bol zachytený gén *bla*_{CTX-M} a produkcia serínovej karbapenemázy.

Vo štvrtom klastre sa nachádzal izolát z nemocničnej odpadovej vody z lokality C a niesol gén *bla*_{CTX-M} a produkoval ESBL & indukateľné AmpC. Do piateho klastru boli zoradené dva izoláty, ktoré pochádzali z nemocničnej odpadovej vody z lokality C a oba niesli gén *bla*_{CTX-M}, pričom prvý z nich produkoval ESBL & indukateľné AmpC a druhý ESBL & AmpC. Do šiesteho klastru zapadli 3 kmene pochádzajúce z nemocničnej odpadovej vody z lokality C. Všetky tieto izoláty niesli gén *bla*_{GES} a v súlade s genotypom produkovali serínovú karbapenemázu. V siedmom klastri sa nachádzal iba jeden izolát pochádzajúci z nemocničnej odpadovej vody, ktorý niesol kombináciu génov *bla*_{CTX-M} + *bla*_{GES} a produkoval serínovú karbapenemázu.

Vzorky z ôsmeho klastru pochádzali z prítoku a odtoku ČOV z lokality A. U kmeňa 2SIAen8cef (klastre 8a) bola detekovaná kombinácia génov *bla*_{CTX-M} + *bla*_{OXA-48} a produkcia OXA-48. V prípade druhého kmeňa 2SOAen4cef (klastre 8b) bol detekovaný gén *bla*_{CTX-M} a produkcia ESBL & indukateľné AmpC. V deviatom klastre sa nachádzali 4 izoláty pochádzajúce z nemocničnej odpadovej vody z lokality A. U tejto skupiny izolátov boli zachytené gény *bla*_{CTX-M} a v troch prípadoch *bla*_{CTX-M} + *bla*_{GES}. Bola u nich pozorovaná produkcia ESBL & AmpC a tiež serínová karbapenemáza. V desiatom klastre sa nachádzal jeden izolát z nemocničnej odpadovej vody pochádzajúcej z lokality C. Bol u neho zachytený gén *bla*_{GES} a produkcia serínovej karbapenemázy. V nasledujúcich klastroch sa zakaždým v jednom klastre nachádzal jeden izolát.

V klastre 11 a 12 pochádzali izoláty z nemocničnej odpadovej vody z lokality C, pričom oba niesli gén *bla*_{GES}, avšak u vzorky z jedenásteho klastru bolo zaznamenané indukateľné AmpC a u vzorky z dvanásteho klastru AmpC, tieto kmene by bolo vhodné detailnejšie charakterizovať metódou WGS. Vzorka z trinásteho klastru pochádzala z odtoku ČOV z lokality A. Niesla gén *bla*_{GES} a produkovala AmpC s porínovou stratou. Vzorky z klastru 14, 15, 16, 17 a 18 taktiež pochádzali z nemocničnej odpadovej vody ale z rôznych lokalít. Boli u nich zachytené gény *bla*_{CTX-M} a *bla*_{GES}, pričom produkovali ESBL & indukateľné AmpC, serínovú karbapenemázu, ESBL & AmpC a AmpC so porínovou stratou. V devätnástom klastre sa nachádzala vzorka z odtoku ČOV z lokality A, pričom niesla gén *bla*_{NMC-A} a produkovala serínovú karbapenemázu. Vzorka z 20 klastru pochádzala z nemocničnej odpadovej vody z lokality A a bol u nej zachytený výskyt génu *bla*_{GES} a produkcia AmpC. Posledná vzorka, ktorá pochádzala z odtoku ČOV z lokality B a niesla gén *bla*_{GES} s produkciou serínovej karbapenemázy nebola zaradená do klonálnej analýzy kvôli jej nečitateľnému výsledku.

Diplomová práca bola zameraná na najčastejšie vyskytujúce sa gény udávajúce produkciu ESBL a karbapenemáz. Zo súhrnnej charakterizácie zbierky kmeňov *Enterobacter* spp. bolo zistené, že genotyp izolátov nezodpovedal vo všetkých prípadoch jeho fenotypu. Určité varianty génu *bla*_{GES} kódujú produkciu karbapenemáz (serínové karbapenemázy), pričom väčšina z nich spôsobuje produkciu ESBL. Z tohto dôvodu by bolo vhodné izoláty ďalej charakterizovať celogenómovou sekvenáciou pre zistenie celkového obsahu génov rezistencie, a tým by sa vyjasnili nezhody genotypu a fenotypu. Celogenómová sekvenácia však nebola náplňou tejto diplomovej práce, ale vďaka zisteným výsledkom bude v rámci projektu, ktorého je diplomová práca súčasťou spravený výber izolátov na WGS.

Tabuľka 13 Súhrn charakterizácie 36 izolátov *Enterobacter* spp. časť 1

Názov izolátu	Selektívne médium	Lokalita	Miesto odberu	PFGE klaster	Detekovaná varianta génu <i>bla</i>	Produkcia β -laktamáz	Fenotyp rezistencie	
							R	I
2SHCen5cef	CEF	C	Nemocničná odpadová voda	1a	CTX-M	serínová karbapenemáza	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, COL, CIP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, CPZ, CPS, CEP, ERT, NET, TOB	MER
2SHCen8cef	CEF	C	Nemocničná odpadová voda	1a	CTX-M	serínová karbapenemáza	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, CIP, CMP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, CPZ, CPS, CEP, ERT, NET, TOB	MER
2SHCen12cef	CEF	C	Nemocničná odpadová voda	1a	CTX-M	serínová karbapenemáza	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, CIP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, CPZ, CPS, CEP, ERT, TOB	MER, NET
2SHCen15cef	CEF	C	Nemocničná odpadová voda	1b	CTX-M	negatívna karbapenemáza	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, CIP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, CPZ, CPS, CEP, ERT, TOB	MER, NET
2SHCen10cef	CEF	C	Nemocničná odpadová voda	1c	CTX-M	serínová karbapenemáza	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, CIP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, CPZ, CPS, CEP, ERT, NET, TOB	MER
2SHCen11cef	CEF	C	Nemocničná odpadová voda	1d	CTX-M	serínová karbapenemáza	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, CIP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, CPZ, CPS, CEP, MER, ERT, NET, TOB	-
2SHCen16cef	CEF	C	Nemocničná odpadová voda	1d	CTX-M	serínová karbapenemáza	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, CIP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, CPZ, CPS, CEP, ERT, NET, TOB	MER
2SHCen8mer	MER	C	Nemocničná odpadová voda	1d	CTX-M	serínová karbapenemáza	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, COL, CIP, TET, PIP, PIT, CTX, XAZ, CPZ, CPS, CEP, ERT, NET, TOB	-
2SHCct2cef	CEF	C	Nemocničná odpadová voda	1e	CTX-M, GES	nejednoznačné	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, COL, CIP, CMP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, CPZ, CPS, CEP, MER, ERT, TGC, NET, TOB	-

Tabuľka 13 Súhrn charakterizácie 36 izolátov *Enterobacter* spp. časť 2

Názov izolátu	Selektívne médium	Lokalita	Miesto odberu	PFGE klastery	Detekovaná varianta génu <i>bla</i>	Produkcia β -laktamáz	Fenotyp rezistencie	
							R	I
2SHBen1cef	CEF	B	Nemocničná odpadová voda	2	CTX-M	ESBL, induk. AmpC	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, COL, T/S, CIP, CMP, TET, PIP, CTX, CAZ, CPZ, CEP, TGC, NET, TOB	PIT, CPS
2SHAen2cef	CEF	A	Nemocničná odpadová voda	3	CTX-M	serínová karbapenemáza	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, AMK, CIP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, CPZ, CPS, CEP, ERT, NET, TOB	MER
2SHCen14cef	CEF	C	Nemocničná odpadová voda	4	CTX-M	ESBL, induk. AmpC	AMP, AMS, CFZ, CXM, GEN, CIP, CMP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, CPZ, CEP, ERT	AZT, CPS, NET
2SHCen3cef	CEF	C	Nemocničná odpadová voda	5a	CTX-M	ESBL, induk. AmpC	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, AMK, CMP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, CPZ, CPS, MER, ERT, TGC, TOB	CIP, CEP, NET
2SHCen20mer	MER	C	Nemocničná odpadová voda	5b	CTX-M	ESBL, AmpC	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, T/S, CIP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, CPZ, CPS, ERT, TGC, NET, TOB	CPS
2SHCen2mer	MER	C	Nemocničná odpadová voda	6a	GES	serínová karbapenemáza	AMP, AMS, CFZ, CXM, GEN, AMK, CIP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, CPZ, ERT, NET, TOB	CPS, CEP
2SHCen24mer	MER	C	Nemocničná odpadová voda	6b	GES	serínová karbapenemáza	AMP, AMS, CFZ, CXM, GEN, AMK, CIP, TET, PIP, PIT, CAZ, CPZ, ERT, NET, TOB	CTX, CPS, CEP
2SHCen23mer	MER	C	Nemocničná odpadová voda	6c	GES	serínová karbapenemáza	AMP, AMS, CFZ, CXM, CIP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, ERT, NET, TOB	CPZ, CEP
2SHCen9cef	CEF	C	Nemocničná odpadová voda	7	CTX-M, GES	serínová karbapenemáza	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, CIP, CMP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, CPZ, CEP, ERT, TOB	CPS, NET

Tabuľka 13 Súhrn charakterizácie 36 izolátov *Enterobacter* spp. časť 3

Názov izolátu	Selektívne médium	Lokalita	Miesto odberu	PFGE klaster	Detekovaná varianta génu <i>bla</i>	Produkcia β -laktamáz	Fenotyp rezistencie	
							R	I
2SIAen8cef	CEF	A	Prítok do ČOV	8a	CTX-M, OXA-48	OXA-48	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, AMK, COL, T/S, CIP, CMP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, CPZ, CPS, TGC, NET	CEP
2SOAen4cef	CEF	A	Odtok z ČOV	8b	CTX-M	ESBL, induk. AmpC	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, AMK, CIP, CMP, TET, PIP, CTX, CAZ, CPZ, CEP, NET, TOB	PIT, CPS
2SHAen3cef	CEF	A	Nemocničná odpadová voda	9a	CTX-M	ESBL, AmpC	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, T/S, CIP, TET, PIP, CTX, CAZ, CPZ, CEP, ERT, NET, TOB	-
2SHAen4cef	CEF	A	Nemocničná odpadová voda	9a	CTX-M, GES	serínová karbapenemáza	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, T/S, CIP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, CPZ, CEP, ERT, NET, TOB	CPS, MER
2SHAen5cef	CEF	A	Nemocničná odpadová voda	9b	CTX-M, GES	ESBL, AmpC	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, T/S, CIP, TET, PIP, CTX, CAZ, CPZ, CEP, ERT, NET, TOB	MER
2SHAen1cef	CEF	A	Nemocničná odpadová voda	9c	CTX-M, GES	serínová karbapenemáza	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, CIP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, CPZ, CEP, MER, ERT, NET, TOB	CPS
2SHCen21mer	MER	C	Nemocničná odpadová voda	10	GES	serínová karbapenemáza	AMP, AMS, CFZ, CXM, CIP, CMP, TET, ERT, TGC, TOB	PIP, CTX, CAZ, CEP, NET
2SHCen1mer	MER	C	Nemocničná odpadová voda	11	GES	induk. AmpC	AMP, AMS, CFZ, CXM, CMP, TET, PIP, TGC	CAZ
2SHCen7mer	MER	C	Nemocničná odpadová voda	12	GES	AmpC	AMP, AMS, CFZ, CXM, COL, CIP, TET, TOB	PIP, CAZ, NET

Tabuľka 13 Súhrn charakterizácie 36 izolátov *Enterobacter* spp. časť 4

Názov izolátu	Selektívne médium	Lokalita	Miesto odberu	PFGE klaster	Detekovaná varianta génu <i>bla</i>	Produkcia β -laktamáz	Fenotyp rezistencie	
							R	I
2SOAen15mer	MER	A	Odtok z ČOV	13	GES	AmpC s porínovou strat.	AMP, AMS, CFZ, CXM, GEN, CIP, TET, PIP, PIT, CPZ, ERT, TOB	CTX, CAZ
2SHAen14mer	MER	A	Nemocničná odpadová voda	14	CTX-M	ESBL, induk. AmpC	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, TET, PIP, CTX, CAZ, CPZ, CEP, NET, TOB	-
2SHBen2cef	CEF	B	Nemocničná odpadová voda	15	CTX-M	ESBL, induk. AmpC	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, COL, T/S, CIP, CMP, TET, PIP, CTX, CPZ, CEP, TOB	CAZ, NET
2SHCen18cef	CEF	C	Nemocničná odpadová voda	16	CTX-M	serínová karbapenemáza	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, T/S, CMP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, CPZ, CEP, ERT, TGC, NET, TOB	CPS
2SHCen14mer	MER	C	Nemocničná odpadová voda	17	GES	ESBL, AmpC	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, T/S, CIP, CMP, TET, PIP, CTX, CPZ, CEP, NET, TOB	CAZ
2SHCen2cef	CEF	C	Nemocničná odpadová voda	18	GES	AmpC s porínovou strat.	AMP, AMS, CFZ, CXM, AZT, GEN, AMK, CMP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, CPZ, CEP, ERT, TGC, NET, TOB	CPS
2SOAen5mer	MER	A	Odtok z ČOV	19	NMC-A	serínová karbapenemáza	AMP, AMS, CFZ, CXM, TET, MER, ERT	PIP
2SHCct3cef	CEF	C	Nemocničná odpadová voda	20	GES	AmpC	AMP, AMS, CFZ, CXM, CIP, CMP, TET, PIP, PIT, CTX, CAZ, CEP, ERT, NET, TOB	AZT, CPZ, MER
2SOBen7mer	MER	B	Odtok z ČOV	-	GES	serínová karbapenemáza	AMP, AMS, CFZ, CXM, CIP, CMP, TET, PIP, PIT, CAZ, ERT	CTX, CPZ, CEP

6 ZÁVER

Objav antibiotík bol jedným z najväčších úspechov ľudstva v 20. storočí, ktorý spôsobil revolúciu v modernej biomedicíne. Avšak nadmerné používanie akéhokoľvek terapeutického liečiva zvyšuje potenciál rozvoja rezistencie. Táto diplomová práca je zameraná na úlohu odpadových vôd v šírení génov rezistencie k významným klinickým antibiotikám ako sú cefalosporíny a karbapenémy. Cieľom práce bolo detekovať izoláty *Enterobacter* spp. rezistentných k β -laktámovým antibiotikám z mestských a nemocničných odpadových vôd a z rieky v blízkosti ČOV. Následne bol u získaného súboru izolátov *Enterobacter* spp. stanovený mechanizmus rezistencie k β -laktámovým antibiotikám a fenotypový profil rezistencie ku klinicky významným antibiotikám. Na záver bola porovnaná klonálna príbuznosť izolátov *Enterobacter* spp. V rámci diplomovej práce bol zdokumentovaný literárny prehľad o súčasnej problematike antibiotickej rezistencie, enterobakteroch ako významných humánných patogénoch nesúcich gény rezistencie k zásobným antibiotikám, základný prehľad o β -laktámových antibiotikách ako významnej triede antibiotík, prehľad a význam mobilných genetických elementov a vysvetlenie úlohy odpadových vôd v šírení génov rezistencie.

U skúmanej zbierky 205 izolátov *Enterobacter* spp. z odpadových vôd bolo detekovaných 36 izolátov, ktoré niesli záujmové gény rezistencie. Najviac zastúpený gén bol *bla*_{CTX-M} (50 %) a *bla*_{GES} (30,6 %). U šiestich izolátov bola detekovaná prítomnosť dvoch génov, jednalo sa o kombináciu génov *bla*_{GES} + *bla*_{CTX-M} (13,9 %) a *bla*_{OXA-48} + *bla*_{CTX-M} (2,8 %). U jedného kmeňa bol zaznamenaný gén *bla*_{NMC-A} (2,8 %). Z 36 izolátov nesúcich záujmový gén, pochádzalo 31 z nemocničných odpadových vôd (z lokality A, B a C), jeden izolát pochádzal z prítoku do ČOV (z lokality A) a 4 kmene pochádzali z odtoku ČOV (z lokality A a B). U fenotypových testov bola najčastejšie zaznamenaná produkcia serínovej karbapenemázy (50 %), čo je spôsobené karbapenemázou GES. Ďalej bola u izolátov zaznamenaná produkcia ESBL & indukovateľné AmpC (16,9 %), AmpC & ESBL (11,1 %), AmpC (5,6 %), AmpC s porínovou stratou (5,6 %), indukovateľné AmpC (2,8 %), OXA-48 (2,8 %) a taktiež bol zaznamenaný jeden negatívny a jeden nejednoznačný výsledok produkcie β -laktamáz (2,8 %). Pri testovaní minimálnej inhibičnej koncentrácie bola zaznamenaná rezistencia u všetkých 36 charakterizovaných izolátov *Enterobacter* spp. na tetracyklínové antibiotiká, penicilínové antibiotiká ampicilín a ampicilín/sulbaktám a cefalosporínové antibiotiká cefazolín a cefotaxím. Naopak, veľká časť izolátov bola citlivá k antibiotikám amikacín (80,6 %), kolistín (80,6 %), trimetoprim/sulbaktám (75,0 %) a tigecyklín (75,0 %). Na záver bola určená klonálna príbuznosť izolátov pomocou pulznej gélovej elektroforézy, kde boli kmene zoradené do 20 nepríbuzných klastrov.

Antimikrobiálna rezistencia je pretrvávajúcim problémom celosvetového významu. Poznatky o epidemiológii baktérií rezistentných na antimikrobiálne látky a mechanizmoch, ktoré sa na nich podieľajú, sú jedným z nevyhnutných krokov v boji proti nej. Možným riešením, ako obmedziť šírenie génov antibiotickej rezistencie do životného prostredia cez odpadové vody, je vylepšenie procesu čistenia týchto vôd v ČOV. Jednou z možností je zavedenie tzv. kvartérneho stupňa čistenia, ktorý spočíva vo využití metód ozonizácie, oxidácie, UV žiarenia a prídanie filtru s aktívnym uhlím. Cieľom je odstránenie rezíduí antibiotík, ale aj ďalších emergentných polutantov uvoľňujúcich sa do životného prostredia, kde tvoria stresové faktory pre selekciu génov antibiotickej rezistencie u bakteriálnych spoločenstiev. Je potrebné však zdôrazniť, že zavedenie týchto metód v ČOV je v súčasnosti ekonomicky veľmi náročné a uskutočniteľné iba v rozvinutých krajinách. Avšak hlavným cieľom v riešení antibiotickej rezistencie by mala byť dlhodobou udržateľná rovnováha medzi všetkým v našom prostredí, vrátane baktérií na podporu ľudského zdravia. Ako jedna z možných odpovedí na zhoršujúcu sa situáciu antibiotickej rezistencie by sa mohol stať koncept „Jedného zdravia“, ktorý navrhuje komplexné interdisciplinárne riešenie zameriavajúce sa nie len na zdravie človeka, ale tiež zvierat a celého životného prostredia ako vzájomne prepojených a ovplyvňujúcich sa oblastí. Poznatky prezentované v tejto diplomovej práci prispeli k pochopeniu antimikrobiálnej rezistencie v odpadových vodách, ktoré sú ďalej vypúšťané do životného prostredia.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] LIMA, Lidia Moreira, Bianca Nascimento Monteiro da SILVA, Gisele BARBOSA a Eliezer J. BARREIRO. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European journal of medicinal chemistry*. 2020, roč. 208 [vid. 26. únor 2022]. ISSN 1768-3254.
- [2] MOHR, Kathrin I. History of Antibiotics Research. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2016, roč. 398, s. 237–272 [vid. 21. březen 2022]. ISSN 21969965.
- [3] NEMETH, Johannes, Gabriela OESCH a Stefan P. KUSTER. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015, roč. 70, č. 2, s. 382–395 [vid. 26. únor 2022]. ISSN 1460-2091.
- [4] HUTCHINGS, Matt, Andrew TRUMAN a Barrie WILKINSON. Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*. 2019, roč. 51, s. 72–80 [vid. 26. únor 2022]. ISSN 1879-0364.
- [5] PANDEY, Neelanjana a Marco CASCELLA. Beta Lactam Antibiotics. *Antibiotic Discovery and Development*. 2022, roč. 9781461414001, s. 79–117 [vid. 5. březen 2022].
- [6] WORTHINGTON, Roberta J. a Christian MELANDER. Overcoming resistance to β -lactam antibiotics. *The Journal of organic chemistry*. 2013, roč. 78, č. 9, s. 4207–4213 [vid. 7. březen 2022]. ISSN 1520-6904.
- [7] BUSH, Karen a Patricia A. BRADFORD. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2016, roč. 6, č. 8 [vid. 27. únor 2022]. ISSN 2157-1422.
- [8] *Illustrated Glossary of Organic Chemistry - Ring strain*. [vid. 9. duben 2022]. Dostupné z: https://www.chem.ucla.edu/~harding/IGOC/R/ring_strain.html
- [9] MILLER, Elissa Lane. The penicillins: a review and update. *Journal of midwifery & women's health*. 2002, roč. 47, č. 6, s. 426–434 [vid. 4. březen 2022]. ISSN 1526-9523.
- [10] DUAN, Xiao Yi, Yuan ZHANG, Jia Qing YAN, Yu ZHOU, Guo Hui LI a Xue Song FENG. Progress in Pretreatment and Analysis of Cephalosporins: An Update Since 2005. *Critical reviews in analytical chemistry*. 2021, roč. 51, č. 1, s. 55–86 [vid. 27. únor 2022]. ISSN 1547-6510.
- [11] BUI, Toai a Charles V. PREUSS. Cephalosporins. *NCBI*. 2021 [vid. 1. březen 2022].
- [12] KHAN, David A., Aleena BANERJI, Jonathan A. BERNSTEIN, Basar BILGICER, Kimberly BLUMENTHAL, Mariana CASTELLS, Daniel EIN, David M. LANG a Elizabeth PHILLIPS. Cephalosporin Allergy: Current Understanding and Future Challenges. *The journal of allergy and clinical immunology. In practice*. 2019, roč. 7, č. 7, s. 2105–2114 [vid. 9. duben 2022]. ISSN 2213-2201.
- [13] ZONG, Zhiyong, Yu FENG a Alan MCNALLY. Carbapenem and Colistin Resistance in Enterobacter: Determinants and Clones. *Trends in Microbiology*. 2021, roč. 29, č. 6, s. 473–476. ISSN 0966-842X.
- [14] EL-GAMAL, Mohammed I., Imen BRAHIM, Noorhan HISHAM, Rand ALADDIN, Haneen MOHAMMED a Amany BAHAAELDIN. Recent updates of carbapenem antibiotics. *European journal of medicinal chemistry*. 2017, roč. 131, s. 185–195 [vid. 9. duben 2022]. ISSN 1768-3254.
- [15] HUGHES, Luke D., Ahmed ALJAWADI a Anand PILLAI. An overview of carbapenemase producing enterobacteriaceae (CPE) in trauma and orthopaedics. *Journal of orthopaedics*. 2019, roč. 16, č. 6, s. 455–458 [vid. 1. březen 2022]. ISSN 0972-978X.
- [16] *Chemical structures of penicillin, cephalosporin, and carbapenem. The... | Download Scientific Diagram*. [vid. 9. duben 2022]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-penicillin-cephalosporin-and-carbapenem-The-chirality-of-C6-is_fig2_321839107
- [17] Monobactams. *Meyler's Side Effects of Drugs*. 2016, s. 1097–1099.
- [18] BREWER, NELSON S. a WALTER C. HELLINGER. The monobactams. *Mayo Clinic proceedings*. 1991, roč. 66, č. 11, s. 1152–1157 [vid. 5. březen 2022]. ISSN 0025-6196.
- [19] DA CRUZ CAMPOS, Ana Carolina, Natacha COUTO, Nathália LUCAS DA SILVA ANDRADE, Alex W. FRIEDRICH, Ana Cláudia DE PAULA ROSA, Paulo VIEIRA DAMASCO, Monika A. CHLEBOWICZ-FLISS a John W.A. ROSSEN. Virulence and

- resistance properties of *E. coli* isolated from urine samples of hospitalized patients in Rio de Janeiro, Brazil – The role of mobile genetic elements. *International Journal of Medical Microbiology*. 2020, roč. 310, č. 8, s. 151453. ISSN 1438-4221.
- [20] DE ANGELIS, Giulia, Paola Del GIACOMO, Brunella POSTERARO, Maurizio SANGUINETTI a Mario TUMBARELLO. Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of β -Lactam Resistance in Enterobacteriaceae. *International journal of molecular sciences*. 2020, roč. 21, č. 14, s. 1–22 [vid. 27. únor 2022]. ISSN 1422-0067.
- [21] NORDMANN, Patrice, Laurent DORTET a Laurent POIREL. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in molecular medicine*. 2012, roč. 18, č. 5, s. 263–272 [vid. 27. únor 2022]. ISSN 1471-499X.
- [22] BUSH, Karen a Jed F. FISHER. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. *Annual review of microbiology*. 2011, roč. 65, s. 455–478 [vid. 27. únor 2022]. ISSN 1545-3251.
- [23] *Schematic structure of Gram-positive and Gram-negative cell walls... | Download Scientific Diagram*. [vid. 5. březen 2022]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-structure-of-Gram-positive-and-Gram-negative-cell-walls-Gram-positive-cell_fig2_294263540
- [24] KHANNA, Niloufar R. a Valerie GERRIETS. Beta Lactamase Inhibitors. *StatPearls*. 2021 [vid. 5. březen 2022].
- [25] WATKINS, Richard R., Krisztina M. PAPP-WALLACE, Sarah M. DRAWZ a Robert A. BONOMO. Novel β -lactamase inhibitors: A therapeutic hope against the scourge of multidrug resistance. *Frontiers in Microbiology*. 2013, roč. 4, č. DEC, s. 392. ISSN 1664302X.
- [26] HERNANDO-AMADO, Sara, Teresa M. COQUE, Fernando BAQUERO a José L. MARTÍNEZ. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature microbiology*. 2019, roč. 4, č. 9, s. 1432–1442 [vid. 11. duben 2022]. ISSN 2058-5276.
- [27] ASLAM, Bilal, Mohsin KHURSHID, Muhammad Imran ARSHAD, Saima MUZAMMIL, Maria RASOOL, Nafeesa YASMEEN, Taif SHAH, Tamoor Hamid CHAUDHRY, Muhammad Hidayat RASOOL, Aqsa SHAHID, Xia XUESHAN a Zulqarnain BALOCH. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2021, roč. 11 [vid. 11. duben 2022]. ISSN 2235-2988.
- [28] HUEMER, Markus, Srikanth MAIRPADY SHAMBAT, Silvio D BRUGGER a Annelies S ZINKERNAGEL. Antibiotic resistance and persistence-Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO reports*. 2020, roč. 21, č. 12 [vid. 11. duben 2022]. ISSN 1469-3178.
- [29] DEWI, Dewa A.P.Rasmika, Torsten THOMAS, Ana Masara Ahmad MOKHTAR, Noreen Suliani Mat NANYAN, Siti Balqis ZULFIGAR a Nor Hawani SALIKIN. Carbapenem Resistance among Marine Bacteria-An Emerging Threat to the Global Health Sector. *Microorganisms*. 2021, roč. 9, č. 10 [vid. 10. duben 2022]. ISSN 2076-2607.
- [30] *Primary mechanisms of b-lactam resistance in Enterobacteriaceae... | Download Scientific Diagram*. [vid. 7. březen 2022]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Primary-mechanisms-of-b-lactam-resistance-in-Enterobacteriaceae-Hydrophilic-channels_fig2_223962339
- [31] ADRIÁNA LIPTÁKOVÁ a PAVOL JARČUŠKA. REZISTENCIA ANTIBIOTÍK A ICH SPOTREBA. *VIA PRACTICA* 4. 2004 [vid. 11. duben 2022].
- [32] VENTER, Henrietta. Reversing resistance to counter antimicrobial resistance in the World Health Organisation's critical priority of most dangerous pathogens. *Bioscience reports*. 2019, roč. 39, č. 4 [vid. 11. duben 2022]. ISSN 1573-4935.
- [33] WRIGHT, Gerard D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced drug delivery reviews*. 2005, roč. 57, č. 10, s. 1451–1470 [vid. 17. duben 2022]. ISSN 0169-409X.
- [34] BLAIR, Jessica M.A., Mark A. WEBBER, Alison J. BAYLAY, David O. OGBOLU a Laura J.V. PIDDOCK. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews. Microbiology*. 2015, roč. 13, č. 1, s. 42–51 [vid. 11. duben 2022]. ISSN 1740-1534.
- [35] CHRISTAKI, Eirini, Markella MARCOU a Andreas TOFARIDES. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of molecular evolution*. 2020, roč.

- 88, č. 1, s. 26–40 [vid. 7. březen 2022]. ISSN 1432-1432.
- [36] PAPP-WALLACE, Krisztina M., Andrea ENDIMIANI, Magdalena A. TARACILA a Robert A. BONOMO. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011, roč. 55, č. 11, s. 4943–4960 [vid. 8. březen 2022]. ISSN 1098-6596.
- [37] BUSH, Karen a Patricia A. BRADFORD. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2016, roč. 6, č. 8 [vid. 17. duben 2022]. ISSN 2157-1422.
- [38] BUSH, Karen a George A. JACOBY. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010, roč. 54, č. 3, s. 969 [vid. 22. duben 2022]. ISSN 00664804.
- [39] LIVERMORE, David M. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008, roč. 14 Suppl 1, č. SUPPL. 1, s. 3–10 [vid. 15. březen 2022]. ISSN 1198-743X.
- [40] BUSH, Karen. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018, roč. 62, č. 10 [vid. 11. duben 2022]. ISSN 1098-6596.
- [41] PANG, Zheng, Renee RAUDONIS, Bernard R. GLICK, Tong Jun LIN a Zhenyu CHENG. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology advances*. 2019, roč. 37, č. 1, s. 177–192 [vid. 11. duben 2022]. ISSN 1873-1899.
- [42] KYRIAKIDIS, Ioannis, Eleni VASILEIOU, Zoi Dorothea PANA a Athanasios TRAGIANNIDIS. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens (Basel, Switzerland)*. 2021, roč. 10, č. 3 [vid. 17. duben 2022]. ISSN 2076-0817.
- [43] BUSH, Karen. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Current Opinion in Microbiology*. 2010, roč. 13, č. 5, s. 558–564. ISSN 1369-5274.
- [44] BONOMO, Robert A. β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2017, roč. 7, č. 1 [vid. 17. duben 2022]. ISSN 2157-1422.
- [45] TAMMA, Pranita D., Yohei DOI, Robert A. BONOMO, J. Kristie JOHNSON a Patricia J. SIMNER. A Primer on AmpC β -Lactamases: Necessary Knowledge for an Increasingly Multidrug-resistant World. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2019, roč. 69, č. 8, s. 1446–1455 [vid. 11. duben 2022]. ISSN 1537-6591.
- [46] HELENA ŽEMLIČKOVÁ, ANNA SKÁLOVÁ, VLADISLAV JAKUBŮ a KATEŘINA CHUDĚJOVÁ. Výskyt Enterobacteriaceae produkujících karbapenemázy (CPE, Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae) v České republice v letech 2014–2015. *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie*. 2016, s. 235–238 [vid. 24. únor 2022]. ISSN 1804 – 8676.
- [47] HELENA ŽEMLIČKOVÁ, LUCIA MALIŠOVÁ, VLADISLAV JAKUBŮ, PETRA ŠPANĚLOVÁ, ANNA ŠRÁMKOVÁ, Kateřina a Jaroslav Hrabá CHUDĚJOVÁ. Výskyt Enterobacteriales produkujících karbapenemázy (cpe, carbapenemase- -producing Enterobacteriales) v české republice v letech 2014–2019. *ZPRÁVY CENTRA EPIDEMIOLOGIE A MIKROBIOLOGIE (SZÚ, PRAHA) 2020; 29(3)*. 2020, s. 114–118.
- [48] JAROSLAV HRABÁK a HELENA ŽEMLIČKOVÁ. *Výskyt multirezistentních gramnegativních bakterií v českých nemocnicích – upozornění na problém šíření bakterií produkujících transferabilní karbapenemázy*. [vid. 26. únor 2022]. Dostupné z: https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:F3Im3Cl8S9sJ:https://www.sneh.cz/_soubory/_clanky/12.pdf+&cd=4&hl=sk&ct=clnk&gl=cz&client=firefox-b-d
- [49] MISHRA, Sulagna, Uli KLÜMPER, Veiko VOOLAID, Thomas U. BERENDONK a David KNEIS. Simultaneous estimation of parameters governing the vertical and horizontal transfer of antibiotic resistance genes. *Science of The Total Environment*. 2021, roč. 798, s. 149174. ISSN 0048-9697.
- [50] LERMINIAUX, Nicole A. a Andrew D.S. CAMERON. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian journal of microbiology*. 2019, roč. 65, č. 1, s. 34–44 [vid. 8. březen 2022]. ISSN 1480-3275.
- [51] FURUYA, E. Yoko a Franklin D. LOWY. Antimicrobial-resistant bacteria in the community

- setting. *Nature Reviews Microbiology* 2006 4:1. 2006, roč. 4, č. 1, s. 36–45 [vid. 20. březen 2022]. ISSN 1740-1534.
- [52] MALACHOWA, Natalia a Frank R. DELEO. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2010, roč. 67, č. 18, s. 3057–3071 [vid. 8. březen 2022]. ISSN 1420682X.
- [53] GRAF, Fabrice E., Martin PALM, Jonas WARRINGER a Anne FAREWELL. Inhibiting conjugation as a tool in the fight against antibiotic resistance. *Drug development research*. 2019, roč. 80, č. 1, s. 19–23 [vid. 8. březen 2022]. ISSN 1098-2299.
- [54] JOHNSON, Christopher M. a Alan D. GROSSMAN. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annual review of genetics*. 2015, roč. 49, s. 577–601 [vid. 8. březen 2022]. ISSN 1545-2948.
- [55] CALDERÓN-FRANCO, David, Mark C.M. VAN LOOSDRECHT, Thomas ABEEL a David G. WEISSBRODT. Free-floating extracellular DNA: Systematic profiling of mobile genetic elements and antibiotic resistance from wastewater. *Water Research*. 2021, roč. 189, s. 116592. ISSN 0043-1354.
- [56] PEÑIL-CELIS, Arancha a M. Pilar GARCILLÁN-BARCIA. Crosstalk Between Type VI Secretion System and Mobile Genetic Elements. *Frontiers in molecular biosciences*. 2019, roč. 6 [vid. 8. březen 2022]. ISSN 2296-889X.
- [57] LAWS, Mark, Ali SHAABAN a Khondaker Miraz RAHMAN. Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. *FEMS microbiology reviews*. 2019, roč. 43, č. 5, s. 490–516 [vid. 15. březen 2022]. ISSN 1574-6976.
- [58] SHAO, Sicheng, Yongyou HU, Jianhua CHENG a Yuancai CHEN. Research progress on distribution, migration, transformation of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) in aquatic environment. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1471038>. 2018, roč. 38, č. 8, s. 1195–1208 [vid. 8. březen 2022]. ISSN 15497801.
- [59] BLOKESCH, Melanie. In and out—contribution of natural transformation to the shuffling of large genomic regions. *Current Opinion in Microbiology*. 2017, roč. 38, s. 22–29. ISSN 1369-5274.
- [60] JOHNSTON, Calum, Bernard MARTIN, Gwennaele FICHANT, Patrice POLARD a Jean Pierre CLAVERYS. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology* 2014 12:3. 2014, roč. 12, č. 3, s. 181–196 [vid. 20. březen 2022]. ISSN 1740-1534.
- [61] FROST, Laura S., Raphael LEPLAE, Anne O. SUMMERS a Ariane TOUSSAINT. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature reviews. Microbiology*. 2005, roč. 3, č. 9, s. 722–732 [vid. 11. duben 2022]. ISSN 1740-1526.
- [62] VAN DIJK, Bram. Can mobile genetic elements rescue genes from extinction? *Current genetics*. 2020, roč. 66, č. 6, s. 1069–1071 [vid. 11. duben 2022]. ISSN 1432-0983.
- [63] FROST, Laura S., Raphael LEPLAE, Anne O. SUMMERS a Ariane TOUSSAINT. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology* 2005 3:9. 2005, roč. 3, č. 9, s. 722–732 [vid. 20. březen 2022]. ISSN 1740-1534.
- [64] ROBERTS, Adam P., Michael CHANDLER, Patrice COURVALIN, Gérard GUÉDON, Peter MULLANY, Tony PEMBROKE, Julian I. ROOD, C. JEFFERY SMITH, Anne O. SUMMERS, Masataka TSUDA a Douglas E. BERG. Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid*. 2008, roč. 60, č. 3, s. 167–173. ISSN 0147-619X.
- [65] PARK, Chi Hye, Ari ROBICSEK, George A. JACOBY, Daniel SAHM a David C. HOOPER. Prevalence in the United States of *aac(6′)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006, roč. 50, č. 11, s. 3953–3955 [vid. 11. duben 2022]. ISSN 0066-4804.
- [66] RAZAVI, Mohammad, Erik KRISTIANSSON, Carl-Fredrik FLACH a D. G. Joakim LARSSON. The Association between Insertion Sequences and Antibiotic Resistance Genes. *mSphere*. 2020, roč. 5, č. 5 [vid. 20. březen 2022]. ISSN 23795042.
- [67] BENNETT, Peter M. Genome Plasticity. *Genomics, Proteomics, and Clinical Bacteriology*. 2004, s. 71–113 [vid. 20. březen 2022].
- [68] FLUIT, A. C. a F. J. SCHMITZ. Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004, roč. 10, č. 4, s. 272–288. ISSN 1198-743X.

- [69] PARTRIDGE, Sally R., Stephen M. KWONG, Neville FIRTH a Slade O. JENSEN. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical microbiology reviews*. 2018, roč. 31, č. 4 [vid. 11. duben 2022]. ISSN 1098-6618.
- [70] ÁLVAREZ-MARÍN, Rocío, José Antonio LEPE, Oriol GASCH-BLASI, José Manuel RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, Jorge CALVO-MONTES, Rosario LARA-CONTRERAS, Cecilia MARTÍN-GANDUL, Fe TUBAU-QUINTANO, María Eliecer CANO-GARCÍA, Fernando RODRÍGUEZ-LÓPEZ, Jesús RODRÍGUEZ-BAÑO, Miquel PUJOL-ROJO, Julián TORRE-CISNEROS, Luis MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, Álvaro PASCUAL-HERNÁNDEZ a Manuel E. JIMÉNEZ-MEJÍAS. Clinical characteristics and outcome of bacteraemia caused by Enterobacter cloacae and Klebsiella aerogenes: more similarities than differences. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2021, roč. 25, s. 351–358. ISSN 2213-7165.
- [71] SKINNADER, Oisín, Scott NGUYEN, Helina MARSHALL, Caroline MEHARG a Séamus FANNING. Enterobacter Species. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2022, s. 469–481.
- [72] WU, Wenjing, Yu FENG a Zhiyong ZONG. Precise Species Identification for Enterobacter: a Genome Sequence-Based Study with Reporting of Two Novel Species, Enterobacter quasiroggenkampii sp. nov. and Enterobacter quasimori sp. nov. *mSystems*. 2020, roč. 5, č. 4 [vid. 10. duben 2022]. ISSN 2379-5077.
- [73] CHEN, Jingjing, Sufei TIAN, Hua NIAN, Ruixuan WANG, Fushun LI, Ning JIANG a Yunzhuo CHU. Carbapenem-resistant Enterobacter cloacae complex in a tertiary Hospital in Northeast China, 2010-2019. *BMC infectious diseases*. 2021, roč. 21, č. 1 [vid. 17. duben 2022]. ISSN 1471-2334.
- [74] DAVIN-REGLI, Anne, Jean Philippe LAVIGNE a Jean Marie PAGÈS. Enterobacter spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 2019, roč. 32, č. 4 [vid. 24. únor 2022]. ISSN 10986618.
- [75] RÄISÄNEN, Kati, Outi LYYTIKÄINEN, Jari KAURANEN, Eveliina TARKKA, Benita FORSBLOM-HELANDER, Juha O. GRÖNROOS, Risto VUENTO, Dinah ARIFULLA, Emmi SARVIKIVI, Saija TOURA a Jari JALAVA. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacterales in Finland, 2012-2018. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2020, roč. 39, č. 9, s. 1651–1656 [vid. 17. duben 2022]. ISSN 1435-4373.
- [76] BOLOURCHI, Negin, Christian G. GISKE, Shoeib NEMATZADEH, Amir MIRZAIE, Soha Seyyedi ABHARI, Hamid SOLGI a Farzad BADMASTI. Comparative resistome and virulome analysis of clinical NDM-1-producing carbapenem-resistant Enterobacter cloacae complex. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2022, roč. 28, s. 254–263 [vid. 11. duben 2022]. ISSN 2213-7173.
- [77] ANNAVAJHALA, Medini K., Angela GOMEZ-SIMMONDS a Anne Catrin UHLEMANN. Multidrug-Resistant Enterobacter cloacae Complex Emerging as a Global, Diversifying Threat. *Frontiers in microbiology*. 2019, roč. 10, č. JAN [vid. 10. duben 2022]. ISSN 1664-302X.
- [78] MACKULL'AK, Tomáš, Klára CVERENKÁROVÁ, Andrea Vojs STAŇOVÁ, Miroslav FEHÉR, Michal TAMÁŠ, Andrea Bútor ŠKULCOVÁ, Miroslav GÁL, Monika NAUMOWICZ, Viera ŠPALKOVÁ a Lucia BÍROŠOVÁ. Hospital Wastewater-Source of Specific Micropollutants, Antibiotic-Resistant Microorganisms, Viruses, and Their Elimination. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 2021, roč. 10, č. 9 [vid. 12. duben 2022]. ISSN 2079-6382.
- [79] Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. nedatováno.
- [80] KUTILOVA, Iva, Matej MEDVECKY, Pimplapas LEEKITCHAROENPHON, Patrick MUNK, Martina MASARIKOVA, Lenka DAVIDOVA-GERZOVA, Ivana JAMBOROVA, Valeria BORTOLAIA, Sünje J. PAMP a Monika DOLEJSKA. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and antimicrobial resistance in municipal and hospital wastewaters in Czech Republic: Culture-based and metagenomic approaches. *Environmental Research*. 2021, roč. 193, s. 110487. ISSN 0013-9351.
- [81] ZHUANG, Mei, Yigal ACHMON, Yuping CAO, Xiaomin LIANG, Liang CHEN, Hui WANG, Bupe A. SIAME a Ka Yin LEUNG. Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*. 2021, roč. 285 [vid. 15. duben 2022]. ISSN 1873-6424.
- [82] RAVASI, Damiana, Roger KÖNIG, Pamela PRINCIPI, Giuseppe PERALE a Antonella

- DEMARTA. Effect of Powdered Activated Carbon as Advanced Step in Wastewater Treatments on Antibiotic Resistant Microorganisms. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2019, roč. 20, č. 1, s. 63 [vid. 19. duben 2022]. ISSN 13892010.
- [83] MANAIA, Célia M., Jaqueline ROCHA, Nazareno SCACCIA, Roberto MARANO, Elena RADU, Francesco BIANCULLO, Francisco CERQUEIRA, Gianuário FORTUNATO, Iakovos C. IAKOVIDES, Ian ZAMMIT, Ioannis KAMPOURIS, Ivone VAZ-MOREIRA a Olga C. NUNES. Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. *Environment international*. 2018, roč. 115, s. 312–324 [vid. 10. březen 2022]. ISSN 1873-6750.
- [84] RIZZO, L., C. MANAIA, C. MERLIN, T. SCHWARTZ, C. DAGOT, M. C. PLOY, I. MICHAEL a D. FATTA-KASSINOS. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *The Science of the total environment*. 2013, roč. 447, s. 345–360 [vid. 15. březen 2022]. ISSN 1879-1026.
- [85] GALLEGO-SCHMID, Alejandro a Raphael Ricardo Zepon TARPANI. Life cycle assessment of wastewater treatment in developing countries: A review. *Water research*. 2019, roč. 153, s. 63–79 [vid. 13. březen 2022]. ISSN 1879-2448.
- [86] *The basic processes of waste water treatment*. [vid. 13. březen 2022]. Dostupné z: <https://www.aerzen.com/en-sk/applications/water-and-waste-water-treatment/wastewater-treatment-advisor/processes-of-waste-water-treatment.html>
- [87] ARUMUGAM, Nithiya, Shreeshivadasan CHELLIAPAN, Hesam KAMYAB, Sathiabama THIRUGNANA, Norazli OTHMAN a Noor Shawal NASRI. Treatment of Wastewater Using Seaweed: A Review. *International journal of environmental research and public health*. 2018, roč. 15, č. 12 [vid. 15. březen 2022]. ISSN 1660-4601.
- [88] MOUSSAVI, Sussan, Matthew THOMPSON, Shaobin LI a Bruce DVORAK. Assessment of small mechanical wastewater treatment plants: Relative life cycle environmental impacts of construction and operations. *Journal of environmental management*. 2021, roč. 292 [vid. 15. březen 2022]. ISSN 1095-8630.
- [89] SAXENA, Gaurav, Ram CHANDRA a Ram Naresh BHARAGAVA. Environmental Pollution, Toxicity Profile and Treatment Approaches for Tannery Wastewater and Its Chemical Pollutants. *Reviews of environmental contamination and toxicology*. 2017, roč. 240 [vid. 15. březen 2022]. ISSN 0179-5953.
- [90] *Print page*. [vid. 13. březen 2022]. Dostupné z: https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=3878&typ=html
- [91] MIKROLATEST® MIC - Panels | MIKROLATEST® MIC | Erba Lachema s.r.o. [vid. 12. duben 2022]. Dostupné z: <https://www.erbalachema.com/en/products-and-solutions/microbiology/mikrolatest-mic/mikrolatest-mic-panels/>
- [92] GAPLOVSKÝ MARTIN a GAPLOVSKÁ-KYSELÁ KATARÍNA. PRINCÍPY NOVÝCH METÓD SEKVENOVANIA DNA. *Chemické Listy 106*. 2012, s. 809–817 [vid. 19. březen 2022].
- [93] Sekvenovanie DNA. *Biopedia*. [vid. 19. březen 2022]. Dostupné z: <https://biopedia.sk/molekularna-biologia/sekvenovanie-dna>
- [94] HRABÁK, Jaroslav, Radka WALKOVÁ, Vendula ŠTUDENTOVÁ, Eva CHUDÁČKOVÁ a Tamara BERGEROVÁ. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011, roč. 49, č. 9, s. 3222–3227 [vid. 17. březen 2022]. ISSN 00951137.
- [95] SINGHAL, Neelja, Manish KUMAR, Pawan K. KANAUIA a Jugsharan S. VIRDI. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*. 2015, roč. 6, č. AUG, s. 791. ISSN 1664302X.
- [96] *EUCAST: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics*. [vid. 12. duben 2022]. Dostupné z: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
- [97] ZAATOUT, Nawel, Samia BOURAS a Nouria SLIMANI. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in wastewater: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Water and Health*. 2021, roč. 19, č. 5, s. 705–723. ISSN 19967829.
- [98] WILSON, Hayley a M. Estée TÖRÖK. Extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Microbial genomics*. 2018, roč. 4, č. 7 [vid. 29. duben 2022]. ISSN 2057-5858.

- [99] DAOUD, Ziad, Jina FARAH, Elie Salem SOKHN, Khalil EL KFOURY, Elias DAHDOUH, Khalil MASRI, Claude AFIF, Roula M. ABDEL-MASSIH a Ghassan M. MATAR. Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae in Lebanese Hospital Wastewater: Implication in the One Health Concept. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*. 2018, roč. 24, č. 2, s. 166–174 [vid. 29. duben 2022]. ISSN 1931-8448.
- [100] SIB, E., A. M. VOIGT, G. WILBRING, C. SCHREIBER, H. A. FAERBER, D. SKUTLAREK, M. PARCINA, R. MAHN, D. WOLF, P. BROSSART, F. GEISER, S. ENGELHART, M. EXNER, G. BIERBAUM a R. M. SCHMITHAUSEN. Antibiotic resistant bacteria and resistance genes in biofilms in clinical wastewater networks. *International journal of hygiene and environmental health*. 2019, roč. 222, č. 4, s. 655–662 [vid. 30. duben 2022]. ISSN 1618-131X.
- [101] AHMAD, Mohammad a Asad U. KHAN. Global economic impact of antibiotic resistance: A review. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2019, roč. 19, s. 313–316 [vid. 15. duben 2022]. ISSN 2213-7173.
- [102] LEVY, Stuart B. a Marshall BONNIE. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 2004 10:12. 2004, roč. 10, č. 12, s. S122–S129 [vid. 15. duben 2022]. ISSN 1546-170X.
- [103] CARATTOLI, Alessandra. Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009, roč. 53, č. 6, s. 2227–2238 [vid. 14. duben 2022]. ISSN 00664804.
- [104] COX, Georgina a Gerard D. WRIGHT. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2013, roč. 303, č. 6–7, s. 287–292 [vid. 15. duben 2022]. ISSN 1618-0607.
- [105] FAST, Sara Ann, Veera Gnaneswar GUDE, Dennis D. TRUAX, James MARTIN a Benjamin S. MAGBANUA. A Critical Evaluation of Advanced Oxidation Processes for Emerging Contaminants Removal. *Environmental Processes* 2017 4:1. 2017, roč. 4, č. 1, s. 283–302 [vid. 19. duben 2022]. ISSN 2198-7505.
- [106] KARESH, William B. a Robert A. COOK. One world--one health. *Clinical medicine (London, England)*. 2009, roč. 9, č. 3, s. 259–260 [vid. 19. duben 2022]. ISSN 1470-2118.
- [107] LEWIS, James S., Monica HERRERA, Brian WICKES, Jan E. PATTERSON a James H. JORGENSEN. First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007, roč. 51, č. 11, s. 4015–4021 [vid. 30. duben 2022]. ISSN 0066-4804.
- [108] POIREL, Laurent, Timothy R. WALSH, Vincent CUVILLIER a Patrice NORDMANN. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2011, roč. 70, č. 1, s. 119–123 [vid. 30. duben 2022]. ISSN 1879-0070.
- [109] KUTILOVA, Iva, Adam VALCEK, Costas C. PAPAGIANNITSIS, Darina CEJKOVA, Martina MASARIKOVA, Veronika PASKOVA, Lenka DAVIDOVA-GERZOVA, Petra VIDENSKA, Jaroslav HRABAK, Ivan LITERAK a Monika DOLEJSKA. Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria from American Crows in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2020, roč. 65, č. 1 [vid. 30. duben 2022]. ISSN 1098-6596.
- [110] MLYNARCIK, Patrik, Monika DOLEJSKA, Iva VAGNEROVA, Iva KUTILOVÁ a Milan KOLAR. Detection of clinically important β -lactamases by using PCR. *FEMS microbiology letters*. 2021, roč. 368, č. 11 [vid. 30. duben 2022]. ISSN 1574-6968.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

AMR	antimikrobiálna rezistencia
ARB	antimikrobiálne rezistentné baktérie
ARG	antibioticky rezistentné gény
CHDL	karbapeném hydrolyzujúce β -laktamázy triedy D
ČOV	čistiaren odpadových vôd
ECC	komplex <i>Enterobacter cloacae</i> (z angl. <i>Enterobacter cloacae</i> complex)
ESBL	β -laktamázy s rozšíreným spektrom
HGT	horizontálny prenos génov (z angl. horizontal gene transfer)
IS	inzerčné sekvencie
MBL	metalo- β -laktamázy
MGE	mobilné genetické elementy
MRSA	metecilín-rezistentný <i>Staphylococcus aureus</i>
OMP	vonkajší membránový proteín (z angl. outer membrane protein)
PBP	proteíny viažuce penicilín (z angl. penicillin-binding proteins)
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia (z angl. World Health Organization)

9 PRÍLOHY

9.1 Príprava roztokov

9.1.1 Príprava kultivačných a kryoprotektívnych médií

Použité kultivačné médiá boli komerčne dostupné a ich príprava prebiehala podľa návodu dodaného výrobcom. Bolo navážené potrebné množstvo kultivačného média do sterilnej sklenenej fľaši o objeme 500 ml. Následne bolo do nej naliatych 500 ml destilovanej vody. Takto pripravené kultivačné médium bolo sterilované v autokláve po dobu 20 minút pri 121 °C. Po schladení bolo médium rozliate do petriho miesiek v laminárnom boxe. Súbor všetkých použitých médií je uvedený v kapitole 4.1.4, vrátane výrobcu a pôvodu.

Kryoprotektívne médium slúži k dlhodobému uchovaniu bakteriálnych izolátov pri nízkych teplotách. Pre prípravu bolo zmiešaných 0,75 g bakteriologického peptónu a 70 ml destilovanej vody. Následne bola zmes premiešaná, bolo pridaných 30 ml glycerolu (85%) do finálneho objemu 100 ml. Potom bolo médium sterilizované v autokláve pri 121 °C po dobu 20 minút. Po schladnutí bolo médium rozpipetované po 1 ml do kryoskúmaviek, ktoré boli potom znova sterilizované v autokláve pri 121 °C po dobu 20 minút.

9.1.2 Príprava antimikrobiálnych látok

Antimikrobiálne látky boli použité vo forme roztoku s požadovanou koncentráciou alebo vo forme doštičky u testu MIKROLATEST alebo diskov pre fenotypové testy Mastdisc™.

Zásobné roztoky antibiotík boli pripravené zmiešaním navážky komerčne dodanej antimikrobiálnej látky a sterilnej destilovanej vody. Následne bola zmes homogenizovaná pomocou vortexu a prefiltrovaná cez membránový filter s veľkosťou pórov 0,22 µl. Potom bol zásobný roztok antimikrobiálnej látky rozplnený do sterilných mikroskúmaviek Eppendorf a uchovaný pri -20 °C. Súbor všetkých použitých antimikrobiálnych látok, vrátane antibiotík MIKROLATEST a diskov Mastdisc™ je uvedený v kapitole 4.1.3 vrátane výrobcu a pôvodu.

9.1.3 Príprava zásobných roztokov pre PFGE

1 MT Tris-HCl (pH=8,0)

Navážka 121,14 g Trisu bola rozpustená v 600 ml destilovanej vody. Pomocou koncentrovanej HCl bolo upravené pH roztoku. Následne bol roztok doplnený destilovanou vodou do finálneho objemu 1 000 ml a bol sterilizovaný v autokláve pri 121 °C po dobu 20 minút.

0,25 M EDTA (pH=8)

Navážka 93,06 g EDTA bola prenesená do cca 800 ml destilovanej vody. Po pridaní pevného NaOH (20 g) bolo možné navážku rozpustiť. Potom bolo upravené pH roztoku pomocou koncentrovanej HCl. Roztok bol doplnený destilovanou vodou do finálneho objemu 1 000 ml a bol sterilizovaný v autokláve pri 121 °C po dobu 20 minút.

Proteináza K (20mg/ml)

Do flakonky bolo odvážených 100 mg proteinázy K a bolo pridaných 5 ml sterilnej destilovanej vody. Roztok bol opatrne homogenizovaný, rozplnený po 510 µl a uskladnený pri -20 °C.

10x TBE pufoer

Navážka 60,5 g Trisu, 30,85 g kyseliny boritej a 4,16 g EDTA bola rozpustená v 800 ml destilovanej vody. Následne bol roztok doplnený do finálneho objemu 1 000 ml a bol sterilizovaný v autokláve pri 121 °C po dobu 20 minút.

Vodný kúpeľ s ethidium bromidom (10 mg/l)

Do tmavej fľaše bolo odmeraných 100 µl zásobného ethidium bromidu, ktorý bol doplnený destilovanou vodou do finálneho objemu 1 000 ml a bol uskladnený v chladničke pri 4 °C.

9.1.4 Príprava pracovných roztokov pre PFGE

TE pufo (10 mM Tris, pH=8,0; 1 mM EDTA, pH=8,0)

TE pufo bol pripravený zmiešaním 10 ml 1M Trisu (pH=8,0) s 4 ml 0,25 M EDTA (pH=8) a následne bol doplnený do finálneho objemu 1 000 ml. Po príprave bol roztok sterilizovaný v autokláve pri 121 °C po dobu 20 minút.

CSB – Cell Suspension Buffer (100 mM Tris, pH = 8,0; 100 mM EDTA, pH = 8,0)

CSB roztok bol pripravený zmiešaním 50 ml 1 M Trisu (pH=8,0) s 200 ml 0,25 M EDTA (pH=8,0) a následne bol doplnený do finálneho objemu 1 000 ml. Po príprave bol roztok sterilizovaný v autokláve pri 121 °C po dobu 20 minút.

CLB – Cell Lysis Buffer (50 mM Tris, pH = 8,0; 50 mM EDTA, pH = 8,0; 1% N-lauroylsarkosin sodný)

CLB roztok bol pripravený zmiešaním 5 g N-lauroylsarkosínu sodného a 25 ml 1M Trisu (pH=8,0) a 100 ml 0,25 M EDTA (pH=8,0). Následne bol roztok doplnený do finálneho objemu 500 ml a bol sterilizovaný v autokláve pri 121 °C po dobu 20 minút.

1,6% agaróza na prípravu bločkov

Navážka 0,32 g SeaKem gold agarózy bola rozpustená v 20 ml sterilného TE pufru. Agaróza bola varená v mikrovlnnej trúbe a potom temperovaná na 55 °C.

9.2 Zoznam použitých primerov

Tabuľka 14 Zoznam použitých primerov

Gén	Primer	Sekvencia (5' → 3')	Teplota topenia [°C]	Referencie
<i>bla</i> _{CTX-M}	PANCTX-M-F	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	61	<i>(Lewis et al., 2007)</i> ^[107]
	PANCTX-M-R	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	62	
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	59	<i>(Poirel et al., 2011)</i> ^[108]
	IMP-R	GGTTTAAAYAAAACAACCACC	53	
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-F	GATGGTGTGGTGGTCCGATA	55	<i>(Mlynarčík et al., 2021)</i> ^[110]
	VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG	57	
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-Fm	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	58	<i>(Poirel et al., 2011)</i> ^[108]
	KPC-Rm	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	58	
<i>bla</i> _{NDM}	NDM-type F	GGGGATTGCGACTTATGC	56	<i>(Mlynarčík et al., 2021)</i> ^[110]
	NDM-type R	AGATTGCCGAGCGACTTG	56	
<i>bla</i> _{IMI}	IMI-type F	CGCGGAGATTGARAAGCAAA	56	<i>(Mlynarčík et al., 2021)</i> ^[110]
	IMI-type R	CGCAGCACCRGGATAGAARA	58	
<i>bla</i> _{GES}	GES_start	ATGCGCTTCATTCACGC	52	<i>(Kutilova et al., 2020)</i> ^[109]
	GES_end	CTATTTGTCCGTGCTCAGGA	58	
<i>bla</i> _{OXA-48}	OXA-48-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	58	<i>(Poirel et al., 2011)</i> ^[108]
	OXA-48-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG	58	

9.3 Parametre PCR programov

Tabuľka 15 Parametre PCR programov

Krok	Gén							
	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{IMI}	<i>bla</i> _{GES}	<i>bla</i> _{OXA-48}
	Teplota [°C]/čas							
Úvodná denaturácia DNA	94/5 min	94/5 min	94/5 min	94/5 min	94/5 min	94/3 min	94/5 min	94/5 min
Denaturácia DNA	94/45 s	94/30 s	94/30 s	94/30 s	94/45 s	94/50 s	94/45 s	94/30 s
Pripojenie primerov	58/45 s	52/40 s	52/40 s	52/40 s	53/45 s	53/50 s	55/45 s	52/40 s
Amplifikácia DNA	72/ 1 min	72/50 s	72/50 s	72/50 s	72/ 1 min	72/1 min	72/2 min	72/50 s
Záverečná amplifikácia DNA	72/10 min	72/5min	75/5 min	72/5 min	72/10 min	72/10 min	72/10 min	72/5 min
Chladienie	10/∞	10/∞	10/∞	10/∞	10/∞	10/∞	10/∞	10/∞
Počet cyklov (opakovanie kroku 2.-4.)	30	36	36	36	30	30	30	36

