

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Molekulárně genetická charakterizace vankomycin-  
rezistentních enterokoků**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Karel Bubeníček, DiS.**

**Vedoucí práce: Prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.**

**Odborný konzultant: Prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.,**

**Mgr. Veronika Oravcová**

© 2016 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Molekulárně genetická charakterizace vankomycin-rezistentních enterokoků" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8. 4. 2016

---

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval panu Prof. Ing. Vojtěchu Radovi, CSc za cenné rady a připomínky, které mi v průběhu psaní práce poskytl. Obrovský dík patří paní Mgr. Veronice Oravcové z FVHE VFU Brno, za odborné rady při metodice molekulárních metod, konzultaci v odborných tématech a velmi přívětivý přístup.

V neposlední řadě bych rád poděkoval panu Prof. MVDr. Ivanu Literákovi, CSc., z FVHE VFU Brno, za poskytnutí příležitosti a prostoru k vypracování této diplomové práce.

# Molekulárně genetická charakterizace vankomycin-rezistentních enterokoků

## Souhrn

**Cíle a hypotéza:** Tato diplomová práce se zabývá studií plazmidů vankomycin-rezistentních enterokoků izolovaných z trusu amerických vran v letech 2012 – 2013.

Hypotézou je, že v různých prostředích existuje jeden či více typů epidemiologicky významných vanA gen-nesoucích plazmidů, které jsou schopné se horizontálně šířit.

**Metody:** Na základě metody PFGE byl detekován počet a velikost plazmidů ve vybraných izolátech vankomycin-rezistentních *E. faecium*. Pomocí metody PCR byly izoláty podrobeny detekci genů replikáz, relaxáz a toxin-antitoxin systému pro typizaci plazmidů z jednotlivých plazmidových rodin. Pomocí 19 primerů byly charakterizovány typy *Tn1546*.

**Výsledky:** Z celkového počtu 12 testovaných, vankomycin-rezistentních izolátů *E. faecium*, byl pomocí metody PFGE prokázán počet a velikost plazmidů: 2 izoláty obsahovaly 2 plazmidy (17 %), 3 izoláty obsahovaly 3 plazmidy (25 %), 5 izolátů obsahovalo 4 plazmidy (42 %) a 2 izoláty obsahovalo 5 plazmidů (17 %).

Všechny izoláty (n=12) byly pak podrobeny detekci genů replikáz, relaxáz a toxin-antitoxin systému pro typizaci plazmidů z jednotlivých plazmidových rodin.

RepA\_N rodina plazmidů:

- geny charakterizující plazmidy příbuzné pRUM: *rep17* u 11 izolátů (92%), u 5 izolátů (42%) byl detekován gen *Axe-Txe*
- geny charakterizující plazmidy příbuzné pLG1: *rep20* u 7 izolátů (58%)
- geny charakterizující plazmidy příbuzné pAD1: u 1 izolátu (8%) byl detekován gen *rel<sub>pAD1</sub>*

Inc18 rodina plazmidů:

- geny charakterizující plazmidy příbuzné pIL501: gen *rep1* zachycen v jednom případě (8%)
- geny charakterizující plazmidy příbuzné pRES25: Gen *rep2* u dvou izolátů (17%)

- geny charakterizující plazmidy příbuzné pEF1: *rel<sub>pEF1</sub>* detekován u 11 izolátů (92%)

pHT $\beta$  rodina plazmidů:

- geny charakterizující plazmidy příbuzné pHT $\beta$ : u 4 izolátů byl detekován gen *Rep22* (33%) a u 2 izolátů (17 %) byl detekován gen *rel<sub>pHT $\beta$</sub>*

RCR rodina plazmidů:

- geny charakterizující plazmidy příbuzné pRI: u 8 izolátů (67%) byl pozitivní průkaz genu *Rep14* a u 4 izolátů byl detekován gen *rel<sub>pRI</sub>*.

Malé theta-replikující se plazmidy:

- geny charakterizující plazmidy příbuzné pEF418: gen *rep18a* u dvou izolátů (17 %)
- geny charakterizující plazmidy příbuzné pB82: u 1 izolátu (8%) byl detekován gen *rep18b*
- geny charakterizující plazmidy příbuzné pCIZ2: u 9 testovaných izolátů (75%) byl prokázán gen *rel<sub>pCIZ2</sub>*

Typy transpozonu Tn1546

Pomocí metody PCR byly charakterizovány typy Tn1546. U 4 izolátů (n=12; 33 %) byl charakterizován Tn1546 jako typ F3. U jednoho izolátu (8 %) byl Tn1546 charakterizován jako typ F5, u jednoho izolátu (8 %) jako typ PP-16. 6 izolátů mělo netypovatelné Tn1546. S největší pravděpodobností se jedná o nové, dosud nepopsané typy.

**Závěr:** Jedná se o první studii plazmidů z vankomycin-rezistentních izolátů *E. faecium* izolovaných z trusu amerických vran. Tyto výsledky zdůrazňují nejen vysoké zastoupení plazmidů v jednotlivých izolátech, ale také vysoké zastoupení genů s horizontálním přenosem.

**Klíčová slova:** *Enterococcus faecium*, vankomycin-rezistentní, plazmid, gen, Tn1546

# Molecular genetic characterization of vancomycin-resistant enterococci

## Summary

**Objectives and hypothesis:** This thesis concerns the study of plasmids of vancomycin-resistant enterococci isolated from feces of American crows in the years 2012 - 2013 period. The hypothesis is that, in various environments, there is one or more types of epidemiologically significant *vanA* gene-carrying plasmids that are capable of horizontally spread.

**Methods:** Based on PFGE method the number and size of plasmids were detected in selected isolates of vancomycin-resistant *E. faecium*. Using PCR method the isolates were subjected to detection of genes of replicases, relaxases and toxin-antitoxin system of plasmid-bound resistance genes. Using 19 primers were characterized types of Tn1546.

**Results:** Of the 12 tested vancomycin-resistant isolates of *E. faecium* the following number and size of plasmids was proven using PFGE method: 2 isolates contained two plasmids (17%), 3 isolates contained three plasmids (25 %), 5 isolates contained four plasmids (42 %) and 2 isolates contained five plasmids (17 %).

All isolates (n = 12) were then subjected to the detection of genes of replicases, relaxases and toxin-antitoxin system for typing of plasmids from each plasmid families.

RepA\_N family of plasmids:

- genes characterizing plasmids related to pRUM: *rep17* in 11 isolates (92 %),
- gene Axe-Txe was detected in 5 isolates (42 %)
- genes characterizing plasmids related to pLG1: *rep20* in 7 isolates (58 %)
- genes characterizing plasmids related to pAD1: *rel<sub>pAD1</sub>* gene was detected in one isolate (8 %)

Inc18 family of plasmids:

- genes characterizing plasmids related to pIL501: *rep1* gene detected in one case (8 %)

- genes characterizing plasmids related to pRES25: *rep2* gene in 2 isolates (17 %)
- genes characterizing plasmids related to pEF1: *rel<sub>pEF1</sub>* detected in 11 isolates (92 %)

pHT $\beta$  family of plasmids:

- genes characterizing plasmids related to pHT $\beta$ : *rep22* gene was detected in 4 isolates (33%) and in 2 isolates gene *rel<sub>pHT $\beta$</sub>*  was detected (17%)

RCR family of plasmids:

- genes characterizing plasmids related to pRI: positive detection of Rep14 gene in 8 isolates (67%) and in 4 isolates *rel<sub>pRI</sub>* gene was detected

Small theta-replicating plasmids:

- genes characterizing plasmids related to pEF418 plasmids: *rep18a* gene in 2 isolates (17%)
- genes characterizing plasmids related to pB82: *rep18b* gene was detected in one isolate (8%)
- genes characterizing plasmids related to pCIZ2: *rel<sub>pCIZ2</sub>* gene was detected in 9 isolates tested (75%)

Types of transposon Tn1546

Using the PCR method types of Tn1546 were characterized. In 4 isolates (n = 12; 33 %)

Tn1546 was characterized as a F3 type. In one isolate (8 %) Tn1546 was characterized as a type F5, in one isolate (8 %) as a type PP-16. In 6 isolates Tn1546 was untypeable. Most likely these are new, yet unknown types.

**Conclusion:** This is the first study of plasmids of vancomycin-resistant isolates *E. faecium* isolated from feces of American crows. These results emphasize not only a high proportion of plasmids in individual isolates, but also a high proportion of genes with horizontal transfer.

**Keywords:** *Enterococcus faecium*, vancomycin-resistant, plasmid, gene, Tn1546

# Obsah

Souhrn.....	7
1 Úvod.....	10
2 Vědecká hypotéza a cíl práce.....	11
3 Přehled literatury.....	12
3.1 Enterococcus spp.....	12
3.2 Antimikrobiální látky.....	14
3.2.1 Mechanismus účinku ATB.....	15
3.2.1.1 Zásah do syntézy buněčné stěny.....	15
3.2.1.2 Inhibice funkce buněčné membrány.....	16
3.2.1.3 Inhibice syntézy proteinů.....	17
3.2.1.4 Inhibice syntézy kyseliny listové.....	18
3.2.1.5 Inhibice syntézy nukleových kyselin.....	18
3.2.2 Glykopeptidy.....	19
3.2.2.1 Chemická struktura glykopeptidů.....	20
3.2.2.2 Mechanismus účinku glykopeptidů.....	21
3.3 Rezistence.....	23
3.3.1 Rezistence enterokoků k antibiotikům.....	24
3.3.1.1 Získaná rezistence k $\beta$ -laktamovým antibiotikům.....	25
3.3.1.2 Získaná rezistence k aminoglykosidům.....	26
3.3.1.3 Získané rezistence ke glykopeptidům.....	26
3.4 Mobilní genetické elementy.....	29
3.4.1 Transpozony.....	29
3.4.1.1 Kompozitní transpozony.....	30
3.4.1.2 Rodina transpozonů Tn <sup>3</sup> .....	30
3.4.1.3 Rodina konjugativních transpozonů.....	31
3.4.2 Inzerční sekvence (IS).....	32
3.4.3 Integrony a genové kazety.....	32
3.4.4 Mobilní genetické ostrovy/ostrůvky.....	33
3.4.5 Plazmidy.....	34
3.4.5.1 RC replikace.....	36
3.4.5.2 Theta replikace.....	37
4 Materiál.....	48
4.1 Použité mikroorganismy.....	48



4.2	Transportní a kultivační média.....	48
4.3	Chemikálie .....	49
4.4	Přístroje a zařízení.....	51
4.5	Ostatní materiál .....	52
5	Metodika .....	52
5.1	PFGE pracovní postup .....	53
5.2	Detekce genů rezistence metodou PCR .....	55
6	Výsledky .....	66
6.1	Detekce počtu plazmidů u izolátů <i>E. faecium</i> pomocí PFGE .....	66
6.2	Detekce genů, charakterizujících plazmidy rodiny Inc18.....	68
6.3	Detekce genů, charakterizujících plazmidy rodiny pHT $\beta$ .....	69
6.4	Detekce genů, charakterizujících plazmidy rodiny RCR.....	70
6.5	Detekce genů, charakterizujících Malé theta-replikující se plazmidy .....	71
6.6	Charakterizace transpozonu dle jednotlivých primerů.....	72
7	Diskuze.....	73
8	Závěr .....	78
9	Seznam zkratk .....	79
10	Seznam literatury .....	81

# 1 Úvod

Objev antibiotik a jejich užití při léčbě bakteriálních infekcí je jedním z hlavních medicínských úspěchů 20. století. Nicméně, v průběhu posledních 60 let, došlo k rychle gradujícímu vývoji rezistence postihující prakticky všechny skupiny antibiotik. V současné praxi to znamená výskyt velkého množství zejména nemocničních původců oportunních infekcí s odolností vůči široké škále antimikrobních přípravků a neustále se snižující počet účinných antibiotik (Davies, 2007; Davies a Davies, 2010).

Selhání antibiotické léčby, rostoucí náklady na hospitalizaci a především zvyšující se morbidita a mortalita pacientů postižených nozokomiálními infekcemi jsou jednoznačným důsledkem rostoucí odolnosti bakteriální populace k antibiotikům (Livermore, 2009).

Rezistence vůči antibiotikům je kritickým problémem nejen v oblasti humánní medicíny, ale také v medicíně veterinární (Bush a kol., 2011).

Glykopeptidy, jako jedna z významných skupin antibiotik, jsou známé již od 50. let minulého století. Hlavní zástupci, vankomycin a následně teikoplanin byly vždy vnímány jako rezervní přípravky pro léčbu těžkých infekcí vyvolaných gram pozitivními bakteriemi. Rozsáhlého uplatnění se jim dostalo až koncem minulého století s narůstajícím výskytem MRSA (**M**ethicilin **r**ezistentní *Staphylococcus aureus*), případně dalších mikroorganismů rezistentních především k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům, makrolidům nebo tetracyklinům. Zvýšená spotřeba obou glykopeptidů se následně projevila výskytem rezistence u enterokoků. Tyto komenzály zažívacího systému se mohou za určitých podmínek uplatnit jako významné oportunní patogeny jak v humánní, tak i veterinární medicíně. Ke klinicky významným druhům patří především *Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis*, původci široké škály infekčních komplikací. Příkladem mohou být infekce močového systému, endokarditidy, sepse atd. Ztráta účinnosti vankomycinu a teikoplaninu pak patří k závažným fenoménům, které přinášejí výrazné omezení volby klinicky účinných antibiotik u řady závažných onemocnění (Bertelloni a kol., 2015).

Pro tuto diplomovou práci byla zvolena studie kmenů *Enterococcus faecium*. Studie dokumentuje současnou mnohdy kritickou situaci ve výskytu rezistence k vankomycinu. Kmeny *E. faecium*, rezistentní k vankomycinu, byly izolovány z trusu amerických vran ve čtyřech státech USA (Kalifornie, Kansas, Massachusetts, New York) a na Ostrově prince Edwarda v Kanadě v letech 2012-2013. Pozornost byla věnována detekci plazmidů a jimi přenášených genů rezistence k dané skupině antibakteriálních látek.

## 2 Vědecká hypotéza a cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo zjistit v izolátech přítomnost plazmidů odpovědných za přenos genů rezistence k vankomycinu a vybrat izoláty s jedním plazmidem.

Charakteristika plazmidů, které nesou *vanA* geny, geny rezistence k dalším antibiotikům a geny virulence.

Hypotézou je, že v různých prostředích existuje jeden či více typů epidemiologicky významných *vanA* gen-nesoucích plazmidů, které jsou schopné se horizontálně šířit.

## 3 Přehled literatury

### 3.1 *Enterococcus* spp.

Rod *Enterococcus* se řadí do čeledi *Enterococcaceae* a tvoří součást běžné mikroflóry zažívacího traktu velké škály hostitelů - člověka a jiných savců, ptáků, plazů a hmyzu (Lebreton a kol., 2014). Dále je možné tyto organismy nalézt v půdě, vodě, na rostlinách, v mléčných výrobcích a jiných potravinách (Lebreton a kol., 2014).

Díky velké škále rezistence proti antibakteriálním látkám, biocidním látkám a kovům, představuje tento bakteriální rod jeden z nejlepších příkladů bakteriální adaptace na různé typy prostředí, a plní tak různorodé role jak symbiotických bakterií, tak i oportunních patogenů.

#### Historický pohled

Termín „*Enterococcus*“ má svůj původ na konci 19. století. V roce 1899 jej použil francouzský vědec Thiercelin ve své zprávě ve French Society of Biology. Popsal tohoto mikroba jako Gram-pozitivní saprofytické koky ve dvojicích a krátkých řetízích. Termín „*Enterococcus*“ měl tak zdůraznit jeho morfologii a střevní původ (Lebreton a kol., 2014; Murray a kol., 1999).

Ve stejné době byla publikována práce MacCalluma a Hastingsse o případu pacienta s akutní endokarditidou způsobenou mikroorganismem, kterého nazvali *Micrococcus zymogenes* (dnes je tento kmen uznán jako *Enterococcus faecalis*). Tento mikroorganismus vykazoval stejné vlastnosti jako zástupci rodu *Enterococcus* (Facklam a kol., 2002; MacCallum a kol., 1899).

V roce 1906 bylo poprvé použito Andrewesem a Horderem označení *Streptococcus faecalis*. Kmen byl opět izolován od pacienta s endokarditidou. Tento název měl charakterizovat organismus fekálního původu (Andrewes a kol., 1906; Murray a kol., 1999).

V dalších letech byly pak popsány kmeny *Streptococcus faecium*, *S. durans*, *S. avium* vykazující rozdílné vlastnosti ve fermentaci oproti *S. faecalis* (Sherman, 1937).

V roce 1937 bylo pak navrženo schéma, které mělo oddělit neenterokokové streptokoky (pyogenní, viridující a mléčné) od těch enterokokových, na základě rozdílných kultivačních podmínek (růst při různých teplotách a hodnotách pH). Ve 30. letech 20. století bylo publikováno serologické rozdělení, které korelovalo s předchozím rozdělením na streptokoky neenterokokové a enterokokové. Enterokoky byly tak klasifikovány jako

streptokoky skupiny D. To proto, že mají společný skupinový stěnový antigen D (glycerol-teichoová kyselina vázaná na cytoplazmatickou membránu) (Bednář a kol., 1996; Murray a kol., 1999; Sherman, 1937).

V roce 1970 navrhl Kalina ve své studii „The position of enterococci in the system of microorganisms“ vytvoření samostatného taxonu *Enterococcus* (Kalina et al. 1970). Samostatný taxon měl být založen na základě buněčného uspořádání a fenotypových charakteristik v enterokokové skupině (Facklam a kol., 2002).

Rod *Enterococcus* byl formálně přijat v roce 1984. Na základě genetických výsledků DNA – DNA hybridizace a sekvenace genu pro 16S rRNA došlo k značným změnám v taxonomii. Nejprve byly do rodu *Enterococcus* přesunuty kmeny *S. faecalis* a *S. faecium* (tedy *Enterococcus faecalis* a *E. faecium*) a později i ostatní streptokoky skupiny D s výjimkou *Streptococcus bovis*, u kterého je rovněž přítomen antigen D (Bednář a kol., 1996; Collins a kol., 1984).

#### Taxonomie a fyziologie enterokoků

Do rodu *Enterococcus* v současnosti patří druhy gram-pozitivních koků (sférických až ovoidních buněk) uspořádaných do dvojic či krátkých řetězků. Jsou nesporulující nesporulující, fakultativně anaerobní, kataláza negativní a některé druhy jsou pohyblivé (např. *E. gallinarum* a *E. casseliflavus*). Optimální teplota růstu je 35°C (rostou i při nízké teplotě od 10°C do teploty 45°C). Přežívají půlhodinové zahřátí na 60°C. Jsou rezistentní k vysokému pH (8,5) a mají schopnost růst v hypertonickém roztoku (6,5% NaCl), hydrolyzují eskulin v přítomnosti 40 % žlučových solí. Enterokoky mají fermentativní typ metabolismu bez produkce plynu. Obvykle jsou homofermentativní, produkují kyselinu mléčnou jako konečný produkt při fermentaci glukózy. Jsou schopné využít široké spektrum sacharidů (D-glukóza, D-fruktóza, D-manóza, galaktóza, maltóza, laktóza, aj.) (Bednář a kol., 1996; Huycke, 2002; Murray a kol., 2005).

V cytoplazmatické membráně *E. faecalis* jsou obsaženy četné proteiny, které jsou schopné degradovat mucin. To může být výhodné zejména jako dostatečný zdroj cukrů a usnadnění bakteriální adheze (Ramsey a kol., 2014).

Bakteriociny (enterociny) produkované zástupci rodu *Enterococcus* vykazují široké spektrum antibakteriálních účinků a vynikají tak svoji inhibiční aktivitou jak proti gram-pozitivním tak gram-negativním bakteriím, včetně alimentárních patogenů. Proto se některé

enterokoky používají jako probiotické doplňky v potravinách a krmivech, nebo jako startovací či ochranné kultury (Moreno a kol., 2006; Kang a kol., 2005; Nes a kol., 2007).

Všechny tyto metabolické a fyziologické funkce poskytují enterokokům velkou výhodu v kolonizaci prostředí a zvyšují tím i jejich konkurenceschopnost v osídlování hostitelů (Freitas, 2011).

### **3.2 Antimikrobiální látky**

Jako antimikrobiální látky jsou označovány skupiny léčiv s baktericidními či bakteriostatickými účinky. Užívají se k profylaxi či k terapii infekčních onemocnění. Antibiotika, jsou původně mikrobiálního původu – jedná se o sloučeniny produkované mikroorganismy. Antimikrobiální látky připravené chemickou cestou se nazývají jako chemoterapeutika (Bednář, 1996; Murray a kol., 2005; Votava, 2001).

Antibakteriální látka musí vykazovat selektivní toxicitu, to znamená, že nesmí poškozovat eukaryotní buňky. Dalším požadavkem na antibiotikum je to, aby látka účinkovala v nízkých koncentracích, řádově v mg/l. Žádné antibiotikum není totiž pro makroorganismus zcela neškodné, neboť se jedná o látky, které nejsou tělu vlastní. (Bednář a kol., 1996; Brooks a kol., 2007).

Základním dělítkem antimikrobiálních látek je jejich chemická struktura, spektrum účinku (antibiotika s úzkým spektrem účinku a antibiotika se širokým spektrem účinku), typ účinku (baktericidní, bakteriostatický), cílové mikrobiální druhy a případně i jejich farmakologické vlastnosti (Bednář a kol., 1996).

Dle typu účinku antimikrobiálních látek na bakteriální buňku se v praxi rozlišují:

1. Antimikrobiální látky s baktericidním účinkem
2. Antimikrobiální látky s bakteriostatickým účinkem

Ad 1) Jedná se o ireverzibilní proces působení baktericidních látek, které po určitém expozičním čase a při dané koncentraci destrukují bakteriální buňku. Účinek působení na bakteriální buňku je v tomto případě rychlejší než u látek s bakteriostatickým účinkem.

Do skupiny antimikrobiálních látek s baktericidním účinkem patří:  $\beta$ -laktamová antibiotika (peniciliny, cefalosporiny), glykopeptidy (vankomycin, teicoplanin), aminoglykosidy, polypeptidy (colistin, polymyxin B), ansamyciny (rifampicin), fluorochinolony (ciprofloxacin, ofloxacin, pefloxacin, norfloxacin)

Ad 2) antibakteriální látky s bakteriostatickým účinkem zabraňují růstu a množení bakterií, Udrží bakteriální buňku ve stacionární fázi růstu. Tyto látky působí reverzibilně – po jejich vysazení se mohou bakterie opět začít množit.

Do skupiny antibakteriálních látek s bakteriostatickým účinkem patří: tetracykliny, chloramfenikol, makrolidy, linkosamidy, sulfonamidy (Bednář a kol., 1996, Mascaretti, 2003; Votava, 2001).

### **3.2.1 Mechanismus účinku ATB**

Antimikrobiální látky působí v různých místech bakteriální buňky a to několika způsoby. Dle mechanismu účinku jsou rozděleny do několika skupin (Brooks a kol., 2007)

1. Inhibice syntézy buněčné stěny
2. Inhibice funkce buněčné stěny
3. Inhibice syntézy proteinů
4. Inhibice syntézy kyseliny listové
5. Inhibice syntézy nukleových kyselin

#### **3.2.1.1 Zásah do syntézy buněčné stěny**

Všechna antibiotika, která inhibují syntézu buněčné stěny bakterií, mají baktericidní účinek. Patří sem převážně  $\beta$ -laktamová antibiotika (peniciliny a cefalosporiny) a glykopeptidy (vankomycin) – pouze u gram-pozitivních bakterií (membrána gram-negativních bakterií není pro glykopeptidy propustná) (Bednář a kol., 1996; Votava, 2001).

Mechanismus účinku  $\beta$ -laktamových antibiotik

Hlavní konstrukční prvek stěny prokaryotické buňky je vrstva peptidoglykanu. Jedná se o lineární polymer dvou střídajících se aminocukrů: N-acetylglukosaminu a N-acetylmuramové

kyseliny (3-O-D-laktylderivát N-acetylglukosaminu), spojených pomocí peptidových můstků. Vesměs se jedná o  $\beta$ -1-4-vazby, které ve výsledku vytváří pevné pletivo (pevnější u gram-pozitivních bakterií než u gram-negativních). Stavba tohoto pletiva je katalyzována specifickými enzymy (transpeptidázami, transglykosylázami, karboxypeptidázami). Tyto enzymy mají schopnost vázat  $\beta$ -laktamová antibiotika. Jsou také nazývány jako PBPs enzymy (z angl. „Penicilin-binding proteins“ – proteiny vázající penicilin) (Bednář a kol., 1996; Murray a kol., 2005; Votava, 2001).

Během růstu bakteriální buňky se peptidoglykanový sacculus zvětšuje spolu s buňkou. To se děje vsunováním stavebních jednotek peptidoglykanu do stávající struktury. Pokud jsou bakterie v růstové fázi vystaveny  $\beta$ -laktamovým antibiotikům, antibakteriální látka se naváže na specifická PBPs v buněčné stěně a inhibuje tvorbu nové peptidoglykanové vrstvy. Ve stěně jsou také autolytické enzymy, které se  $\beta$ -laktamy aktivují a degradují buněčnou stěnu (Bednář a kol., 1996; Murray a kol., 2005; Votava, 2001).

#### 3.2.1.2 Inhibice funkce buněčné membrány

Působením antibakteriálních látek s baktericidním účinkem dochází ke ztrátě selektivní permeability a integrity cytoplasmatické membrány. Tím dojde k narušení iontové rovnováhy a následné destrukci buňky (Bednář a kol., 1996; Brooks, 2007).

Mechanismus účinku antibiotik poškozujících buněčnou membránu prokaryotické buňky

Cytoplasmatická membrána prokaryotické buňky má odlišnou strukturu od buňky eukaryotické, proto může být snadněji narušena některými agens. Toho lze bezpečně dosáhnout v důsledku selektivní toxicity agens (Brooks a kol., 2007; Votava, 2001).

Polypeptidová antibiotika (polymyxin B a kolistin) účinkují jako detergenty na fosfolipidy. Tyto antibakteriální látky se skládají z polycyklických peptidů, které selektivně poškozují phosphatidylethanolamin, hlavní složku cytoplasmatické membrány bakterií (Bednář a kol., 1996; Brooks a kol., 2007).

Další skupinou membránově aktivních látek jsou ionofory. Jedná se o sloučeniny, které umožňují rychlý pohyb konkrétních iontů přes cytoplasmatickou membránu. Do této skupiny patří např. valinomycin, který specificky zprostředkovává rychlý průchod draslíku. Některé ionofory působí tím, že tvoří v membráně prokaryotické buňky hydrofilní póry, některé se zase chovají jako lipidově-rozpustné iontové přenašeče. Ionofory jako takové



naruší membránový potenciál, který je důležitý pro oxidativní fosforylaci, stejně jako pro ostatní membránové procesy (Brooks a kol., 2007).

### 3.2.1.3 Inhibice syntézy proteinů

Do skupiny antibiotik, které mají za následek inhibici syntézy proteinů, patří:

- a) Antimikrobiální látky působící baktericidně: aminoglykosidy
- b) Antimikrobiální látky působící bakteriostaticky: tetracykliny, makrolidy, linkosamidy, chloramfenikol

Mechanismus účinku antimikrobiálních látek inhibujících proteosyntézu v bakteriální buňce

V posledním kroku dráhy genové exprese je genová informace, zakódovaná v mRNA, přeložena v ribozomu do příslušného proteinu. Bakteriální ribozom 70S se skládá ze dvou podjednotek, 30S a 50S. Tyto podjednotky jsou navzájem spojeny prostřednictvím sítě mezimolekulárních můstků. Obě podjednotky se stávají terčem pro několik klinicky významných antibiotik (Mascaretti, 2003).

Tetracykliny se vážou k 30S podjednotce ribozomu a interferují s aminoacyl-t-RNA v iniciačním komplexu. Tzn., že zabraňuje vazbě na 30S ribozom a tak nejsou k dispozici aminokyseliny pro syntézu peptidového řetězce. Vazba tetracyklinu je reverzibilní (Brooks a kol., 2007; Votava, 2001).

Aminoglykosidy mají afinitu k 30S podjednotce ribozomu, kde inhibují tvorbu iniciačního komplexu, od nichž se rozvíjí syntéza bílkovin. Následkem je znemožnění průběhu proteosyntézy (nesestaví se startovací komplex ribozomu s mRNA) nebo vznikají nefunkční bílkoviny. Vazba na ribozom je ireverzibilní (Votava, 2011).

Makrolidy mají afinitu k 50S podjednotce ribozomu. Inhibují proteosyntézu, neboť po vzniku peptidické vazby brání uvolnění tRNA. V nižších koncentracích působí makrolidy bakteriostaticky, ve vyšších pak baktericidně (Bednář a kol., 1996; Votava, 2011).

Chloramfenikol má afinitu k 50S podjednotce ribozomu a zabraňuje transpeptidaci. Působí bakteriostaticky (Bednář a kol., 1996; Votava, 2001).

#### 3.2.1.4 Inhibice syntézy kyseliny listové

Kyselina tetrahydrolistová je nutná pro syntézu purinových látek a tymidinu, které jako stavební jednotky vstupují do syntézy DNA a RNA. Prokaryotická buňka, na rozdíl od buňky eukaryotické, dokáže syntetizovat kyselinu dihydrolistovou, která se následně redukuje na kyselinu tetrahydrolistovou. Zásadním metabolitem pro bakteriální syntézu kyseliny listové je kyselina para-aminobenzoová (PABA) (Bednář a kol., 1996; Brooks a kol., 2007; Votava, 2001).

Do skupiny antibakteriálních látek, které inhibují syntézu kyseliny listové patří:

- Sulfonamidy
- Diaminopyrimidiny (např. trimethoprim)
- Kotrimoxazol (kombinace sulfonamidu a diaminopyrimidinu)

Mechanismus účinku antibakteriálních látek, které interferují se syntézou kyseliny listové

Sulfonamidy mají velmi podobnou chemickou strukturu jako PABA. Na základě toho kompetitivně inhibují přeměnu PABA na kyselinu dihydrolistovou (obsazují její cílová místa a tím brzdí syntézu kyseliny listové), což brání dalšímu růstu bakteriální buňky. Sulfonamidy mají bakteriostatický účinek (Bednář a kol., 1996; Brooks a kol., 2007; Lüllmann a kol., 2004; Votava, 2001).

Trimethoprim a pyrimetamin kompetitivně inhibují dihydrofolátreduktázu (enzym, který má za následek redukcí kyseliny listové na metabolicky účinnou kyselinu tetrahydrolistovou). Působí bakteriostaticky (Bednář a kol., 1996; Brooks a kol., 2007; Gleckman a kol., 1981; Lüllmann a kol., 2004; Votava, 2001).

Kotrimoxazol je kombinací sulfonamidů a diaminopyrimidinů. Má baktericidní účinky (Votava, 2001).

#### 3.2.1.5 Inhibice syntézy nukleových kyselin

Jedná se o syntetickou skupinu antibakteriálních látek baktericidního charakteru. Patří sem chinolony (inhibují bakteriální DNA gyrázu a topoizomerázu IV; enzymy, které jsou nutné pro replikaci, rekombinaci a reparaci DNA), nitromidazoly, ansamyciny, flucytosin (inhibuje syntézu DNA kvasinek), griseofulvin (působí na DNA dermatofytů), rifampin (inhibuje RNA polymerázu a zabraňuje tím syntéze mRNA, jeho účinek nastupuje před zahájením transkripce) (Murray, 2005; Votava, 2001).

### 3.2.2 Glykopeptidy

Glykopeptidy tvoří poměrně malou skupinu antibakteriálních látek přírodního a syntetického původu, které inhibují pozdní fázi syntézy peptidoglykanu buněčné stěny prokaryotické buňky. Využívají se převážně při léčbě těžkých infekcí, které jsou způsobené gram-pozitivními patogeny, jako jsou například enterokoky, MRSA (**M**ethicilin **R**ezistentní *Staphylococcus aureus*) a *Clostridium difficile* (Kang, H. a kol., 2015; Reynolds, P. E., 1989).

Počátky užívání glykopenidových antibiotik začínají v 50. letech minulého století, kdy zahájila americká farmaceutická společnost Eli Lilly program, který byl zaměřený na objevení antibiotika působícího proti penicilin-rezistentním stafylokokovým infekcím (Kang a kol., 2015; Reynolds, 1989).

V roce 1952 poslal misionář na ostrově Borneo v jihovýchodní Asii vzorek zeminy svému příteli Dr. Edmundovi C. Kornfeldovi (organický chemik ve společnosti Eli Lilly). Z tohoto vzorku půdy byl izolován mikroorganismus *Amycolaptosis orientalis* z čeledi *Pseudonocardiaceae*, který produkoval látku, aktivní i v nízkých koncentracích, proti většině gram-pozitivním mikroorganismům, včetně penicilin-rezistentním stafylokokům. Látka dostala označení jako „sloučenina 05865“ (= původní pracovní název pro vankomycin).

V prvních letech po objevu byla aplikace této látky, z důvodů toxicity, vyloučena. Význam vankomycinu pro klinické použití byl také dočasné snížen díky zavedení  $\beta$ -laktamáza – stabilních penicilinů. Následný vznik alternativních mechanismů rezistence vůči  $\beta$ -laktamovým antibiotikům a zlepšením čistoty preparátů vedly k obnově zájmu o použití glykopeptidů.

Teicoplanin byl poprvé popsán v roce 1978, má podobnou strukturu jako vankomycin. Je izolován z aktinomycety *Actinoplanes teichomyceticus*. Oproti vankomycinu má delší eliminační čas, může být použit v nižších koncentracích. V USA není schválen k terapii. V Evropě byl značně využíván od roku 1988 (Bambeke; Kang a kol., 2015; Levin, 2006; Reynolds, 1989).

Glykopeptidová antibiotika byla klíčovou zbraní v boji proti bakteriálním infekcím více než půl století.

Vznik a značné rozšíření rezistence k původním přírodním glykopeptidovým antibiotikům (vankomycin a teicoplanin), vedl k objevu a klinickému vývoji druhé generace

lipoglykopeptidových derivátů, mezi které patří telavacin, dalbavacin a oritavacin. Tyto semi-syntetické glykopeptidy mají širší spektrum aktivity a lepší farmakokinetické vlastnosti (Butler a kol., 2014).

### 3.2.2.1 Chemická struktura glykopeptidů

Přírodní glykopeptidy jsou složité molekuly s unikátní strukturou. Trojrozměrná struktura obsahuje štěrbinu, do které se vejdou peptidy podle konkrétní konfigurace (L-aa-D-aa-D-aa). Takové sekvence se nacházejí jen v buněčné stěně bakterií, proto jsou glykopeptidy selektivně toxické (Reynolds, 1989).

Struktura je založena na centrální heptapeptidové doméně, ve které pět ze sedmi zbytků aminokyselin je společných pro všechny glykopeptidy. Na heptapeptidovou doménu jsou navázány dva aminocukry.

Glykopeptidy se liší v aminokyselinách v polohách 1 a 3, jako v substituentech zbytků aromatických aminokyselin. Obzvláště pak některé z uhlíků aromatických zbytků nesou chloridové, hydroxylové nebo methylové skupiny. Některé z hydroxylových skupin jsou substituovány cukry nebo aminocukry.

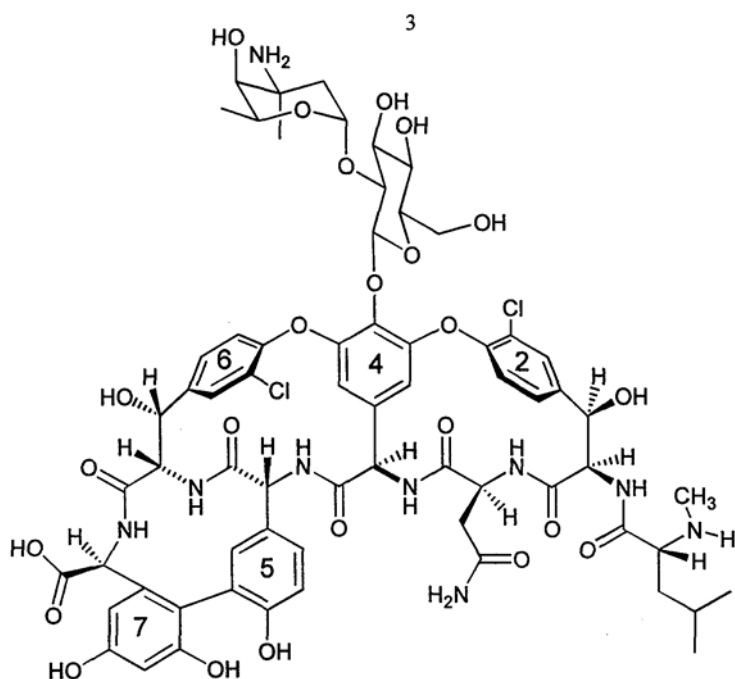
Přítomnost fenolických zbytků umožňuje vytvoření dvou- a tří-kruhových struktur ve všech glykopeptidech. Takové interakce vedou k velké skupině molekul s velmi podobnou strukturou.

Základní struktura, která obsahuje sedm zbytků aminokyselin, se označuje jako „aglykon“ a je biologicky aktivní.

Cukry a aminocukry, které byly shledány jako substituenty, se převážně nachází na vnější části molekuly, nijak výrazně neovlivňují antibiotickou aktivitu in vitro. Nicméně jsou důležité pro farmakokinetické vlastnosti jednotlivých glykopeptidů.

Některé glykopeptidy (teicoplanin a aridicin) mají aminoskupinu aminocukru substituovanou řetězcem mastné kyseliny, který obsahuje 9 až 11 atomů uhlíku. Tento substituent zajišťuje větší hydrofóbnost teicoplaninu oproti vancomycinu.

Bylo zjištěno, že nové deriváty (telavancin), které obsahují postranní hydrofobní řetězec, si udržely antibakteriální aktivitu vůči MRSA a vankomycin-rezistentním enterokokům (VRE) a vykazovaly lepší farmakokinetické vlastnosti (Bambeke, a Bhagavan, 2002; Leadbetter a kol., 2004; Reynolds, 1989)



**Obrázek 1** Strukturální vzorec vankomycinu (Nagarajan, R., 1991).

Strukturální vzorec vankomycinu je charakterizován přítomností sedmi aminokyselin spojených peptidovými vazbami, držení v pevné konformaci „sít'ovými“ vazbami prostřednictvím aromatických substitučních skupin nejméně pěti aminokyselinových zbytků.

Ve struktuře heptapeptidového vankomycinu, „aglykon“ vankomycinu, jsou aromatické postranní řetězce aminokyselin 2, 4 a 6 spolu spojeny pomocí etherových vazeb. Postranní řetězce aminokyselin 5 a 7 jsou spojeny vazbou uhlík – uhlík. Aminokyseliny 1 a 3 [Leucin (Leu) a Asparagin (Asn)] (Nagarajan, R., 1991).

### 3.2.2.2 Mechanismus účinku glykopeptidů

Buněčná stěna prokaryotické buňky obsahuje tuhý či polotuhý obal nacházející se vně buněčné membrány - peptidoglykan. Ten poskytuje jakousi buněčnou konstrukční podporu. Monomery peptidoglykanu tvoří hlavní cukerný řetězec s peptidovými a disacharidovými jednotkami, které se spojují glykosidickou vazbou do dlouhých řetězců prostřednictvím transglykosylace (Reynolds, 1989).

Glykopeptidové antibakteriální látky mohou projít přes buněčnou membránu do míst polymerace, kde se tvoří nekovalentní vazby s terminálními sacharidy. Glykopeptidy interagují s peptidy podle L-aa-D-aa-D-aa konformace vodíkových můstků a tvoří tak stabilní komplexy. V důsledky vazby glykopeptidů s L-aa-D-Ala-D-Ala koncem peptidoglykanu a

jeho prekurzorem lipidu II (základní předchůdce biosyntézy bakteriální buněčné stěny) v meziproduktech buněčné stěny. Viz obrázek 2

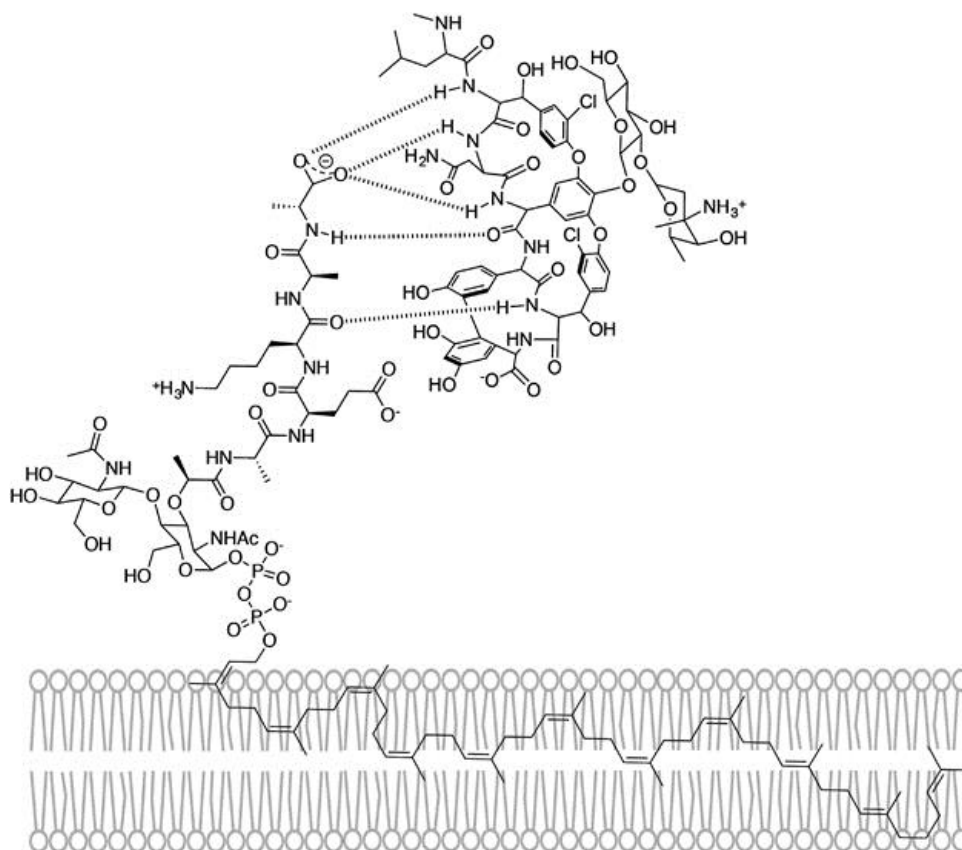
Lipid II zahrnuje specializované lipidy (undekaprenylfosfáty), které jsou spojeny pomocí pyrofosfátu s hlavní hydrofilní skupinou skládající se z podjednotky peptidoglykanu (disacharid N-acetylglukosamin-N-acetylmuramové kyseliny, spojený ke krátké pentapeptidové skupině) (Fletcher a kol., 2015)

Undekaprenylfosfáty jsou základní transportéry lipidů v buněčné membráně bakterií a jsou vyžadovány pro syntézu peptidoglykanu a řady dalších buněčných povrchových polymerů. Tato lipofilní sloučenina (undekaprenylfosfát) a je tvořena vyšším nenasyceným rozvětveným alkoholem, který je esterifikován kyselinou fosforečnou. Transport prekurzorů přes membránu začíná tím, že fosfátová skupina undekaprenylfosfátu atakuje molekulu kyseliny uridin-difosfát-N-acetylmuramové (UDP-NAM), přičemž dochází k odštěpení UMP (urin-monofosfát) a dochází ke vzniku pentapeptidu kyseliny undekaprenyl-difosfát-N-acetylmuramové (undekaprenyl-P-P-NAM-pentapeptid). Ten následně atakuje 1-uridin-difosfát-N-acetylglukosamin (UDP-NAG) a dochází k připojení N-acetylglukosaminu (NAG) na C4 uhlík undekaprenyl-P-P-NAM-peptidu glykosidickou 1,4-vazbou, přičemž se odštěpí UDP (uridin-difosfát). Takto vzniklý disacharidový komplex NAG a pentapeptidu kyseliny N-acetylmuramové (NAM) navázané přes difosfátový můstek na undekaprenol je transportován přes membránu ven do místa, kde se odehrává extracelulární fáze syntézy peptidoglykanu (HTML2; Shaaly a kol., 2013; Yim a kol., 2014)

Glykopeptidy inhibují tvorbu páteřních glykanových řetězců (katalyzované peptidoglykovou polymerázou) z jednoduchých podjednotek stěny, které jsou extrudovány skrze cytoplazmatickou membránu. Tato vazba účinně izoluje substrát pro dva klíčové enzymy, které jsou podstatné pro syntézu buněčné stěny. Jedná se o transglykosylázy, které převádějí pentapeptidové podjednotky N-acetyl-muramové kyseliny-N-acetyl-glukosaminu y Lipidu II do buněčné stěny. Další skupinou enzymů jsou D,D-transpeptidázy, které pomocí CrossLink vazby spojují polymerní řetězce peptidoglykanu. Následkem toho je neschopnost růstu a narušení rigidity buněčné stěny tím, že jsou inhibovány reakce, které tvoří pevné pletivo a zodpovídají tak za tuhost buněčné stěny. Takto oslabená buněčná stěna nemůže vydržet pozitivní osmotický tlak v buňce, což vede k cytolýze a smrti bakteriální buňky (Ashfo, 2012; Shaaly a kol., 2013; Yim a kol., 2014).

Tento způsob účinku se zaměřuje na biochemicky komplexní a všudypřítomné buněčné stěny na vnější straně gram-pozitivních bakterií. Jedná se o důmyslnou strategii,

která brání rychlému rozvoji rezistence, například prostřednictvím tzv. upregulace efluxních systémů, či tzv. downregulaci transportních proteinů nebo mutaci v cílových enzymech, účinně tak eliminuje tři společné mechanismy rezistence vůči antibiotikům (Ashfo, 2012; Fletcher a kol., 2015; HTML2; Kang a kol., 2015; Reynolds, 1989; Shaaly a kol., 2013; Yim a kol., 2014).



**Obrázek 2 Interakce mezi vankomycinem a lipidem II**

H-vazby (přerušované) jsou mezi vankomycinem a D-Ala-D-Ala konci lipidu II (Yim a kol., 2014).

### 3.3 Rezistence

Antibiotická rezistence bakterií je jejich odolnost vůči antibiotikům. Rezistence gram-pozitivních patogenů se významně uplatňují při získaných komunitních a nozokomiálních infekcích a představují tak stále větší hrozbu pro veřejné zdraví.

Rezistence bakterií se vyvinula pro většinu klinicky relevantních antibiotik a je obvykle dosažena prostřednictvím jednoho ze tří mechanismů:

1. Modifikace cílového místa působení antimikrobiální látky
2. Inaktivace antimikrobiální látky

### 3. Aktivními efluxními systémy

Konstitutivní exprese determinant odpovědných za rezistenci může být náročná na fitness mikroorganismu a tím vytvářet selektivní tlak proti šíření rezistence avšak tyto „náklady“ mohou být zmírněny regulací exprese proteinů zodpovědných za rezistenci v nepřítomnosti antibakteriální látky. Rezistence s indukovatelnou expresí determinant rezistence se šíří snadněji a přetrvávají déle v bakteriálních populacích. (Chancey a kol., 2012).

#### 3.3.1 Rezistence enterokoků k antibiotikům

Enterokoky jsou mikroorganismy s pozoruhodnou schopností přizpůsobit se prostředí a získat tak odolnost vůči antibakteriálním látkám. Vývoj antimikrobiální rezistence u těchto bakterií představuje globální problém v léčbě vážných infekcí.

Enterokoky jsou běžnou příčinou nozokomiálních infekcí (jsou na druhém místě za stafylokoky) jako etiologičtí původci infekcí v amerických nemocnicích (Arias a kol, 2010). V Evropě se zdá, že prevalence rezistence na vankomycin u enterokoků na vzestupu, avšak s významnými regionálními rozdíly (Arias a kol, 2010).

Antimikrobiální rezistence u enterokoků lze rozdělit do dvou skupin:

1. Rezistence přirozené
2. Rezistence získané

##### Ad 1) Rezistence přirozené

Tento druh rezistence k antimikrobiálním látkám je způsoben buď nedostatkem cílových míst pro antibiotická léčiva, nebo se jedná o nedostatečné proniknutí antibiotika do cílového intracelulárního místa. PBP enterokoků mají nízkou aktivitu a slabě vážou  $\beta$ -laktamová antibiotika (Hollenbeck a Rice, 2012).

V důsledku špatné propustnosti buněčné stěny pro aminoglykosidy, nejsou tato antibiotika schopna dosáhnout svého cílového místa. Nicméně pokud jsou aminoglykosidy v kombinaci s inhibitory syntézy buněčné stěny (např.  $\beta$ -laktamová antibiotika a glykopeptidy), mají synergický baktericidní účinek. Kmeny *Enterococcus faecium* (jako jedině mezi enterokoky) obsahují chromozomálně produkované geny *aac(6')-II*, které kódují enzym aminoglykosidovou acetyltransferázu AAC(6')-II, který katalyzuje acetylaci 6'aminoskupiny



kanamycinu A a B, neomycinu, netilmicinu, sisomicinu a tobramycinu. Gentamicin není tímto enzymem nijak ovlivněn (Hollenbeck a Rice, 2012).

Mezi enterokoky, pro které je přirozená rezistence k vankomycinu charakteristická, patří *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* a *Enterococcus flavescens*. Pro tyto enterokoky je specifická VanC ligáza (VanC-1 pro *E. gallinarum*, VanC-2 pro *E. casseliflavus*, VanC-3 pro *E. flavescens*). Jedná se o enzymy, které se účastní syntézy prekurzorů pentapeptidů peptidoglykanu, které jsou zakončeny D-Ala-D-Ser. Enterokoky s VanC zůstávají citlivé k teicoplaninu (Costa a kol., 1993; Georgopapadakou a kol., 1980; Moellering a kol., 1971; Neu, 1987; Reid a kol., 1999).

#### Ad2) Rezistence získané

Oproti přirozeným rezistencím, mají rezistence získané větší význam. Jedná se o rezistence získané prostřednictvím chromozomálních mutací či rezistence získané výměnou MGE (Mobilní Genetické Elementy) jako jsou plazmidy nebo transpozony (Witte a kol., 1999).

Příkladem mohou být mutace DNA gyrázy nebo topoizomerázy IV, které snižují afinitu chinolonových antibiotik (Tankovic a kol., 1996).

#### 3.3.1.1 Získaná rezistence k $\beta$ -laktamovým antibiotikům

Enterokoky mohou vykazovat zvýšenou odolnost k  $\beta$ -laktamům akvizicí  $\beta$ -laktamázy nebo mutací PBP4/5. Plazmidem přenášené *bla* geny kódují  $\beta$ -laktamázu. *Bla* geny enterokoků jsou shodné s *bla* geny *S. aureus* a jsou často kódovány zbytky stafylokokové  $\beta$ -laktamázy transpozonu Tn552 (Hollenbeck a Rice, 2012; Murray a Mederski-Samaroj, 1983; Murray, 1992).

Rezistence k penicilínu je u *E. faecium* na vysoké úrovni a je nejčastěji spojena s hromaděním bodových mutací v penicilin vazebné oblasti PBP5. Tyto mutace pravděpodobně vznikly *de novo* pod selekčním tlakem antibiotik (Hollenbeck a Rice, 2012; Zapun a kol., 2008).

### 3.3.1.2 Získaná rezistence k aminoglykosidům

Rezistence k aminoglykosidům zprostředkována MGE má oproti přirozené rezistenci mnohem vyšší úroveň. Mezi geny, které kódují rezistenci k aminoglykosidům, jsou nejvíce znepokojivé ty, které vedou k rezistenci ke gentamicinu a streptomycinu, neboť tato antibiotika jsou užívána k synergické léčbě závažných enterokokových infekcí. K rezistenci ke gentamicinu nejčastěji dochází akvizicí bifunkčního genu kódujícího APH(2'')-Ia-AAC(6')-Ie. Tento enzym inaktivuje gentamicin a strukturně příbuzné aminoglykosidy.

Rezistence vůči streptomycinu se nejčastěji vyskytuje prostřednictvím enzymatické modifikace antibiotika nebo jednobodové mutace ribozomu. Adenyltransferázy, Ant (6') – Ia a Ant (3') – Ia, jsou odpovědné za inaktivaci streptomycinu a strukturně příbuzných aminoglykosidů (Hollenbeck a Rice, 2012; Chow, 2000; Mederski-Samoraj a Murray, 1983).

### 3.3.1.3 Získané rezistence ke glykopeptidům

Rezistence enterokoků ke glykopeptidovým antibiotikům byla poprvé popsána v roce 1988, glykopeptid-rezistentní enterokoky (GRE) se ukazují jako jedny z hlavních příčin nozokomiálních infekcí. Většinu GRE tvoří hlavně *E. faecium* ale i *E. faecalis* a poté i další enterokoky. Odhaduje se, že ve Spojených státech amerických je 30% klinických izolátů rodu *Enterococcus* rezistentních ke glykopeptidům (Farrell a kol., 2011; Hollenbeck a Rice, 2012).

#### 3.3.1.3.1 Rezistence k vankomycinu

Vankomycin působí vazbou na D-Ala-D-Ala konec pentapeptidového prekurzoru a tím inhibuje syntézu buněčné stěny. Glykopeptid-rezistentní mikroorganismy mají tyto prekurzory modifikované. Zakončení D-Ala-D-Lac (D-alanyl-D-laktát) pro fenotypy rezistence VanA, VanB, VanD a VanM. Zakončení D-Ala-D-Ser (D-alanyl-D-serin) pro fenotypy rezistence VanC, VanE, VanG, VanL, VanN. Modifikované prekurzory buněčné stěny vážou glykopeptidy s 1000x nižší afinitou než nemodifikované prekurzory (Hollenbeck a Rice, 2012).

Tyto faktory se od sebe liší jak geneticky, tak fenotypově. Tato odlišnost je na základě jejich fyzického umístění (kódování na MGE nebo v jaderném genomu); specifitou

glykopeptidu, proti kterým je udělena rezistence (rezistence vůči vankomycinu a teicoplaninu, nebo jen rezistence na vankomycin, ale ne na teicoplanin); úrovní rezistence; zda je rezistence indukovatelná nebo konstitutivně exprimována; a na typu peptidoglykanového prekurzoru, který je produkován. (Hollenbeck a Rice, 2012; Kristich a kol, 2014).

Pro vytvoření modifikovaného prekurzoru je požadováno nejméně sedm otevřených čtecích rámců transkribovaných ze dvou různých promotorů (Hollenbeck a Rice, 2012).

Pro použití VanA klastru, jsou to tyto enzymy VanA, H, X, Y, Z, R a S. Z počátku mobilní pyruvát je přeměněn na d-laktát pomocí VanH-dehydrogenázy. VanA ligáza pak spojí D-Ala-D-Lac. Hostitelské enzymy poté připojí D-Ala-D-Lac na prekurzor tripeptidu, vzniká nízko afinitní pentapeptidový prekurzor.

Plná rezistence ke glykopeptidům však kromě změněného prekurzoru vyžaduje také odstranění normálních prekurzorů. VanX hydrolyzuje D-Ala-D-Ala na základní aminokyseliny a umožňují tak D-Ala-D-Lac být jediným substrátem pro syntézu buněčné stěny. VanY hydrolyzuje D-Ala z jakéhokoliv běžného pentapeptidového prekurzoru, čímž ho činí nepoužitelným pro konstrukci normální buněčné stěny. Mechanismus, kterým přispívá VanZ k rezistenci je neznámý, ale pokud je přítomen, vykazuje mikroorganismus sníženou citlivost na teicoplanin. Další otevřené čtecí rámce VanV a VanW, byly popsány na operonu VanB, avšak jejich funkce jsou dosud neznámé (Riberio a kol., 2011).

Expresí genů pro VanA, H, X, Y a Z jsou regulovány VanR (regulátor reakce) a VanS (senzor kinázy) dvousložkovým regulačním systémem, který je součástí operonu VanA v rámci *Tn1546*. Zatímco nejsou specifické regulační faktory známy, přítomnost glykopeptidů, nebo narušení prekurzorů buněčné stěny těmito látkami způsobí autofosforylaci VanS. Aktivované VanS následně fosforyluje VanR. Fosforylovaný VanR zvyšuje transkripci VanH, A, X, Y a Z prostřednictvím interakce se specifickými promotorovými oblastmi. VanR také interaguje s vlastní promotorovou oblastí, rozšiřováním transkripce VanR a VanS. (Arthur a kol., 1992; Eliopoulos a kol., 2001; Gold, 2001; Hollenbeck a Rice, 2012; Reynolds a kol., 1994).

**Tabulka 1 Typy rezistence ke glykopeptidům**

Fenotyp rezistence ke glykopeptidům	Mikroorganismus	Lokalizace genu	Geny <i>van</i> ligázy	Transkripce genu	C-terminální modifikace	Konjugativní přenos
VanA	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. avium</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. durans</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. hirae</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. raffinosus</i>	Plazmid, Chromozom	<i>vanA</i>	indukovatelná	D-Ala-D-Lac	Ano
VanB	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. durans</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. hirae</i>	Plazmid, Chromozom	<i>vanB1-B3</i>	Indukovatelná	D-Ala-D-Lac	Ano
VanC	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavesceus</i>	Chromozom	<i>vanC1-C3</i>	Konstitutivní	D-Ala-D-D-Ser	Ne
VanD	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. avium</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. raffinosus</i>	Chromozom	<i>vanD1-5</i>	Konstitutivní	D-Ala-D-Lac	Ne
VanE	<i>E. faecalis</i>	Chromozom	<i>vanE</i>	Indukovatelná	D-Ala-D-Ser	Ne
VanG	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	Chromozom	<i>vanG1-2</i>	Indukovatelná	D-Ala-D-Ser	Ano
VanL	<i>E. faecalis</i>	Chromozom	<i>vanL</i>	Indukovatelná	D-Ala-D-Ser	Ne
VanM	<i>E. faecium</i>	Plazmid, Chromozom	<i>vanM</i>	Indukovatelná	D-Ala-D-Lac	Ano
VanN	<i>E. faecium</i>	Chromozom	<i>vanN</i>	konstitutivní	D-Ala-D-Ser	ano

### 3.4 Mobilní genetické elementy

Jako mobilní genetické elementy (MGE) jsou obvykle označovány segmenty DNA, které kódují enzymy a proteiny zodpovědné za vlastní přenos a integraci do hostitelské DNA. Šíří se jak v rámci jednoho druhu bakterie, tak i mezidruhově a díky tomu umožňují adaptaci na nejrůznější podmínky a poskytují tak obrovskou genetickou variabilitu prokaryot (Malachowa a Deleo, 2010).

Mobilní genetické elementy jsou centrálními aktéry v mobilizaci a reorganizaci genů, ať už v rámci daného genomu (intracelulární mobilita) nebo mezi bakteriálními buňkami (intercelulární mobilita). MGE jsou definované sekvencí DNA s velmi proměnnou délkou (od 1 do několika set kb), které často nesou funkci, jež řídí jejich přenos a rekombinaci s hostitelským genomem. MGE jsou nyní vnímány jako klíčoví hráči v reorganizaci genetického materiálu, což v kombinaci s mutacemi a selekcí, vede k evoluci bakterií (Leplae a kol., 2004).

Horizontální přenos genů z jedné bakteriální buňky do druhé, je zprostředkován mobilními genetickými elementy, jako jsou plazmidy, transpozony, inzerční sekvence (IS), integrony s genovými kazetami, mobilní genetické ostrovy, nebo genomy bakteriofágů. Soubor těchto MGE v rámci jedné buňky, je definován jako mobilom. (Bennett, 2008; Hacker a Carniel, 2001; Seifert, 2009).

#### 3.4.1 Transpozony

Termín transpozon (TEs, z angl. **T**ransposable **e**lements) označuje prvky, které obsahují další geny, související s transpoziční funkcí. Jedná se o sekvence DNA, které se mohou pohybovat nejen mezi dvěma plazmidy, ale také z plazmidu do chromozomu a naopak. DNA TEs mohou inaktivovat nebo změnit expresi genů inzerce v rámci integronů. Kromě toho se mohou TEs podílet na reorganizaci genomu mobilizací non-transpozomální DNA. To vysvětluje rychlý vývoj plazmidů nesoucích geny rezistence, ale také plazmidů, které nesou jiné geny. TEs byly objeveny ve všech organismech a mohou zabírat velkou část v genomu druhu (Dale a Park, 2004; Muñoz-López a García-Pérez, 2010).

### **Enterokokové transpozony**

Enterokokové transpozony udělují mobilitu široké škále genů, které ovlivňují různé fenotypy, jako je virulence, schopnost adaptability v prostředí a komunikaci buněk mezi sebou.

Enterokokové transpozony lze obecně rozdělit do tří základních skupin:

- kompozitní transpozony
- rodina transpozonů Tn3
- konjugativní transpozony (Kristich a kol., 2014)

#### 3.4.1.1 Kompozitní transpozony

Jedná se o prvky, jímž mobilitu udělují doprovodné inserční sekvence (IS z angl. Insertion sequences). Kompozitní transpozony jsou na svých koncích ohraničeny opačně orientovanými elementy IS, které poskytují transpononu invertované repetice. Různé transpozony se mohou navzájem vnořovat a vznikají tak velmi složité struktury. Nejčastěji se vyskytující kompozitní transponon v enterokokových izolátech, je transponon typu Tn5281. Tento transponon kóduje rezistenci ke všem aminoglykosidům (kromě streptomycinu) (Hong a kol., 2008; Roberts et al., 2008).

Dalšími zástupci této skupiny transpozonů jsou:

- Tn1547, který uděluje mobilitu genu *vanB*, glykopeptid-rezistentních determinant v *E. faecalis*. Tento element, o velikosti 64kbp vděčí za svou mobilitu doprovodným kopiím IS16 a derivátům elementů IS256 (Kristich a kol., 2014).
- Tn5385 kompozitní prvek odpovědný za multirezistenci byl identifikován v *E. faecalis*. Tn5385 (65kbp) je mobilní element, jehož konce jsou složeny s přímo opakujícími se kopiemi IS1216 (Kristich a kol., 2014).
- Tn4001 – zajišťuje rezistenci ke gentamicinu (Kristich a kol., 2014).

#### 3.4.1.2 Rodina transpozonů Tn3

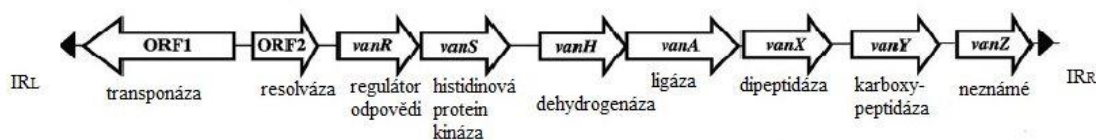
Rodina transpozonů Tn3 tvoří rozsáhlou a pozoruhodně homogenní skupinu bakteriálních transpozonů pokud jde o transpoziční funkci a extrémně univerzální systém pro zprostředkování genového přeskupení a genomové plasticity vzhledem ke své modulární organizaci. Výrazně přispívají k šíření antibiotické rezistence nebo dotují environmentální bakterie o nové katabolické kapacity (Nicolas a kol, 2015).

První zástupce této rodiny transpozonů v izolátech enterokoků byl Tn917. Jedná se o 5kbp velký element, který zajišťuje rezistenci k makrolidům, linkosamidům a streptograminu B prostřednictvím genu *ermB* (Shaw a Clewell, 1985).

Dalším zástupci této rodiny transpozonů:

- Tn552 (stafylokokový  $\beta$ -laktamázový transpozon)– jen velmi zřídka identifikovaný u enterokoků. Exprese  $\beta$ -laktamáz je indukovatelná u stafylokoků vystaveným penicilinu a dalším  $\beta$ -laktamovým antibiotikům. Ve většině izolátů enterokoků, které produkovaly  $\beta$ -laktamázy, byly nalezeny regulační geny v protisměru od strukturního genu  $\beta$ -laktamáz, což naznačuje, že exprese regulačních genů může snižovat fitness těchto enterokokových izolátů (Kritich a kol., 2014).
- Tn1546 – transpozon, který má pravděpodobně největší vliv na řízení enterokokových infekcí. Tn1546 je 10851 bp velký element, které kóduje operon VanA rezistence na glykopeptidová antibiotika. Tn1546 je kódovaný devíti polypeptidy podílejícími se na regulaci rezistence, samotném mechanismu rezistence a transpoziční funkce Tn1546 (Arthur a kol., 1993; Simjee a kol., 2002). Základní struktura viz obrázek č. 3

**Obrázek 3 Základní struktura Tn1546 (Arthur a kol., 1993).**



### 3.4.1.3 Rodina konjugativních transpozonů

Konjugativní transpozony se přesouvají, od chromozomu donoru na chromozom recipienta. Tento postup vyžaduje mezibuněčný kontakt. V příjemci pak integrují na totožné místo, ve kterém se nacházeli u dárce a jsou schopny samostatné replikace. Mechanismus přenosu spočívá v tom, že transpozon je výjmut z chromozomů pomocí enzymů Int a Xis a cirkulován. Cirkulace umožní expresi genů *tra* z promotoru P. Z místa *oriT* je zahájen přenos ve formě jednořetězcové DNA. V recipientní buňce se přenesená DNA cirkularizuje, doplní

se druhý řetězec a transpozon se integruje do chromozomu. Výsledek jejich transpozice je považován za konzervativní (Celli a Trieu-Cuot, 1998; Freitas, 2011).

Jako první enterokokový kojnugativní transpozon byl popsán Tn916 (18kb), který zajišťuje rezistenci k tetracyklinu a minocyklinu, prostřednictvím genu *tet(M)* (Friedman a kol., 2006).

Dalším zástupci této rodiny transpozonů:

- Tn5382 (30kb), kóduje *vanB* operon odpovídající za glykopeptidovou rezistenci. Je schopen přenášet mezi enterokokovými kmeny velké segmenty chromozomální DNA (Gavalda a kol., 2007).

### 3.4.2 Inzerční sekvence (IS)

IS jsou krátké úseky DNA (<2,5kb), které jsou schopné samostatné transpozice v rámci genomu. Díky své malé velikosti jsou schopny zajistit pouze svou vlastní mobilitu. Nesou pouze gen, který kóduje jejich transponázu a žádné další geny. Gen transponázy je ohraničen z obou stran krátkými úseky, zvanými invertované repetice. Tato místa jsou rozpoznávána transponázou, která se skládá ze dvou domén. 1. doména funguje jako štěpné místo, 2. doména jako vazebné místo. Díky transponáze mají schopnost se intracelulárně pohybovat a začleňovat se do hostitelských molekul DNA mechanismem zvaným transpozice. Transponáza rozezná obrácené repetice, které se vyskytují na koncích IS, rozpozná cílové místo sekvence, do kterých se IS element vkládá a nakonec po uskutečnění transpozice spojuje cílové sekvence s vloženým elementem. IS elementy často ovlivňují expresi genů (Hrabák a kol., 2010; Mahillon a Chandler., 1998; Synder a Champness, 2007).

### 3.4.3 Integrony a genové kazety

Integrony jsou genetické elementy, které jsou schopny získat a uspořádat otevřené čtecí rámce (ORF, z angl. **O**pen **R**eadin**G** **F**rames) uložené v genových kazetách a převést je na funkční geny prostřednictvím jejich správné exprese (Cambray a kol., 2010).

Genové kazety jsou definovány jako malé mobilní jednotky o velikosti 500-1000bp. Volně se vyskytují ve formě cirkulární DNA v cytoplazmě buněk (Bennett, 1999; Collins a Hall, 1992).



#### **3.4.4 Mobilní genetické ostrovy/ostrůvky**

MGI představují významnou součást horizontálního přenosu genů. MGI jsou oddělené segmenty DNA o velikosti 10 až 100kb, začleněné v hostitelském chromozomu, od jejíž DNA jsou odlišitelné procentuálním zastoupením C+G (Hacker a Carniel, 2001; Juhas a kol., 2009). Jejich struktura může být velmi rozmanitá, všechny jsou však ohraničeny přímými repeticemi, které představují rekombinační místo pro integraci do hostitelského chromozomu (Hacker a Carniel, 2001).

Kódovací kapacita MGI se neomezuje pouze na patogenní funkci, ale může být velmi rozmanitá, včetně takových vlastností, jako je symbióza, metabolismus sacharózy a aromatických sloučenin, či rezistence ke rtuti (Gaillard a kol., 2006; Larbig a kol., 2002; Sullivat a kol., 2002).

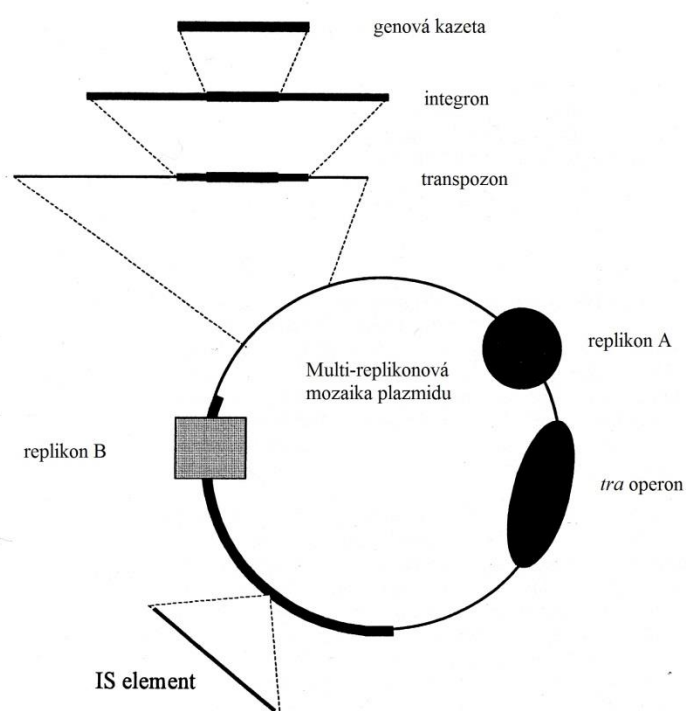
### 3.4.5 Plazmidy

Plazmidy jsou extrachromozomální semi-autonomně se replikující genetické elementy, které nalezneme ve všech třech doménách: archea, prokaryota, eukaryota.

Plazmidy bakterií jsou zásadně tvořeny cirkulární dsDNA, i když existuje i několik příkladů lineárních plazmidů. Velikost se pohybuje v délce asi  $5 \cdot 10^3 - 7,5 \cdot 10^5$  nukleotidů

(Bednář a kol., 1996; Hegstad a kol., 2010; Norman a kol., 2009).

Jejich modulární struktura obsahuje geny kódující konstantní oblasti, které zahrnují základní funkce (replikace, konjugace). A variabilní oblasti obsahující proměnné sady genů nebo genových klastrů, které kódují adaptivní funkce (např. antibiotickou rezistenci, rezistenci k těžkým kovům, rezistenci k záření, virulenci, produkci bakteriocinů, metabolické nebo symbiotické funkce) (Freitas, 2011).



**Obrázek 4 Zjednodušený model popisující mozaikovou strukturu cirkulárního plazmidu (Osborn a kol., 2000).**

Termín „plazmid“ byl zaveden na konci roku 1952 Lederbergem, který také jako první popsal proces konjugace, dlouho před tím, než byla známa struktura plazmidu (Lederberg, 1952; Norman a kol., 2009).

Od roku 1976 se plazmidy označují zkratkou složenou z malého písmena p a obvykle dvou velkých písmen (podle iniciálu objevitele, ústavu, apod.) – a číslem (např. pCV9, pIE321) (Bednář a kol., 1996).

Nejdůležitějším charakteristickým rysem plazmidů je jejich separace od chromozomu, a tím i jejich schopnost se autonomně replikovat (Norman a kol., 2009).

Druhá, a možná nejznámější vlastnost konjugačních plazmidů, je jejich schopnost horizontálního přenosu genů konjugací. Tato schopnost poskytuje plazmidům řadu selektivních výhod, jako je např. nezávislost na replikaci hostitelské buňky a také se nabízí velké množství alternativních hostitelů v heterogenní populaci (Norman a kol., 2009; Zechner a kol., 2000).

Klasifikace plazmidů byla provedena na základě různých kritérií, jako jsou: mechanismus replikace, rozsah hostitelů a mobilita (Freitas, 2011).

Dle mobility lze plazmidy charakterizovat jako konjugativní, mobilizovatelné nebo nemobilizovatelné. Nástroj mobility obsahuje sadu mobilních genů, které se nazývají relaxozomy. Ty umožňují konjugaci DNA. Relaxozomy obsahují počátek přenosu *oriT* a relaxázu, která je klíčovým katalyzujícím enzymem v inicializační a finální fáze konjugace. Konjugativní plazmidy bývají velké (>30kb) s nízkým počtem kopií. Mobilizovatelné plazmidy jsou menší a s velkým počtem kopií. Nemobilizovatelné plazmidy se šíří přirozeně transformací či transdukcí. Nebyly popsány mezi enterokoky *in vivo* (Llosa a kol., 2002; Smillie a kol., 2010).

Mnohé plazmidy jsou replikovány jako dvouřetězcové kruhové molekuly. Celkový obraz replikace plazmidů je v zásadě podobný tomu na chromozomu. Replikace začíná v pevném bodě, známém jako *oriV* (označení *V* popisuje vegetativní replikaci, aby došlo k odlišení od bodu *oriT*, což značí počátek konjugace) tvořeným specifickými sekvencemi nukleotidů. Replikace pokračuje od tohoto bodu (*oriV*), a to buď v jednom směru, nebo v obou směrech současně, dokud není celý kruh zkopírovaný (Dale a Park, 2004; Solar a kol., 1998).

Existují tři základní mechanismy replikace pro cirkulární plazmidy:

- Mechanismus valivé kružnice (rolling circle; RC): rodina pRII-like
- mechanismus typu theta: rodiny: rodina RepA\_N, Inc18, pHT $\beta$ -like

- mechanismus s vytěšňováním řetězce (Solar a kol., 1998)

#### 3.4.5.1 RC replikace

Replikací mechanismem RC (RCR, z angl. **R**olling-**c**ircle **r**eplicating) se vyznačují zejména malé (<10kb) plazmidy s velkým počtem kopií, schopných replikovat se v široké škále gram-pozitivních a gram-negativních bakterií.

Tento druh replikace musí být jednosměrný. Tento proces je považován za asymetrický, protože syntéza vedoucího vlákna a syntéza opoždujícího se vlákna, jsou odpojeny (Khan, 1997; Solar, 1998).

K replikaci je potřebný, kromě buněčného enzymatického aparátu, replikační protein (Rep), který je nesený samotným plazmidem. Rep rozpozná tzv. dvouvláknový počátek (= dso z angl. **D**ouble-**s**tranded **o**rigin), pomocí dvou aktivních míst s tyrozinovými zbytky, které se nachází na všech Rep. Dso na plazmidu obsahuje dva oddělené sekvenční prvky. Jeden, který je potřebný pro sekvenčně specifickou vazbu Rep. Druhý sekvenční prvek obsahuje místo pro vytvoření zlomu. Rep se skládá ze dvou domén. DNA-vázající domény, která se specificky váže na jeho kognát (= „příbuzenský původ“) a z domény zlomu, která obsahuje aktivní tyrozinová místa. Vazba Rep k plazmidové DNA způsobí konformační změnu v dso, které vytvoří jednořetězcový zlom (jako ssDNA). To je důležité, protože doména Rep tvořící zlom neumí rozpoznat dsDNA. Místo aktivního tyrozinu je kovalentně připojeno k 5' nukleotidu. Takto připojen zůstane, dokud není cyklus replikace kompletní (Clewel a kol., 2014; Khan, 1997; Solar, 1998).

Vzniklý 3'OH konec se využívá jako základní primer pro syntézu vedoucího vlákna. Vytvoření zlomu, k vygenerování primeru pro syntézu vedoucího vlákna, je přísně regulováno, a dochází k tomu pouze tehdy, pokud byly ke konci připojeny odpovídající proteiny pro replikaci. To s největší pravděpodobností spočívá v příjmu hostitelských replikačních proteinů, jako jsou DNA helikáza, ssDNA vazebné proteiny a DNA polymeráza III. Po jednom kole replikace, syntéza procházející počátkem, obnoví kopii dso. Zlomové místo reakce, katalyzované navázaným Rep, ukončí replikaci, což má za následek uvolnění zcela replikované zdvojené kopie plasmidu a posunutí vlákna ssDNA. Replikace posunutého vlákna probíhá z počátku, který je odlišný od toho dso a nazývá se jako tzv. jednovláknový počátek (= sso z angl. **S**ingle-**s**trand **o**rigin). Jedná se o nedokonalé palindromy, které jsou rozpoznány hostitelskou RNA polymerázou, která syntetizuje krátký RNA primer. Hostitelská DNA polymeráza I iniciuje syntézu DNA z primeru a nakonec je vytěšněna DNA

polymerázou III, která doplňuje syntézu komplementárního vlákna (Clewel a kol., 2014; Khan, 1997; Solar, 1998).

Syntéza Rep je u plazmidů s replikačním mechanismem RC regulována regulační RNA, která je transkribována z protilehlého řetězce na 5'konci iniciačního genu. Tato ctRNA (= z angl. countertranscribed RNA) se váže k Rep v komplementární oblasti, kde buď způsobí opětovnou cirkularizaci s výsledkem předčasného ukončení transkripce, nebo interferuje přímo s vazbou na ribozom. Protože je ctRNA nestabilní, její hladina v buňce vždy odráží počet plazmidových kopií (Clewel, a kol., 2014).

Nejčastější, přirozeně se vyskytující plazmidy, replikující se mechanismem RC, jsou menší než 10kb, pravděpodobně proto, že u větších velikostí by byla větší pravděpodobnost výskytu částečně homologních sekvencí, které by vedly k rekombinaci a deleci během replikační fáze ssDNA. Klonování velkých fragmentů DNA, fragmentů s opakujícími se sekvencemi, nebo fragmentu, které nesou geny toxicity pro hostitele, je zvláště problematické (Clewel, a kol., 2014; Venkova-Canova a kol., 2003).

#### 3.4.5.2 Theta replikace

Replikace mechanismem typu theta je nejčastějším typem replikace u bakterií. Tento typ byl však také popsán u plazmidů izolovaných z gram-pozitivních bakterií, jako jsou streptokok/ enterokok skupiny Inc18, *Bacillus subtilis*. Replikace DNA prostřednictvím theta mechanismu zahrnuje rozdělení mateřských vláken, syntézu primerem RNA (pRNA) a zahájení syntézy DNA kovalentním prodloužením pRNA. Replikace probíhá obousměrně s dvěma replikačními vidlicemi a syntéza DNA je kontinuální na jednom z vláken (vlákno vedoucí) a diskontinuální na druhém (opožďující se vlákno) (Kornberg a Baker, 1992; Solar, 1998).

Enterokokové plazmidy, replikující se theta mechanismem, tvoří:

- malé (cca<15 kb) mobilizovatelné plazmidy, které jsou většinou kryptické a nekódují konjugativní funkce
- velké (>30 kb) konjugativní plazmidy, které mohou kódovat širokou rozmanitost adaptivních funkcí, jako je např. rezistence vůči antibiotikům, biocidům, kovům, metabolické funkce a virulentní vlastnosti (Feritas, 2011).

Pod elektronovým mikroskopem se struktura po naštěpení vlákna na dvou místech *oriV* jeví jako řecké písmeno  $\theta$  („théta“) odtud název theta (Kornberg a Baker, 1992; Snyder a Champness, 2007; Solar, 1998).

Malé theta-replikující se plazmidy

Tato skupina plazmidů o velikosti <15 kb jsou stále častěji pozorovány mezi enterokoky. I když jsou mnohé z nich kryptické, jsou často spojovány s produkcí bakteriocinů, které vykazují rozmanitou aktivitu oproti gram-pozitivním rodům včetně jiným zástupcům rodu *Enterococcus*. Enterokoky s produkcí bakteriocinu byly izolovány z různých prostředí, jako jsou potraviny, zvířata, lidé (Feritas, 2011).

Replikační proteiny těchto plazmidů jsou velmi podobné plazmidům jiných gram-pozitivních bakterií, které se replikují mechanismem theta (patřící do rodiny pUCL287 z bakterií mléčného kvašení). Mohou však obsahovat mobilizační systémy běžně související s plazmidy, které se replikují mechanismem RC (MOBV) nebo s plazmidy, které se replikují mechanismem theta (MOBP).

Tyto plazmidy byly izolovány z enterokokových izolátů získaných od hospitalizovaných pacientů, zvířat (prasata, krávy), mléka, sýrů a fermentovaných masných výrobků.

**Tabulka 2 Malé theta-replikující se plazmidy (převzato od Clewel a kol., 2014)**

Rodina plazmidu	plazmid	Velikost (kb)	Původní hostitel	Původ <sup>1</sup>	Oblast hostitelů	Genetické markery
Malé theta-replikující se plazmidy (Rep_3)	pCIZ2	7,4	<i>E. faecium</i> L50	F (klobása, kuřecí maso), H	<i>E. faecium</i>	kryptický
	p200B	12,5	<i>E. faecium</i>	HH	<i>E. faecium</i>	Bac 32(tedy enterocin IT)
	pHY	6,037	<i>E. faecium</i>	HH	<i>E. faecium</i>	Bac51
	pB82	6,2	<i>E. faecium</i> VR82	H, F (kuře), SW	<i>E. faecium</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. durans</i>	Bac43
	pEF1071	9,3	<i>E. faecalis</i> BFE1071	A (prase)	<i>E. faecalis</i>	Bakteriociny (1071A a 1071B)
	Plazmid	>3,2	<i>E. faecalis</i> FAIR-E309	F (sýr)	<i>E. faecalis</i>	Bakteriocin
	pGL (pDGL)	8,3	<i>E. durans</i> 41D	F (sýr)	<i>E. durans</i>	Bakteriocin
	pEFR	3,2	<i>E. faecium</i>	NA	<i>E. faecium</i>	Kryptický
	pAMα1	9,8	<i>E. faecalis</i> DS5	H	<i>E. faecalis</i>	<i>tet(L)</i>
	pS86	5,1	<i>E. faecalis</i> S-86	H	<i>E. faecalis</i>	kryptický
	pEF47	5,5	<i>E. faecalis</i> 47	A (kráva)	<i>E. faecalis</i> , jiní gram-pozitivní	kryptický
	p703/5	NA	<i>E. faecalis</i> KBL703	F (mléko)	<i>E. faecalis</i>	NA
	pEF418	>15,9	<i>E. faecalis</i> 418	HH	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	<i>aadE</i>
	EF62pA	5,1	<i>E. faecalis</i> 62	HH	<i>E. faecalis</i>	Kryptický
	pJS33	3,1	<i>E. faecium</i> JH95	NA	<i>E. faecium</i>	Kryptický
pMBB1	>1,9	<i>E. faecium</i>	NI	<i>E. faecium</i>	Kryptický	

## Rodina plazmidů Inc18

<sup>1</sup> H (z angl. Hospital) – kmen z nemocnice; HH (healthy humans) – zdraví lidé; HHc (helathy humans – children) – zdraví lidé-děti; A (animals) – farmová zvířata; WA (wild animals) – divoká zvířata; F (foods) – jídlo; P (pets) – domácí zvířata; SW (sewage) – z čistíčky odpadních vod; NA (Not available) – není k dispozici; NI (Not identified) - neidentifikováno

Jedná se o rodinu plazmidů s nízkým počtem kopií, jež vykazuje velmi široký rozsah významných zástupců. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí od 25 až po 50 kb. Jsou přenositelné mezi bakteriálními buňkami při růstu hlavně na pevném médiu nejsou citlivé na feromony (Horaud a kol., 1985; Jannière a kol., 1993)

Reprezentativními enterokokovými plazmidy této rodiny jsou plazmidy *E. faecalis* pAMβ1 (28kb) a pRE25 (50kb) a konjugativní determinanty, podobající se plazmidům *S. agalactiae*, pLP501 (30 kb) (Grohmann a kol., 2003)

Tyto plazmidy nesou více genů antibakteriální rezistence, včetně genů způsobující rezistenci na makrolidy, linkosamidy a streptogramin B (MLS) v důsledku přítomnosti různých transpozonů nebo genetických ostrovů a mohou být předány širokému spektru bakterií (streptokokům, laktokokům, stafylokokům a enterokokům). Plazmidy Inc18 jsou často spojovány s šířením transpozonu Tn1546-*vanA* mezi enterokoky různého původu (Feritas, 2011; Zhu a kol., 2010).

Paradigmatem této rodiny je plazmid pMS19035, který se skládá ze dvou identických částí, z nichž každá obsahuje modul účastnící se replikace. Oblast SegA se účastní na oligomerovém rozlišení plazmidu (= přepočet oligomerních forem do monomerních), oblast SegB zajišťuje „lepší než náhodnou“ distribuci plazmidu pSM19035, zahrnuje geny  $\delta$ ,  $\omega$ ,  $\epsilon$  a  $\zeta$ . Protein  $\delta$  sdílí vysoký stupeň homologie s rodinou ATPáz podílejících se na rozdělení různých bakteriálních plazmidů a bakteriálních chromozomů. Naproti tomu genové produkty  $\epsilon$  a  $\zeta$  zabraňují výskytu volných plazmidových segregantů. Genový produkt  $\omega$  představuje prvek, který se podílí na replikaci pSM19035. Tento  $\omega$  protein blokuje transkripci z genů *copS* a  $\delta$ . Dále bylo zjištěno, že  $\omega$  protein je negativní regulátor spojující řízenou kopii plazmidu k „lepší než náhodné“ segregaci (de la Hoz a kol., 2000; Feritas, 2011).

Velikost a základní skelet plazmidů Inc18 je vysoce variabilní v důsledku, jak akvizice DNA (inzertní sekvence, transpozony, genetické ostrovy) ale také ztrátám DNA, u kterých se zdá, že se vyskytují u spontánní delece po konjugačním transferu do různých hostitelů (Thompson a Collins, 2003; Zuniga a kol, 2003).

Plazmidy rodiny Inc18 jsou replikovány unikátním antitenzním-RNA-zprostředkovaným mechanismem tlumícím transkripci. Tento mechanismus dosud nebyl identifikován v gram-negativních bakteriích (Feritas, 2011).

Relaxáza je prototypem subtypu MobQ3 v rámci MOBQ rodiny, kterou obsahuje pouze kmen Firmicutes. Je to právě relaxáza, kdy při vazbě k *oriT* potlačuje expresi operonu



tra (ten je potřebný pro non-sexuální přenos genetického materiálu) (Garcillán-Barcia a kol., 2009).

**Tabulka1 Inc18 plazmidy (převzato od Clewel a kol., 2014)**

Rodina plazmidu	plazmid	Velikost (kb)	Původní hostitel	Původ	Oblast hostitelů	Genetické markery
Inc18	pIP501	30,6	<i>S. agalactiae</i> B96	H, A, SW	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	<i>cat</i> , <i>erm(B)</i>
	pRE25	50,2	<i>E. faecalis</i> RE25	F (klobása, kuřecí maso), H, HH, A (prase, drůbež), SW	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	<i>cat</i> , <i>erm(B)</i> , <i>sat4</i> , <i>aph(3')-III</i> , <i>aadK</i>
	pAMβ1	27,8	<i>E. faecalis</i> DS5	H	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	<i>erm(B)</i>
	pTEF3	17,9	<i>E. faecalis</i> V583	H	<i>E. faecalis</i>	<i>UV</i>
	pEF-01	35,9	<i>E. faecalis</i> EF-01	A (skot)	<i>E. faecalis</i>	<i>cfr fex(B)</i>
	pEH-1	>18,1	<i>E. hirae</i>	A (prase)	<i>E. hirae</i>	<i>fex(B)</i>
	pEFM-1	14,8	<i>E. faecium</i>	A (prase)	<i>E. faecium</i>	<i>fex(B)</i>
	pPPM1000	MD	<i>E. faecium</i>	A (opice)	neznámý	Sm, Hg
	pM7M2	19,5	<i>E. faecium</i>	F (sýr)	<i>E. faecium</i> , <i>S. mutans</i>	<i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i>
	pIP816	34,6	<i>E. faecium</i> BM4147	H	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i> , <i>str</i>
	pVEF1	39,6	<i>E. faecium</i> 399/F99/H8	HH, F (kuřecí maso), A (drůbež)	<i>E. faecium</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. durans</i>	Tn1546( <i>vanA</i> )
	pVEF2	39,7	<i>E. faecium</i> 399/F99/A9	F (kuřecí maso), A (drůbež)	<i>E. faecium</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. durans</i>	Tn1546( <i>vanA</i> )
	pVEF3	63,1	<i>E. faecium</i> 399/S99/A7	A (drůbež)	<i>E. faecium</i>	Tn1546( <i>vanA</i> )
	pVEF4	>44	<i>E. faecium</i> 399/F98/A4	A (drůbež)	<i>E. faecium</i>	Tn1546( <i>vanA</i> )
	pWZ1668	48,3	<i>E. faecalis</i>	HH	<i>E. faecalis</i>	Tn1546( <i>vanA</i> )
pWZ909	42,6	<i>E. faecalis</i>	HH	<i>E. faecalis</i>	Tn1546( <i>vanA</i> )	
pWZ7140	47,2	<i>E. faecalis</i>	HH	<i>E.</i>	Tn1546( <i>vanA</i> )	

					<i>faecalis</i>	
pEF1	21,3	<i>E. faecium</i> 6T1a	F (olivy), H, HH, F (kuřecí maso), A (prase), SW	<i>E.</i> <i>faecium</i>	<i>uvrA</i>	
pLG2	62,6	<i>E. faecalis</i> UW3114	H	<i>E.</i> <i>faecalis</i>	<i>ant(6)-Ia, sat,</i> <i>aph(3')-IIIa,</i> <i>tet(M)</i>	
pHTβ	52,9	<i>E. faecium</i> <i>FH</i>	H, HH, F (kuřecí maso)	<i>E.</i> <i>faecium,</i> <i>E. avium,</i> <i>E. durans</i>	Tn1546(vanA)	
pMG1 a úzce související plazmidy	65	<i>E. faecium</i>	H, HH, F (kuřecí maso)	<i>E.</i> <i>faecium,</i> <i>E. durans</i>	Tn4001, Tn1546	
pZB18	68	<i>E. faecium</i>	H	<i>E.</i> <i>faecium</i>	Tn1546(vanA)	

### Rodina plazmidů RepA\_N

Rodina RepA\_N plazmidů zahrnuje plazmidové rodiny široké diverzity s omezenou škálou nativních hostitelů. RepA proteiny z rodiny plazmidů RepA\_N spadají do pěti velkých klasterů (*Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* a *Staphylococcus*) (Weaver a kol, 2009)

Feromon-citlivé, konjugující plazmidy *E. faecalis*, deriváty plazmidů pRUM a pLG *E. faecium* a multirezistentní plazmidy pSK1 a pSK41 *S. aureus* patří mezi nejvíce prostudované plazmidy gram-pozitivních bakterií. Vyhledávání homologů ukazuje, že jsou tyto replikony zástupci velké rodiny plazmidů a několika fágů, které jsou rozšířeny mezi tzv „low G+C“ gram-pozitivními bakteriemi (jejich DNA má obvykle méně G a C bází DNA než A a T bází ve srovnání s jinými bakteriemi) (Laverde Gomez a kol., 2011; Weaver a kol.2009).

### Feromon-citlivé plazmidy

V systémech pro přenos DNA prostřednictvím feromon-citlivých plazmidů, je kontakt mezi dárcem a příjemce zprostředkován přes sofistikovaný, pevně řízený systém, založený na malých peptidech (7-8 aminokyselin), tzv. pohlavních feromonech, které jsou vylučovány potenciálními plazmidovými příjemci. V mnoha kmenech *E. faecalis* jsou přítomné, na feromon-reagující, plazmidy pAD1 a pCF10 (Goessweiner-Mohr a kol., 2014).

Feromony jsou chromozomálně kódovány, zatímco genetické determinanty pro detekci signálu se nachází na pohlavních feromonech plazmidu. Tento konjugační mechanismus je vysoce specifický, protože každý plazmid reaguje pouze na specifický feromon (Clewell a Francia, 2004; Kozłowicz a kol., 2006).

Mezi nejčastější rodiny plazmidů patří pAD1, pCF10, pPD1 a aAm373. Tyto plazmidy jsou převážně izolovány od pacientů s nozokomiální infekcí a kódují rezistenci na antibiotika (Tn1546\_vanA, Tn1549\_vanB2, Tn4001\_aac6'-aph2', Tn916-like\_tet(M)) a nebo znaky virulence (produkce bakteriocinů a cytolyzinů) (Feritas, 2011).

Mezi feromon-citlivými plazmidy a plazmidy pRUM a pLG1, byly identifikovány dvě, fylogeneticky vzdálené rodiny relaxáz MobC2 a MobP7 (Garcillán-Barcia a kol., 2009). Deriváty pAD1 mohou také obsahovat jedinečný antisenzně-regulovatelný toxin-antitoxinový systémový pár, který zajišťuje jejich stabilní „dědictví“ v rámci buněk *E. faecalis*. Lokus je kódován plazmidem aAD1, ale příbuzné lokusy byly identifikovány i na jiných plazmiden *E. faecalis* (např. pCF10, pTEF2, pAM373, pAMS1, pMG2200) a chromozomech (*E. faecalis* V5383) (Feritas, 2011).

#### Deriváty plazmidů pRUM

Plazmid pRUM (24 873bp) je odpovědný za multirezistenci některých izolátů *E. faecium* (rezistence na chloramfenikol, erythromycin, streptomycin a streptothricin). Klinické izoláty, ze kterých pochází deriváty plazmidů pRUM (60 kb velké plazmidy), kódují rezistenci k vankomycinu (Gardy a Hayes, 2003).

Deriváty plazmidů pRUM (jako pRUM, p5373c, pS177 nebo pDO2) jsou mozaikové plazmidy různé velikosti (30 až 60kb). Skládají se ze sekvence fragmentů z MGE různého původu (inzerční sekvence, malé theta-replikující se plazmidy, bakteriocinní klastry). Členové této skupiny se liší v sekvenci RepA\_N, mobilizačním systému a přítomnosti toxin-antitoxin Axe-Txe lokusu. Vankomycin nebo tetracyklin rezistentní izoláty od lidí a drůbeže často sebou nesou deriváty pRUM plazmidů, někdy nesoucí transpozon Tn1546 (Freitas a kol., 2013; Freitas a kol., 2012; Gardy a Hayes, 2003; Halvorsen a kol., 2011; Rosvoll a kol., 2010).

### RepA\_N megaplazmidy

Megaplazmidy se běžně vyskytují mezi druhy *E. faecium*, izolátů různého původu. Jediný, plně sekvenovaný megaplazmid je pLG1 (281kb) (Freitas, 2011; Laverde a kol., 2011).

Obsahuje kódující gen pro protein s podobností s RepApAD1, proto byl považován za člena RepA\_N. Relaxáza identifikována v pLG1 patří do podrodiny MOB7, do které patří i další plazmidy RepA\_N (Freitas., 2011).

### Rodina derivátů pMG1plazmidů

V roce 1998 byl identifikován plazmid pMG1 (65kb), který je nositelem rezistence ke gentamicinu (derivát transpozonu Tn4001) (Tomita a kol., 2003).

pMG1 rodina zahrnuje deriváty pHT konjugativních plazmidů, nesoucí rezistenci k vankomycinu [pHT $\alpha$  (65,9 kbp), pHT $\beta$  (63,7kbp) a pHT $\gamma$  (66,5 kbp)]. Tyto deriváty byly izolovány z kmenů *E. faecium* a jsou nositeli vankomycin-rezistentního transpozonu (Tn1546) (Tomita a kol., 2003).

Plazmidy této skupiny vzkazují vysokou homologii s virulenčním plazmidem pXO2, izolovaném z *Bacillus anthracis*, což naznačuje, že mohou mít společného předka. Nicméně ORFs (otevřené čtecí rámce, z angl. **O**pen **r**eading **f**rames) plazmidu pMG1 nevykazují významnou homologii s proteiny, kvalifikovanými jako nový typ vysoce efektivních konjugativních plazmidů. Převodní systém patří do rodiny MobP, na základě *oriT* a sekvencí relaxáz (Cooper a Heinemann, 2000; Launay a kol., 2006).

Tabulka 2 RepA\_N plazmidy (převzato od Clewel a kol., 2014)

Rodina plazmidu	plazmid	Velikost (kb)	Původní hostitel	Původ	Oblast hostitelů	Genetické markery
RepA_N	pAD1	59,3	<i>E. faecalis</i> DS16	H, F (kuřecí maso)	<i>E. faecalis</i>	<i>uvrB</i> (cAD1), Hly/cyl
	pTEF1	66,3	<i>E. faecalis</i> V583	H	<i>E. faecalis</i>	Tn4001, <i>erm(B)</i> , <i>qacZ</i> (cAD1)
	pTEF2	57,7	<i>E. faecalis</i> V583	H	<i>E. faecalis</i>	(cCF10)
	pJH2	59	<i>E. faecalis</i> JH1	H	<i>E. faecalis</i>	Hyl/bac(cAD1)
	pIP964	65	<i>E. faecalis</i>	H	<i>E. faecalis</i>	Hyl/bac (cAD1)
	pAMγ1	60	<i>E. faecalis</i> DS5	H	<i>E. faecalis</i>	Hyl/bac , <i>uvr</i> (cAD1)
	pAMγ2	~60	<i>E. faecalis</i> DS5	H	<i>E. faecalis</i>	(cAMγ2)
	pAMγ3	~60	<i>E. faecalis</i> DS5	H	<i>E. faecalis</i>	(cAMγ3)
	pBEM10	70	<i>E. faecalis</i> HH2	H	<i>E. faecalis</i>	<i>bla</i> , Tn4001 (cAD1)
	pCF10	67,7	<i>E. faecalis</i> SF-7	H, F (kuřecí maso)	<i>E. faecalis</i>	<i>tet(M)</i> -CTn925, <i>uvrA</i> (cCF10)
	pAMS1	130	<i>E. faecalis</i> MC4	HH	<i>E. faecalis</i>	(cCF10)
	pMB1	90	<i>E. faecalis</i> S-48	HH	<i>E. faecalis</i>	(cCF10)
	pMB2	56	<i>E. faecalis</i> S-48	HH	<i>E. faecalis</i>	(cPD1)
	pPD1	59	<i>E. faecalis</i> 39-5	HH	<i>E. faecalis</i>	(cPD1)
	pYI14	61	<i>E. faecalis</i> 39-5	H	<i>E. faecalis</i>	(cPD1)
	pEJ97-1	11,3	<i>E. faecalis</i> EJ97	SW	<i>E. faecalis</i>	(cPD1)
	pAM373	36,8	<i>E. faecalis</i> RC73	H, F (kuřecí maso)	<i>E. faecalis</i>	(cAM373)
	pAM368	107	<i>E. faecalis</i> 368	H	<i>E. faecalis</i>	(cAM373); Tn1546 ( <i>vanA</i> )
	pBEE99	80,6	<i>E. faecalis</i>	H	<i>E. faecalis</i>	<i>bee</i> , <i>uvr</i> (UK feromon)

			E99			
pMG2200	106,5	<i>E. faecalis</i> NKH15	H	<i>E. faecalis</i>	<i>vanB2_Tn1549</i> , <i>uvr</i> , Bac41 (cCF10)	
pMG2201	65,7	<i>E. faecalis</i> NKH15	H	<i>E. faecalis</i>	<i>ermB</i> , Hly/cyl, (cAD1)	
pAM323	66	<i>E. faecalis</i> HH2	H	<i>E. faecalis</i>	(cAM323)	
pAM324	53	<i>E. faecalis</i> HH2	H	<i>E. faecalis</i>	(cAM324)	
pHKK100	55	<i>E. faecalis</i> 228	H	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	cHKK100), Tn1546 ( <i>vanA</i> )	
pOB1	71	<i>E. faecalis</i> 5952	H	<i>E. faecalis</i>	(cOB1)	
pYI1/2	58/56	<i>E. faecalis</i>	H	<i>E. faecalis</i>	(cOB1/cYI2)	
pYI17	57,5	<i>E. faecalis</i> YI717	H	<i>E. faecalis</i>	(cYI17)	
pSL1/2	128,1	<i>E. faecalis</i> KV1	H/A (kuřecí maso/kuřata)	<i>E. faecalis</i>	(cSL1) Tn1546 ( <i>vanA</i> ), <i>ermB</i> , <i>aac(6)-aph(2)</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>aph(3')-IIIa</i>	
EF62pC	55,3	<i>E. faecalis</i> 62	HH	<i>E. faecalis</i>	<i>bac</i> , <i>uv</i>	
EF62pB	51,1	<i>E. faecalis</i> 62	HH	<i>E. faecalis</i>	<i>bac</i> , <i>uvr</i>	
pTW9	85	<i>E. faecalis</i>	H, A (drůbež)	<i>E. faecalis</i>	Tn1546 ( <i>vanA</i> ), <i>erm(B)</i> , <i>bac</i> , IS4-b- lactamase B- IS4	
pHKK703	55	<i>E. faecium</i> R7	H	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	(cCF10)	
pBRG1	50	<i>E. faecium</i> LS10	H	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	cCF10-like), Tn1546 ( <i>vanA</i> )	
pRUM	24,9	<i>E. faecium</i> U37	H, HH, F (drůbeží maso), A (prase)	<i>E. faecium</i>	<i>Cat (orf25)</i> , Tn5405, <i>erm(B)</i> , <i>uvr</i> , <i>Axe-Tse</i>	
pS177	39	<i>E. faecium</i> S177	H	<i>E. faecium</i>	Tn1546 ( <i>vanA</i> )	
p5753B	56,7	<i>E. faecium</i> 5753c	H, HH	<i>E. faecium</i>	<i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>tetM</i> , ΔTn5405, <i>erm(B)</i>	
pRUM-like	30-70	<i>E. faecium</i>	H, HH	<i>E. faecium</i>	Tn1546 ( <i>vanA</i> )	

	pLG1 pDO2 pDO3 pNB2354	281,0 66,2 251,9 214,3	<i>E. faecium</i> UW2774 <i>E. faecium</i> DO <i>E. faecium</i> DO <i>E. faecium</i> B-2354	H, HH, A (prase), F (kuřecí maso), SW H H H	<i>E. faecium</i> <i>E. faecium</i> <i>E. faecium</i> <i>E. faecium</i>	Tn1546 ( <i>vanA</i> ), <i>erm(B)</i> , <i>trYAZB</i> , <i>ctpA</i> , <i>pilA</i> , <i>aac(6')</i> <i>le-aph(2'')</i> <i>Ia</i> <i>aadE</i> , <i>sat4</i> , <i>aph2 hly</i> adhezní <i>fimH</i> Typ I RM system, různé vlastnosti, Cd, Co, Mn
	megaplazmidy	>150- 350	<i>E. faecium</i>	H, HH, A, SW	<i>E. faecium</i> , <i>E. casseliflavus</i> and <i>E. gallinarum</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i>	Tn1546 ( <i>vanA</i> ), <i>erm(B)</i> , <i>hyl</i> , <i>aac(6')</i> <i>aph(2'')</i> , <i>crYAZB</i> , metabolismus (manitol, glycerol, sorbitol, raffinose, komplex sacharidů), adhezní <i>fimH</i>

### Megaplazmidy

Do skupiny megaplazmidů spadají plazmidy (>150 kbp) obvykle spojeny s metabolickými funkcemi. Megaplazmidy se běžně vyskytují mezi rody *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Bacteroides*. Udělují těmto mikroorganismům možnost využít komplexních sacharidů z potravy, hostitelských derivátů glykoprotejnů a glykokonjugátů, které by mohly zlepšovat stálost v tlustém střevě (Freitas, 2011).

Megaplazmidy u enterokoků mohou kódovat základní funkce k přizpůsobení v různém typu prostředí. Enterokokové megaplazmidy nesou také geny zapojené do metabolismu cukrů (manitol, glycerolu, sorbitolu a rafinózy), rezistenci vůči antibiotikům (makrolidům, glykopeptidům, aminoglykosidům) a těžkým kovům (měď-trcYAZB). Dále jsou nositeli faktorů virulence, *hyl(FEM)* – glykosidové hydroláza (Freitas, 2011; Laverde a kol., 2011).

## 4 Materiál

### 4.1 Použité mikroorganismy

Izoláty bakterií *E. faecium*

Testované izoláty bakterií *E. faecium*, byly vykultivovány z trusu amerických vran. Vzorky trusu byly sesbírány z nocovišť ve Spojených státech amerických a v Kanadě. Vzorky byly individuálně odebrány v ranních hodinách z velké plastové fólie, která byla umístěna přes noc pod hřadovací místa.

**Tabulka 5** Studované izoláty *E. faecium*

Č. vzorku	Izolát	Kmen	ST	Zdroj	Místo původu	Datum odběru vzorků
8	CE343A	<i>E. faecium</i>	18	Americká vrána	USA, MA	23. 2. 2012
9	CE371	<i>E. faecium</i>	18	Americká vrána	USA, MA	23. 2. 2012
17	CE4275	<i>E. faecium</i>	448	Americká vrána	Kanada - PEI	10. 3. 2013
19	CE343B	<i>E. faecium</i>	555	Americká vrána	USA, MA	23. 2. 2012
20	CE342A	<i>E. faecium</i>	750	Americká vrána	USA, MA	23. 2. 2012
21	CE345	<i>E. faecium</i>	751	Americká vrána	USA, MA	23. 2. 2012
34	CE115	<i>E. faecium</i>	18	Americká vrána	USA, KS	23. 2. 2012
35	CE249	<i>E. faecium</i>	749	Americká vrána	USA, MA	23. 2. 2012
36	CE334A	<i>E. faecium</i>	18	Americká vrána	USA, MA	23. 2. 2012
37	CE334B	<i>E. faecium</i>	752	Americká vrána	USA, MA	23. 2. 2012
38	CE350	<i>E. faecium</i>	750	Americká vrána	USA, MA	23. 2. 2012
39	CE725A	<i>E. faecium</i>	18	Americká vrána	USA, NY	7. 3. 2012

MA = Massachusetts; KS= Kansas; NY= New York; PEI= Ostrov prince Edwarda

### 4.2 Transportní a kultivační média

- Slanetz-Bartley agar (Oxoid, Anglie)
- Kryoprotektivní médium – Glycerol 50 ml (Lachema, ČR), živný bujón 50 ml (Eurex MEDICA, ČR)
  - Příprava: navážka přípravku se rozpustí ve vlažné destilované vodě. Po důkladném rozpuštění se autoklávuje 20 min při 115°C. Poté se přidá glycerol



v poměru 1:1 a směs kryoprotektivního média se opět autoklávuje 20 min, 115°C.

### 4.3 Chemikálie

#### **Roztoky a chemikálie pro provedení pulzní gelové elektroforézy (PFGE – Pulsed-Field Gel Electrophoresis)**

- 0,85% solný roztok
  - Příprava: navážit 0,85 g NaCl, rozpustit ve 100ml sterilní destilované vody. Celý roztok se již neautoklávuje
- Lyzační pufr I
  - 1M Tris-HCl [pH 7,4] 600μl [6mM]
  - 5M NaCl 20ml [1M]
    - Příprava roztoku: 29,2g NaCl rozpustit ve 100ml deionizované vody
  - 0,5M EDTA 20ml [100M] (Sigma-Aldrich, USA)
    - Příprava roztoku: navážit 146,115g EDTA do 100ml deionizované vody
  - 20% Sodium Lurosyl Sarcosine 2,5ml [0.5%]
  - 10% Brij 5ml [0.5%]
    - 10g na 100ml vody
  - 10% Deoxycholat 2ml [0.2%]
  - Doplnit do 100 ml destilovanou vodou a autoklávuovat 20min při 115°C
  - V den, kdy pufr použijeme, přidáme:
    - Lyzozym 1mg/ml (finální koncentrace v lyzačním pufru I)
    - RNáza A 20μg/ml (finální koncentrace v lyzačním pufru I)
  - Na 100ml lyzačního pufru I přidáme 2ml 50mg/ml zásobního roztoku lyzozymu na finální koncentraci 1mg/ml
  - Do 100 ml lyzačního pufru I přidáme 100μl 20mg/ml zásobního roztoku RNázy A na finální koncentraci 20μg/ml
- ESP pufr (na přípravu 100ml)
  - 1M Tris-HCl [pH 7.4] 1ml [10mM]
  - 0.5M EDTA 0.2ml [1mM] (Sigma-Aldrich, USA)
  - 10% SDS 10ml [1%]
    - Příprava: 1g lauryl sulfátu + 10 ml 0,2M NaOH

- proteináza K [zásobní roztok 20mg/ml] 0,25ml [50µg]
- doplnit do 100 ml sterilní destilovanou vodou
  - vždy připravovat čerstvý roztok v den použití
- TE pufr (na přípravu 500ml)
  - 0,5M EDTA 100µl [0,1mM]
  - 1M Tris-HCL [pH7,4] 5ml [10mM]
  - Doplnit do 500ml sterilní destilovanou vodou
- 0,5x TBE pufr
  - Pro přípravu 1litru 0,5x TBE odebereme ze zásobního roztoku 50ml 10x TBE a doplníme do objemu 1l deionizovanou vodou
    - Příprava zásobního 10xTBE pufru: Navážka 60,5g Tris-base (Sigma-Aldrich, USA), 30,85g kyseliny borité (Sigma-Aldrich, USA) a 4,16g EDTA (Sigma-Aldrich, USA) byla rozpuštěna v 1000ml deionizované vody, pomocí naředěné HCl (Lachema, ČR) bylo upraveno pH [8]
    - Pufr byl autoklávován při 121°C 20 min
- Sea Kem LE agarose (Lonzo, USA)
- RNAza A (TopBio, ČR)
- Ethidium bromid, EtBr (Top-Bio, ČR)
- Hmotnostní markery (BioLabs, Anglie)
  - 100 bp DNA ladder s fragmenty o velikosti 100-1500bp: užíváno u testování genů rezistence a typizace replikonů PBRT (z angl. **PCR-based replikon typing**)

### **Roztoky a chemikálie pro provedení PCR**

- Lyzační pufr II (pro izolaci DNA k PCR)
  - 150 µl 0,25 % SDS smíchané s 24 mg 0,05 M NaOH (PLIVA-Lachema, ČR) a 11850 µl destilované vody.
- PCR voda (Top-Bio, ČR)
- PPP Master Mix (Top-Bio, ČR)
  - **Složení:** 150mM Tris-HCl
  - 40nM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
  - 0,02% Tween 20

- 5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 400μM dATP
- 400μM dCTP,
- 400μM dGTP
- 400μM dTTP
- 100U/ml Taq-Purple DNA polymeráza
- Stabilizátory a aditiva
- pH 8,8
- PCR primery nasynthetizované firmou Boogen (ČR)
- Roztoky a chemikálie pro provedení elektroforézy
- 10x TBE pufr
  - Příprava zásobního 10xTBE pufru: Navážka 60,5g Tris-base (Sigma-Aldrich, USA), 30,85g kyseliny borité (Sigma-Aldrich, USA) a 4,16g EDTA (Sigma-Aldrich, USA) byla rozpuštěna v 1000ml deionizované vody, pomocí naředěné HCl (Lachema, ČR) bylo upraveno pH [8]
  - Pufr byl autoklávován při 121°C 20 min
- Sea Kem LE agarose (Lonzo, USA)
- Ethidium bromid, EtBr (Top-Bio, ČR)
- Hmotnostní markery (BioLabs, Anglie)
- 100 bp DNA ladder s fragmenty o velikosti 100-1500bp: užíváno u testování genů rezistence a typizace replikonů PBRT (z angl. **PCR-based replikon typing**)

#### 4.4 Přístroje a zařízení

- Termostat Sanyo MIR-153 (Sanyo, Japonsko)
- Biohazard box třídy IIA (Steril Antares, Itálie)
- PCR-box UV4 PCR (SCIE-PLAS, Velká Británie)
- Mikrovlnná trouba Hitachi MCE30 (Hitachi, Japonsko/ Daewoo, Jižní Korea)
- Stolní třepačka Minishaker IKA MS2 (IKA Works, Inc., USA)
- Analytické váhy (Radwag, Polsko)
- Fotodokumentační multifunkční a analyzační systém: Bio-Imaging Systems MFChemiBIS 3.2 (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., USA)

- Termocycler XP cycler (BIOER, Čína), Life express (BIOER, Čína), My Cycler (BioRad, USA)
- Zdroj elektrického napětí Power Pac 300; Basic (BioRad, USA); Enduro 300 (Labnet, USA)
- Autokláv IP 44 (CertoClav, Rakousko); Autokláv PS20A (Chirana, ČR)
- 
- Mikropipety (Eppendorf, Německo; Gilson, Francie; Labnet, USA)
- PFGE system CHEF-DR III (Bio-Rad)
- chlazená odstředivka Centrifuge 5415R (Eppendorf, Německo)

#### 4.5 Ostatní materiál

- Jednorázové rukavice
- Plastové petriho misky o průměru 90mm
- Sterilní jednorázové bakteriologické kličky – objem 1μl (Biologix, USA)
- Sterilní jednorázové špičky pro mikropipety (Eppendf, Německo)
- Zkumavky typu Eppendorf o objemu 1.5ml a o objemu 200μl (Eppendrof, Německo)
- Laboratorní sklo
- Sterilní jednorázové vatové výtěrové tampóny
- Jednorázové plastové Pasteurovy pipety (Copan, Itálie)
- Kryozkumavky Nunc – objem 1,8ml (Thermo Fisher Scientific, Dánsko)

## 5 Metodika

K této studii byly použity vankomycin-rezistentní izoláty *E. faecium*, izolované z trusu amerických vran. Tyto izoláty pocházely již z dřívějších studií: American crows as carriers of vancomycin-resistant enterococci with *vanA* gene (Oravcová a kol., 2014a) a First record of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Canadian wildlife (Oravcová a kol., 2014b), kde byla provedena kultivace na Slanetz-Bartely agaru (kultivační půdě, která se používá pro detekci a enumeraci intersticiálních enterokoků); determinace bakterií pomocí hmotnostní spektrometri MALDI TOF; na základě výsledků po provedení metod testování citlivosti (DDT – diskový difúzní test, MIC – minimální inhibiční koncentrace) byly vyselektovány vankomycin-rezistentní kmeny, u kterých byl pomocí MLST (multilokusová sekvenační

typizace) zjištěn jejich sekvenční typ (ST), poté byly izoláty zamraženy v kryoprotektivním médiu a uchovány při -80 °C.

V naší studii jsme se zaměřili na detekci plazmidů, pomocí metody PFGE.

Pomocí metody PCR byly pak detekovány geny relaxáz, replikáz a antitoxin-toxin systému, pro typizaci plazmidů z jednotlivých plazmidových rodin.

Pomocí 19 primerů byly metodou PCR charakterizovány typy *Tn1546*.

## 5.1 PFGE pracovní postup

Při průkazu plazmidů se postupovalo dle pracovního protokolu Ústavu biologie a chorob volně žijících zvířat VFU Brno.

Bakteriální kultury uchované v kryoprotektivním médiu byly vyočkovány na Slantz-Bartely agar a kultivovány 24h při 37°C.

Z narostlé kultury bylo, pomocí sterilní inokulační kličky, sebráno několik kolonií, které byly přeneseny do 5ml TSB nebo BHI. Inkubace 16 hodin při 37°C. Poté byla zahájena příprava bločků. Na spektrofotometru byla měřena absorbance směsi 800μl čistého BHI bujónu a 200 μl bakteriální kultury při 600nm. Jako slepý vzorek byl použit 1ml BHI bujónu. Následoval přepočítání na výslednou hodnotu 1,2. Bakteriální kultura byla promíchána na vortexu a vypočítaný objem byl přenesen do plastové mikrozkušavky typu Eppendorf o objemu 1,5ml. Následně došlo k centrifugaci při 10 000 otáčkách/ min po dobu 1,5 minuty. Po slítí supernatantu bylo k peletu přidáno 500μl 0,85% solného roztoku. Po promíchání následovala centrifugace 10 000 ot/min po dobu 1,5 minuty. Po opětovném slítí supernatantu bylo přidáno 200μl 0,85% solného roztoku. Takto připravená bakteriální kultura byla následně umístěna do vodní lázně k vytemperování na 56°C.

Pro tvorbu bločků bylo zapotřebí připravit 1,6% agarózový gel, za použití 0,32g SeaKem Gold agarózy a 20ml TE pufru. Gel byl rozvařen v mikrovlnné troubě a dále temperován ve vodní lázni při 56°C. po vytemperování byl přidán 10% SDS (na 20ml gelu 1ml SDS).

K 200μl vytemperované bakteriální kultury bylo přidáno 250μl vytemperované agarózy. Po důsledném promíchání byla směs napipetována do formy na přípravu bločků a takto ponechána 20 – 30 minut při pokojové teplotě k úplnému zatuhnutí.

### Lyze bločků

Připravíme lyzační roztok – k lyzačnímu pufru I se přidá lysozymu o koncentraci 50mg/ml a RNAza o koncentraci 20mg/ml. Lyze probíhá při 37°C po dobu 4 hodin ve vodní lázni s mírným třepáním. Po slítí lyzačního roztoku následuje další lyze.

Připraví se lyzační roztok ESP s proteinázou K. Bločky se přemístí do 50ml zkumavek, do kterých se naleje 10ml lyzačního roztoku ESP s proteinázou K. Lyze probíhá při 50°C po dobu 16 hodin ve vodní lázni.

### Promývání bloček

Po slítí přebytečného ESP pufru se bločky promývají 4x TE puftrem. První promytí trvá 20min, ostatní po 10 minutách. Promývání probíhá při pokojové teplotě s třepáním. Promyté bločky lze uchovávat v TE pufru při 4°C.

### Štěpení bloček

Pro štěpení bloček bylo nejdříve zapotřebí odříznout 3-4mm silný pruh, vložit jej na 5-10min do plastových zkumavek typu Eppendorf se 100µl roztoku 1xpufru A

Poté byla připravena směs na štěpení bloček. Viz tabulka č. 6

**Tabulka 6 komponenty pro štěpení bloček**

	KOMPONENTY (Promega, USA)	OBJEM [µl]	poznámka
štěpení kontroly	ApaI enzym	1	Výsledná koncentrace enzymu je 40U/ vzorek. Štěpení
	BSA	1	
	NEB4	10	
	ddH <sub>2</sub> O	88	
Štěpení vzorků	S1 enzym	1	Výsledná koncentrace enzymu je 20U/ vzorek.
	10x pufrA	10	
	ddH <sub>2</sub> O	89	

Zastavení štěpení bylo dosaženo dsátím štěpící směsi a přidáním 200µl 0,5xTBE na dobu 10 min. při pokojové teplotě.

### Elektroforéza

Pro samotnou PFGE je nutno připravit 1% agarózový gel za použití 1,5g SeaKem Gold agarózy a 150ml 0,5x TBE. Gel se nechá vytemperovat ve vodní při 60°C 45 – 60min. Mezitím byly promyté a naštěpené bločky nanášeny na hřebínek. Po odsátí přebytečného pufru byly ponechány 25 min. při laboratorní teplotě. Poté se hřebínek vloží do formy, kam se

následně naleje vytemperovaný agarózový gel. Gel se nechá zatuhnout po dobu 30min při laboratorní teplotě. Po zatuhnutí se vyjme hřebínek.

Vana určená k PFGE byla naplněna 3l 0,5xTBE vytemperovanými na 14°C. Do takto připraveného přístroje byl vložen gel. Program s nastavením počátečního pulzního času na 1 sekundu a koncového pulzního času na 20 sekund běžel 17,5 hod. při 14°C s rychlostí pumpy 70.

Po ukončení elektroforézy byl gel barven ve směsi 100μl zásobního EtBR s 1000ml destilované vody po dobu 30min. Gel byl následně přenesen na transluminátor napojený na detekční fotografický systém a vyfotografován.

## 5.2 Detekce genů rezistence metodou PCR

Při průkazu genů rezistence se postupovalo dle pracovního protokolu Ústavu biologie a chorob volně žijících zvířat VFU Brno.

### Izolace bakteriální DNA

Izoláty *E. faecium*, uchovávané v kryoprotektivním médiu, byly vyočkovány na Slanetz-Bartley (SB) agar s vankomycinem a kultivovány při 37°C 24-48hodin. Narostlá bakteriální kultura byla resuspendována v mikrozkuhavce typu Eppendorf ve 20μl lyzačního pufru a zhomogenizována. Suspenze byla zahřáta na teplotu 95°C po dobu 15 min. Výsledný lyzát se zředil s 80μl destilované vody. Celá směs se poté centrifugovala při 15 000ot/min. po dobu 5 min. Supernatan byl předán do nové mikrozkuhavky. Takto získaná izolovaná DNA byla zamrazena při -20°C k dalšímu užití.

### PCR se specifickými primery

Pro přípravu PCR směsí jsme se řídili množstvím komponent uvedeným v tabulce č. 7. Objemy jednotlivých komponent vynásobeny počtem analyzovaných vzorků plus 1 vzorek navíc. Jednotlivé složky směsí se napipetovaly a smíchaly v jedné zkuhavce typu Eppendorf (kromě DNA). Přenesené objemy jednotlivých komponent PCR směsí jsou rozepsány v tabulce č. 7

**Tabulka 7 Objemy jednotlivých komponent pro PCR**

Reakční komponenty	Objem [μl]
PPP Master Mix	6,25
PCR voda	4,75
Primer F	0,5

Primer P	0,5
DNA matrice	0,5
Celkový objem PCR směsi	12,5

Směs byla pomocí vortexu krátce homogenizována a rozpipetována po 12 $\mu$ l do předem předepsaných mikrozkuhavek typu Eppendorf o objemu 200 $\mu$ l. Na závěr byl do každé mikrozkuhavky přidán 0,5 $\mu$ l bakteriální DNA připravené alkalickou lýzou a uchované v -20°C. Ke každé PCR reakci je potřeba přidat pozitivní kontrolu (seznam pozitivních kontrol viz tabulka č. 5) a negativní kontrolu (jako negativní kontrola byla použita PCR voda).

Mikrozkuhavky typu Eppendorf se vzorky obsahujícími všechny reakční složky byly umístěny do termocycleru s následným spuštěním příslušného programu. Jednotlivé kroky PCR reakce viz tabulky č. 9, 11, 13, 15, 17, 19

**Tabulka 8 seznam pozitivních kontrol**

gen	Kontrolní kmen
<i>rep1</i>	E0005
<i>rep2</i>	E0005
<i>rep8</i>	pAM337
<i>rep9</i>	V583
<i>rep14a</i>	UW6337
<i>rep17</i>	UW6337
<i>rep18</i>	UWG337
<i>rep18b</i>	UWG337
<i>rep18c</i>	H321
<i>rep20</i>	UW6337
<i>rep21</i>	pVEF1
<i>rep22</i>	H321
<i>rel pMT<math>\beta</math></i>	pMG1 – UV2774
<i>rel pRE25</i>	pRE25
<i>rel pEF1</i>	UW6337
<i>rel pRUM</i>	pRUM N37
<i>rel pCIZ2</i>	UW6337
<i>rel pAD1</i>	V583
<i>rel pCF10</i>	V583
<i>rel pAMa1</i>	pS86
<i>rel pRII</i>	UW6337
<i>rel pLG1</i>	UW2774pLG1
<i>Fst</i>	V583
$\epsilon$ - $\zeta$	E0013
<i>axe-txe</i>	pRUM N37



**Tabulka 9** Jednotlivé kroky PCR pro průkaz genů typických pro plazmidy rodiny RepA\_N

Krok	funkce	Teplota [°C] / čas									
		gen									
		<i>rep17</i>	<i>rel<sub>PRUM</sub></i>	<i>axe-txe</i>	<i>rep20</i>	<i>rel<sub>PLGI</sub></i>	<i>rep9</i>	<i>rel<sub>PADI</sub></i>	<i>fst</i>	<i>rep8</i>	<i>rel<sub>PCF10</sub></i>
1	Úvodní denaturace DNA	94/10min	94/10min	94/10min	94/10min	94/10min	94/10min	94/10min	94/10min	94/10min	94/10min
2	Denaturace DNA	94/30 s	94/30 s	94/30 s	94/30 s	94/30 s	94/30 s	94/30 s	94/30 s	94/30 s	94/30 s
3	Připojení primerů	54/30 s	56/30 s	52/30 s	60/30 s	56/30 s	52/30 s	49/30 s	70/30 s	52/30 s	49/30 s
4	Syntéza DNA řetězce	72/30 s	72/30 s	72/30 s	72/30 s	72/30 s	72/30 s	72/30 s	72/30 s	72/30 s	72/30 s
5	Opakování kroků 2-4	35 cyklů	35 cyklů	35 cyklů	35 cyklů	35 cyklů	35 cyklů	35 cyklů	35 cyklů	35 cyklů	35 cyklů
6	Závěrečná syntéza DNA řetězce	72/10 min	72/10 min	72/10 min	72/10 min	72/10 min	72/10 min	72/10 min	72/10 min	72/10 min	72/10 min
7	Chlazení	4/∞	4/∞	4/∞	4/∞	4/∞	4/∞	4/∞	4/∞	4/∞	4/∞

**Tabulka 10 Testované geny a seznam primerů (Rodina RepA\_N)**

	Gen	primery	Sekvence primeru (5'→3')	Velikost produktu (bp)	reference
pRUM	Rep17	Rep(17)-F	TAC TAA CTG TTG GTA ATT CGT TAA AT	502	Jensen a kol., 2010
		Rep(17)-R	ATC AAG GAC TCA ACC GTA ATT		
	Rel	Rel(pRUM)- F	AAT GTA TGG CAA AAC AGA TGG	138	Goicoechea a kol, 2008
		Rel(pRUM)- R	ACG GCA ACT TGA TGA TTA GG		
	Axe	Axe-Txe-F	CTG ACC CTT TCC TTA CTT CCG	557	Moritz a Hergenrother, 2007
		Axe-Txe-R	GGG TGA AAG GAA TGG AAG CAG		
pLG1	Rep20	Rep(20)-F	AGT CGA AAA TAT CCA GAA CCT G	135	Freitas, 2011
		Rep(20)-R	AAC CAG TCT TTC GTA ATA GTG C		
	Rel	Rel(pLG1)-F	CGC CTG AAG ACA AAG TGA CA	332	Freitas, 2011
		Rel(pLG1)-R	GCG AAT TTC AGA ACG AAA GC		
pAD1	Rep9	Rep(9)-F	GCT CGA TCA RTT TTC AGA AG	201	Jensen a kol., 2010
		Rep(9)-R	CGC AAA CAT TTG TCW ATT TCT T		
	Rel	Rel(pAD1)-F	TAA TTT ATG TRA CAC CTA GT	133	Goicoechea a kol, 2008
		Rel(pAD1)-R	TCAAATTCTTCRGCTGAAAAAYATGC		
	fst	Fst-F	AGCAGCTTACTT TCGGCTATCGTCT	146	Freitas, 2011
		Fst-R	TAA TGC GGC AGC TCG CCT CGATT		
pAM373	Rep8	Rep(8)-F	TAGATACGACAAAAG AAGAATTACA	395	Jensen a kol., 2010
		Rep(8)-R	CCA ATC ATG TAA TGT TAC AAC C		
pCF10	Rel	Rel(pCF10)- F	TAA TCC AAT CMT TTT CTC C	318	Goicoechea a kol, 2008
		Rel(pCF10)- R	TGG ACT SWG TTT GCC ATT TTG		

**Tabulka 11 Jednotlivé kroky PCR pro průkaz genů typických pro plazmidy rodiny Inc18**

Krok	Teplota [°C] / čas						
	funkce	gen					
		<i>rep17</i>	<i>rep2</i>	<i>rep21</i>	<i>rel<sub>pEF1</sub></i>	<i>rel<sub>pRE25</sub></i>	$\epsilon$ - $\zeta$
1	Úvodní denaturace DNA	94/10min	94/10min	94/10min	94/10min	94/10min	94/10min
2	Denaturace DNA	94/30 s	94/30 s	94/30 s	94/30 s	94/30 s	94/30 s
3	Připojení primerů	52/30 s	52/30 s	52/30 s	52/30 s	52/30 s	52/30 s
4	Syntéza DNA řetězce	72/30 s	72/30 s	72/30 s	72/30 s	72/30 s	72/1min
5	Opakování kroků 2-4	35 cyklů	35 cyklů	35 cyklů	35 cyklů	35 cyklů	35 cyklů
6	Závěrečná syntéza DNA řetězce	72/10 min	72/10 min	72/10 min	72/10 min	72/10 min	72/10 min
7	Chlazení	4/∞	4/∞	4/∞	4/∞	4/∞	4/∞

**Tabulka 12 Testované geny a seznam primerů (Rodina Inc18)**

	Gen	primery	Sekvence primeru (5'→3')	Velikost produktu (bp)	reference
pIP501	Rep1	Rep(1)-F	TCG CTC AAT CAC TAC CAA G	624	Jensen a kol., 2010
		Rep(1)-R	CTT GAA CGA GTA AAG CC CTT		
pRE25	Rep2	Rep(2)-F	GAG AAC CAT CAA GGC GAA AT	630	Jensen a kol., 2010
		Rep(2)-R	ACC AGA ATA AGC ACT ACG TAC AAT CT		
pVEF1/2	Rep21	Rep(21)-F	TCG TTT CAC TCA TTGGACACC	200	Freitas, 2011
		Rep(21)-R	TCA TTG TCG GCA TAA AGC C		
pEF1	Rel	Rel(pEF1)-F	AAG CAA ATC TTC CAA AGA GG	217	Goicoechea a kol, 2008
		Rel(pEF1)-R	GGTGAATCGTTGCCATCCAGTAGC C		
pRE25	Rel	Rel(pRE25)-F	AAT GGC TTC TTA TCGAAGTGG	325	Goicoechea a kol, 2008
		Rel(pRE25)-R	TTC ATC ATC TCT ATG AAT GG		
Inc18	$\epsilon$ - $\zeta$	$\epsilon$ -F	TTA ACG AAT TAT CGG CAA GC	1063	Johnsen a kol, 2005
		$\zeta$ -R	GTG GTT TAG GTG GCT GCA AG		

**Tabulka 13 Jednotlivé kroky PCR pro průkaz genů typických pro plazmidy rodiny pHT $\beta$**

Krok	Teplota [°C] / čas		
	gen		
	funkce	<i>rep22</i>	<i>rel<sub>pHT<math>\beta</math></sub></i>
1	Úvodní denaturace DNA	94/10min	94/10min
2	Denaturace DNA	94/30 s	94/30 s
3	Připojení primerů	52/30 s	52/30 s
4	Syntéza DNA řetězce	72/30 s	72/30 s
5	Opakování kroků 2-4	35 cyklů	35 cyklů
6	Závěrečná syntéza DNA řetězce	72/10 min	72/10 min
7	Chlazení	4/∞	4/∞

**Tabulka 14 Testované geny a seznam primerů (Rodina pHT $\beta$ )**

	Gen	primery	Sekvence primeru (5'→3')	Velikost produktu (bp)	reference
pHT $\beta$	Rep22	Rep(22)-F	GTA TTA ACA CAC TGG ACT C	199	Freitas, 2011
		Rep(22)-R	TCA GTG TAG GCA ATA ACC C		
	pTH $\beta$	Rel(pHT $\beta$ )-F	TAA AGA TTT GCG TGA AATGG	192	Goicoechea a kol, 2008
		Rel(pHT $\beta$ )-R	TCT TGG AAC ATC ACC GATCC		

**Tabulka 15 Jednotlivé kroky PCR pro průkaz genů typických pro plazmidy rodiny RCR**

Krok	Teplota [°C] / čas		
	gen		
	funkce	<i>Rep14</i>	<i>rel<sub>pRII</sub></i>
1	Úvodní denaturace DNA	94/10min	94/10min
2	Denaturace DNA	94/30 s	94/30 s
3	Připojení primerů	50/30 s	48/30 s
4	Syntéza DNA řetězce	72/30 s	72/30 s
5	Opakování kroků 2-4	35 cyklů	35 cyklů
6	Závěrečná syntéza DNA řetězce	72/10 min	72/10 min
7	Chlazení	4/∞	4/∞

**Tabulka 16 Testované geny a seznam primerů (Rodina RCR)**

	Gen	primery	Sekvence primeru (5'→3')	Velikost produktu (bp)	reference
pRI	Rep14	Rep(14a)-F	GAT ATT GCT TGC GAT AT	468	Freitas, 2011
		Rep(14a)-R	CTC TCG RAA ATG ATT CGT C		
pRII	rel	Rel(pRII)-F	TTG TTC TAA ATA GAT ATTTTCATC	105	Freitas, 2011
		Rel(pRII)-R	AGC ATT TCT CAT AAT AATCGTGAG		

**Tabulka 17 Jednotlivé kroky PCR pro průkaz genů typických pro Malé theta-replikující se plazmidy**

Krok	Teplota [°C] / čas				
	funkce	gen			
		<i>rep18a</i>	<i>rep18b</i>	<i>rep18c</i>	<i>rep<sub>pCIZ2</sub></i>
1	Úvodní denaturace DNA	94/10min	94/10min	94/10min	94/10min
2	Denaturace DNA	94/30 s	94/30 s	94/30 s	94/30 s
3	Připojení primerů	52/30 s	54/30 s	56/30	52/30 s
4	Syntéza DNA řetězce	72/30 s	72/30 s	72/30 s	72/30 s
5	Opakování kroků 2-4	35 cyklů	35 cyklů	35 cyklů	35 cyklů
6	Závěrečná syntéza DNA řetězce	72/10 min	72/10 min	72/10 min	72/10 min
7	Chlazení	4/∞	4/∞	4/∞	4/∞

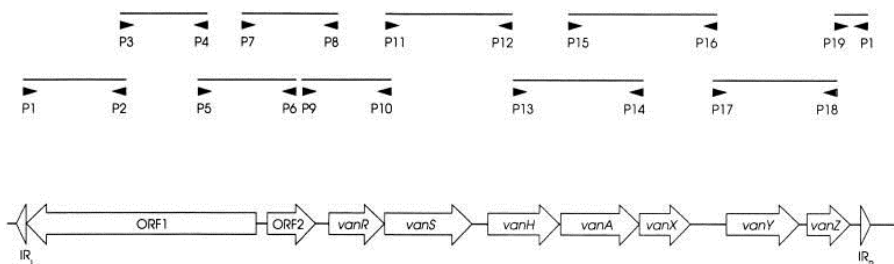
**Tabulka 18 Testované geny a seznam primerů (Malé theta-replikující se plazmidy)**

	Gen	primery	Sekvence primeru (5'→3')	Velikost produktu (bp)	reference
pEF418	Rep18a	Rep(18)-F	ACA CCA GTC GAA ATG AAT TT	462	Jensen a kol., 2010
		Rep(18)-R	AGGAATATCAAGTAATTCATGAAAGT		
pB82	Rep18b	Rep(18b)-F	GTG TCT AGA ATG CGTGAAAAAGG	421	Jensen a kol., 2010
		Rep(18b)-R	CTA ATA ATT CAA GAA AGT CTTC		
P200b	Rep18c	Rep(18c)-F	TGT TCT AAAATGAAA AGAAAAGG	427	Freitas, 2011
		Rep(18c)-R	CTA ATA GAG CTC TAA AAT CTT C		
Pciz2	rel	Rel(pCIZ2)-F	ATG GCA ACA GTT AAA GTA AG	208	Goicoechea a kol, 2008
		Rel(pCIZ2)-R	CAG CGG TAA TTT CTC CTG GTC		

**Tabulka 19** Jednotlivé kroky PCR k charakterizaci Tn1546 (*vanA* transpozonu)

Krok	Teplota [°C] / čas				
	Primery / IS				
	funkce	P1-P19	ISEfI (v páru s P18-R)	IS1216	IS1251
1	Úvodní denaturace DNA	94/10min	94/10min	94/10min	94/10min
2	Denaturace DNA	94/30 s	94/30 s	94/30 s	94/30 s
3	Připojení primerů	45/1 min	45/1 min	52/30	58/30 s
4	Syntéza DNA řetězce	72/5 min	72/5 min	72/30 s	72/30 s
5	Opakování kroků 2-4	30 cyklů	30 cyklů	30 cyklů	30 cyklů
6	Závěrečná syntéza DNA řetězce	72/10 min	72/10 min	72/10 min	72/10 min
7	Chlazení	4/∞	4/∞	4/∞	4/∞

Charakterizace transpozonu Tn1546 s19 PCR primery (P1 až P19) specifické pro různé oblasti sloužící pro určení orientace různých součástí Tn1546 (Simjee a kol., 2002)



**Tabulka 20 Seznam primerů k charakterizaci Tn1546 (*vanA* transpozonu)**

primery	Sekvence primeru (5' → 3')	Velikost produktu (bp)	reference
P1-F	GGA TTT ACA ACG CTA AG	1309	Woodford a kol, 1998
P2-R	GCC TTT ATC AGA TGC TA		
P3-F	GGT TTT CGA TTA TTG GA	1130	
P4-R	AAA TAA TAG AAC GAC TC		
P5-F	CGG AAT GCA TAC GGC TC	1299	
P6-R	AGC CAT TAC AGT AAT TA		
P7-F	GGA TGG ACT AAC ACC AA	1274	
P8-R	TTA AGT ATA ATT CAA CC		
P9-F	GTG AAG GGA TTG AAT TG	1225	
P10-R	TCC AAT CCC CAA GTT TC		
P11-F	AAA CGA CTA TTC CAA AC	1679	
P12-R	CAT AGT ATA ATC GGC AA		
P13-F	GTG TGA AAT ATA TTT CT	1793	
P14-R	TTC CAT GCT TAT CAC CC		
P15-F	ATG AAT AGA ATA AAA GT	1942	
P16-R	GGA TTT ACT ATT ATC AC		
P17-F	AAT TCA TCT ACA TTG GT	1585	
P18-R	TCA GTC CAA GAA AGC CT		
P19-F	TAT CTT CGC TAT TGG AG	428	
<i>ISE<sub>fl</sub></i> -F	GGTGTTACGATGTCTGAAATTGC	Variabilní	Novais, 2005
<i>IS1216</i> -F	ACC TTC ACG ATA GCT AAG GTT	439 (variabilní)	Huh a kol, 2004
<i>IS1216</i> -R	AGG ATT ATA TAA GAA AAC CCG		
<i>IS1251</i> -F	GCA TCC ACT GTA AAC ACC AG	427	Jensen a kol., 1998
<i>IS1251</i> -R	CGC TGT GTT TGA CCA TCC AT		



Detekce PCR produktu agarózovou gelovou elektroforézou

K detekci PCR bylo použito 1,5 % agarózového gelu.

Příprava gelu: navážka 1,2g agarózy + 80ml 1x TBE pufru se nechá povařit několik minut v mikrovlnné troubě. Po zchlazení na teplotu cca 60 °C bylo přidáno 80μl barviva MIDORI. Po promíchání byl celý obsah přelit do předem připravené formy s hřebínky. Ve formě tuhnul gel při laboratorní teplotě 20 – 30 min. Po ztuhnutí byly odstraněny hřebínky a gel byl ponořen do elektroforetické vany naplněné 1x TBE pufrem. Do příslušných jamek v gelu byly nejprve napipetovány 2μl hmotnostního markeru 100bp. Dále byl do příslušných jamek v gelu napipetovaný PCR produkt v množství 4μl.

Elektroforéza probíhala při napětí 130 V po dobu 25 min.

Po skončení elektroforézy byl gel opatrně vyjmut z elektroforetické vany a přenesen na podložku transluminátoru. Pořízený obrazový záznam byl následně vyhodnocen.

## 6 Výsledky

Celkem bylo testováno 12 vankomycin-rezistentních izolátů *E. faecium* (viz tabulka č.). U těchto kmenů byl pomocí metody PFGE stanoven počet a velikost plazmidů.

Dalším krokem u těchto izolátů byla detekce genů replikáz, relaxáz a toxin-antitoxin systému pro typizaci plazmidů z jednotlivých plazmidových rodin. A charakterizovány typy Tn1546

### 6.1 Detekce počtu plazmidů u izolátů *E. faecium* pomocí PFGE

Tabulka 21 Počet a velikost plazmidů v testovaných izolátech

Č. vzorku	Počet plazmidů	Velikost plazmidů (kb)
8	4	200; 140; 73; <30
9	2	245; 55
17	2	273; 33
19	5	230; 117; 66; 46; <30
20	3	220; 66; 33
21	4	180; 78; 40; 33
34	4	245; 210; 68; 61
35	5	290; 197; 158; 61; 55
36	4	200; 170; 55; 41
37	4	290; 200; 66; 40
38	3	200; 55; <30
39	3	217; 67; 54

Detekce genů, charakterizujících plazmidy rodiny RepA\_N

Z celkového počtu 12 izolátů *E. faecium*, byl prokázán gen *rep17* u 11 izolátů (n=12; 92 %), u 5 izolátů (42 %) byl detekován gen *Axe-Txe*, který kóduje malé proteiny antitoxin Axe a toxin Txe. Oba detekované geny jsou typické pro plazmidy příbuzné pRUM.

U 7 izolátů (58 %) byl detekován gen *rep20*, charakterizující plazmidy příbuzné pLG1.

U 1 izolátu (8 %) byl detekován gen *rel<sub>pAD1</sub>*, nacházející se na plazmidu příbuzném pAD1.

Tabulka 22 plazmidy rodiny RepA\_N

RepA_N											
Č. vzorku	plazmid	pRUM			pLG1		pAD1			pAM373	pCF10
	Gen	<i>rep17</i>	<i>rel<sub>pRum</sub></i>	<i>Axe-Txe</i>	<i>rep20</i>	<i>rel<sub>pLG1</sub></i>	<i>rep9</i>	<i>rel<sub>pAD1</sub></i>	<i>fst</i>	<i>rep8</i>	<i>Rel<sub>pCF10</sub></i>
8		<i>rep17</i>	-	<i>Axe-Txe</i>	-	-	-	-	-	-	-
9		-	-	-	-	-	-	<i>rel<sub>pAD1</sub></i>	-	-	-
17		<i>rep17</i>	-	-	<i>rep20</i>	-	-	-	-	-	-
19		<i>rep17</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20		<i>rep17</i>	-	-	<i>rep20</i>	-	-	-	-	-	-
21		<i>rep17</i>	-	<i>Axe-Txe</i>	<i>rep20</i>	-	-	-	-	-	-
34		<i>rep17</i>	-	<i>Axe-Txe</i>	-	-	-	-	-	-	-
35		<i>rep17</i>	-	-	<i>rep20</i>	-	-	-	-	-	-
36		<i>rep17</i>	-	-	<i>rep20</i>	-	-	-	-	-	-
37		<i>rep17</i>	-	<i>Axe-Txe</i>	<i>rep20</i>	-	-	-	-	-	-
38		<i>rep17</i>	-	-	<i>rep20</i>	-	-	-	-	-	-
39		<i>rep17</i>	-	<i>Axe-Txe</i>	-	-	-	-	-	-	-

V tabulce jsou uvedeny jednotlivé geny relaxáz (rel), repliláz (rep) a antitoxin-toxin (axe-txe, fst) pro typizaci jednotlivých plazmidových skupin v rodině RepA\_N.

## 6.2 Detekce genů, charakterizujících plazmidy rodiny Inc18

Z celkových 12 izolátů byl gen *rep1* zachycen v jednom případě (8 %), tento gen se nachází na plazmidu příbuzném pIL501. Gen Rep2 ve dvou případech (17 %), gen se nachází na plazmidu příbuzném pRE25. V 11 případech byl detekován gen *Rel<sub>pEF1</sub>*, reprezentující plazmid pEF1.

Tabulka 23 Plazmidy rodiny Inc18

Inc18							
Č. vzorku	plazmid Gen	pIL501 <i>rep1</i>	pRE25 <i>rep2</i>	pVEF1/2 <i>rep21</i>	pEF1 <i>rel<sub>pEF1</sub></i>	pRE25 <i>rel<sub>pRE25</sub></i>	Inc18 $\epsilon$ - $\zeta$
8		-	-	-	<i>rel<sub>pEF1</sub></i>	-	-
9		-	-	-	-	-	-
17		-	-	-	<i>rel<sub>pEF1</sub></i>	-	-
19		<i>rep1</i>	<i>rep2</i>	-	<i>rel<sub>pEF1</sub></i>	-	-
20		-	-	-	<i>rel<sub>pEF1</sub></i>	-	-
21		-	<i>rep2</i>	-	<i>rel<sub>pEF1</sub></i>	-	-
34		-	-	-	<i>rel<sub>pEF1</sub></i>	-	-
35		-	-	-	<i>rel<sub>pEF1</sub></i>	-	-
36		-	-	-	<i>rel<sub>pEF1</sub></i>	-	-
37		-	-	-	<i>rel<sub>pEF1</sub></i>	-	-
38		-	-	-	<i>rel<sub>pEF1</sub></i>	-	-
39		-	-	-	<i>rel<sub>pEF1</sub></i>	-	-

V tabulce jsou uvedeny jednotlivé geny relaxáz (*rel*), repliláz (*rep*) a antitoxin-toxin ( $\epsilon$ - $\zeta$ ) pro typizaci jednotlivých plazmidových skupin v rodině Inc18.

### 6.3 Detekce genů, charakterizujících plazmidy rodiny pHTβ

U 4 izolátů byl detekován gen *rep22* (33 %) a u 2 izolátů (17 %) byl detekován gen *rel<sub>pHTβ</sub>*. Oba geny jsou zastoupeny na plazmidu příbuzném pHTβ, což potvrzuje jeho přítomnost v některých z izolátů.

Tabulka 24 Plazmidy rodiny Inc18

pHTβ			
Č. vzorku	plazmid	pHTβ	
	Gen	<i>rep22</i>	<i>rel<sub>pHTβ</sub></i>
8	/	<i>rep22</i>	<i>rel<sub>pHTβ</sub></i>
9		-	-
17		-	-
19		-	-
20		-	-
21		-	-
34		<i>rep22</i>	<i>rel<sub>pHTβ</sub></i>
35		<i>rep22</i>	-
36		<i>rep22</i>	-
37		-	-
38		-	-
39		-	-

V tabulce jsou uvedeny jednotlivé geny relaxáz (*rel*), repliláz (*rep*) pro typizaci jednotlivých plazmidových skupin v rodině pHTβ.

## 6.4 Detekce genů, charakterizujících plazmidy rodiny RCR

U 8 izolátů (67%) byl pozitivní průkaz genu *rep14* a u 4 izolátů byl detekován gen *rel<sub>pRI</sub>*. Oba geny jsou typické pro plazmidy příbuzné pRI, patří do rodiny RCR plazmidů.

Tabulka 25 Plazmidy rodiny RCR

RCR			
Č. vzorku	plazmid	pRI	pRI1
	Gen	<i>rep14</i>	<i>rel<sub>pRI</sub></i>
8	/	<i>rep14</i>	<i>rel<sub>pRI</sub></i>
9		-	-
17		-	-
19		-	-
20		<i>rep14</i>	-
21		<i>rep14</i>	-
34		<i>rep14</i>	<i>rel<sub>pRI</sub></i>
35		-	-
36		<i>rep14</i>	<i>rel<sub>pRI</sub></i>
37		<i>rep14</i>	-
38		<i>rep14</i>	-
39		<i>rep14</i>	<i>rel<sub>pRI</sub></i>

V tabulce jsou uvedeny jednotlivé geny relaxáz (rel), repliláz (rep) pro typizaci jednotlivých plazmidových skupin v rodině RCR.

## 6.5 Detekce genů, charakterizujících Malé theta-replikující se plazmidy

U dvou izolátů (17%) byl detekován gen *rep18a* jehož nositelem je plazmid příbuzný pEF418, u 1 izolátu (8%) byl detekován gen *rep18b*, typický pro plazmid příbuzný pB82, u 8 izolátů (67%) byl detekován gen *rep18c* typický pro plazmid příbuzný p200b, u 9 testovaných izolátů (75%) byl prokázán gen *rel<sub>pCIZ2</sub>* typický pro plazmid příbuzný pCIZ2.

**Tabulka 26 Malé theta-replikující se plazmidy**

Malé theta-replikující se plazmidy					
Č. vzorku	plazmid	pEF418	pB82	p200b	pCIZ2
	Gen	<i>rep18a</i>	<i>rep18b</i>	<i>rep18c</i>	<i>rel<sub>pCIZ2</sub></i>
8		-	-	<i>rep18c</i>	<i>rel<sub>pCIZ2</sub></i>
9		-	-	-	-
17		-	-	-	-
19		-	-	-	<i>rel<sub>pCIZ2</sub></i>
20		-	-	<i>rep18c</i>	<i>rel<sub>pCIZ2</sub></i>
21		<i>rep18a</i>	<i>rep18b</i>	<i>rep18c</i>	<i>rel<sub>pCIZ2</sub></i>
34		-	-	<i>rep18c</i>	<i>rel<sub>pCIZ2</sub></i>
35		-	-	-	-
36		-	-	<i>rep18c</i>	<i>rel<sub>pCIZ2</sub></i>
37		<i>rep18a</i>	-	<i>rep18c</i>	<i>rel<sub>pCIZ2</sub></i>
38		-	-	<i>rep18c</i>	<i>rel<sub>pCIZ2</sub></i>
39		-	-	<i>rep18c</i>	<i>rel<sub>pCIZ2</sub></i>

V tabulce jsou uvedeny jednotlivé geny relaxáz (*rel*), repliláz (*rep*) pro typizaci jednotlivých plazmidových skupin malých theta-replikujících se plazmidů.

## 6.6 Charakterizace transpozonu dle jednotlivých primerů

U 4 izolátů (n=12; 33 %) byl charakterizován Tn1546 jako typ F3. Tento typ se vyskytoval pouze u izolátů *E. faecium*, pocházejících ze státu Massachusetts.

U jednoho izolátu (8%) byl Tn1546 charakterizován jako typ F5. Tento typ byl nalezen pouze u izolátu, pocházejícího ze státu Kansas.

Jako jediný izolát (8%), ze státu New York, byl nositelem transpozonu Tn1546 typu PP-16.

6 izolátů mělo netypovatelné Tn1546. S největší pravděpodobností se jedná o nové, dosud nepopsané typy.

**Tabulka 3 Charakterizace Tn1546 dle specifických primerů**

Primer Č. vzorku	Tn1546										Typ transpozonu
	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-1	
8	-	-	-	-	-	++	+	++	+	+	Nový
9	-	-	-	-	+	++	+	+	+	+	F3
17	-	-	-	+	+	++	+	+	++	+	Nový
19	-	-	-	-	+	++	+	+	+	+	F3
20	-	-	-	+	+	++	+	+	++	+	Nový
21	-	-	-	-	+	++	+	+	+	+	F3
34	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	F5
35	-	-	-	+	-	++	+	+	++	+	Nový
36	-	-	-	-	-	++	+	+	+	+	Nový
37	-	-	-	-	+	++	+	+	+	+	F3
38	-	-	-	+	+	++	+	+	++	+	Nový
39	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	PP-16

- = žádná amplifikace, + = amplifikace, ++ = amplifikace sekvencí větší, než předpokládaných velikostí



## 7 Diskuze

Cílem této diplomové práce byla studie vankomycin rezistentních izolátů *Enterococcus faecium* z trusu amerických vran. Zjistit přítomnost plazmidů v izolátech odpovědných za přenos genů rezistence k vankomycinu a vybrat izoláty s jedním plazmidem. Dále charakteristika plazmidů, které nesou vanA geny, geny rezistence k dalším antibiotikům a geny virulence.

Jedná se o první studii mapující přítomnost a charakteristiku plazmidů u izolátů *Enterococcus faecium* izolovaných z trusu volně žijících amerických vran.

Ve Spojených státech amerických se rezistence k vankomycinu u kmene *E. faecium* zvýšila z 0% v polovině roku 1980 na více než 80% do roku 2007 (Arias a Murray, 2008).

Dle CDC (Centers for Disease Control and Prevention) došlo od roku 2011 do roku 2014 k mírnému poklesu rezistence u *E. faecium* z 80,5 % na 75,6 %<sup>2</sup>

Globální růst fenotypové rezistence k vankomycinu u kmenů *E. faecium* je popsán v mnoha mezinárodních studiích. Např. ve studii Willems a kol. (2005) popisují globální šíření vankomycin-rezistentních *E. faecium*. Ve Spojených státech vzrůstající tendenci VRE popisuje ve své studii Martone (1998). V jednotlivých evropských zemích totéž popisují ve své studii Werner a kol. (2008). Witte (1998) ve své studii popisuje zdravotní důsledky používání antibiotik v zemědělství. Popisuje především užívání antibiotik jako stimulant růstu u hospodářských zvířat, což představuje velký rezervoár plazmidově přenosných genů rezistence

### **Plasmidy v *E. faecium***

Plasmidy v enterokokové populaci byly rozsáhle studovány několika studiích. Např. Jensen a kol. (2010) představuje klasifikační systém pro plasmidy izolované z enterokoků a jiných gram-pozitivních bakterií.

Ve studii Rosvoll a kol. (2010) popisují identifikaci plazmidů v izolátech *E. faecium* z fekálních vzorků od lidí z komunity, hospitalizovaných pacientů a z trusu drůbeže.

Švédská studie Nilsson a kol. (2012) popisuje genetickou rozmanitost mezi VRE ze švédských brojlerů.

---

<sup>2</sup> <http://gis.cdc.gov/grasp/PSA/MapView.html> (citováno dne 3.4.2016)

### **Sekvenační typy z naší studie**

V naší studii byly detekovány sekvenační typy 18, 448, 555, 749, 750, 751, 752. Prevalence ST18 (n=12, 42%).

V portugalská studie Freitas a kol. (2011) testovali 31 VRE izolátů (29 od prasat, 12 od zdravých osob). Kmeny byly sesbírány z Portugalska, Dánska, Španělska, Švýcarska a USA. ST 18 detekovali u pěti izolátů (n=31, 16%). To dokazuje globální rozšíření tohoto ST18.

Naopak s naší prací se rozchází americká studie z Michiganu, Donabedian a kol. (2010), kdy hodnotili celkem 360 fekálních vzorků od lidí (n=158), prasat (n=55), skotu (n=50), koní (n=25), ovcí (n=57), koz (n=17) a lamy (n=1).

Vankomycin-rezistentní *Enterococcus faecium* byl izolován pouze ze 6 vzorků z výkalů prasat. Pomocí MLST byly stanoveny sekvenační typy: ST5 (n=2), ST6 (n=3) a ST185 (n=1).

Ani jeden sekvenační typ z michiganské studie nebyl nalezen mezi našimi VRE.

### **Plazmidy kódující rezistenci k vankomycinu**

Ve studii Freitas a kol., (2011) z Portugalska detekovali Tn1546 (kódující rezistenci k vankomycinu) a *tcrB* (kódující odolnost vůči mědi) umístěné na plasmidech REP<sub>pLG1</sub>. Všechny VRE kmeny (n=31) nesly plazmid pLG1. Tento plazmid byl detekován i v naší studii celkem u sedmi izolátů (n=12; 58 %).

Rozsáhlou studii provedli Rosvoll a kol. (2010), kdy testovali jak vankomycin-citlivé (n=35) tak i vankomycin-rezistentní (n=58) kmeny *E. faecium* z 13 zemí na třech kontinentech. Izoláty pocházely z komunitních a nemocničních fekálních vzorků (n=40), z vzorků drůbežního trusu (n=13) a další, nespecifikované izoláty (n=3). V této studii detekovali plazmidy pomocí PFGE. Výsledkem bylo zjištění, že 88 kmenů neslo jeden až sedm plazmidů o velikosti <10 do >200kb. Celkem u 77 byla pomocí PCR prokázána pozitivita pro jednu až čtyři skupiny replikonu. pRE25 (n=56), pRUM (n=41), pIP501 (n=17), pHTβ (n=14). Plazmidy pRE25, pRUM, pIP501 a pHTβ byly přítomny ve fekálních vzorcích jak komunitních tak i nemocničních. Ve fekálních vzorcích zvířat byly detekovány pouze pRE25 a pIP501.

V 61 % ze všech kmenů byl detekován gen *axe-txe*. V naší studii se jednalo o detekci toho genu u 42 % izolátů.

Dále Výsledky ukazují, že plazmidy pRE25, pRUM, pIP501 a pHT $\beta$ , jsou převládající a jsou široce distribuovány mezi kmeny *E. faecium*

V evropské studii Migura a kol. (2008) se snažili prokázat přítomnost plasmidu pRII detekcí rep<sub>pRII</sub> u 159 vankomycin-rezistentních kmenů *E. faecium*, které byly lidského a zvířecího původu a pocházeli z různého státu Evropy. Testovali 40 izolátů *E. faecium* od brojlerů z Velké Británie, 41 izolátů od brojlerů a 51 izolátů od prasat z Dánska, 27 izolátů vankomycin-rezistentních *E. faecium* od hospitalizovaných pacientů shromážděných z celé Evropy. Pomocí sekvenční analýzy prokázaly plazmid příbuzný pRII v 60 případech (38 %) z celkového počtu 159 zkoumaných izolátů. Pozitivních bylo 27 (ze 40) izolátů z Velké Británie, 22 (ze 41 izolátů od brojlerů) a 2 (z 51 izolátů od prasat) z Dánska, 9 (z 27) izolátů od hospitalizovaných pacientů. S touto evropskou studií se může shodovat i naše studie ankomycin-rezistentních izolátů *E. faecium* izolovaných z amerických vran. Ve 4 našich izolátech (n=12; 33%) byl detekován plazmid příbuzný pRII. Tato skutečnost naznačuje, že tato skupina plazmidů je globálně rozšířena. Z výsledků evropské studie lze usuzovat, že tyto plazmidy se nejčastěji vyskytují v izolátech pocházejících z třídy ptáků.

V polské studii Wardal a kol. (2014) prováděli molekulární analýzu při „epidemii“ VanA u *Enterococcus faecium* ve dvou varšavských nemocnicích. 44 izolátů bylo získáno z oddělení onkologie a oddělení hematologie a krevní transfuze. Téměř všechny izoláty nesly Tn1546 na plasmidu příbuzném pRUM. Tyto kmeny však postrádaly gen *axe-txe*. S tím se ovšem rozchází naše studie, ve které byl gen *axe-txe* na plasmidu příbuzném pRUM detekován v 5 izolátech (n=12; 42%). U všech nemocničních izolátů z Polska byly detekovány geny rep14<sub>pRI</sub>, rep17<sub>pRUM</sub> a gen rep<sub>pLGI</sub>. 16 izolátů byly pozitivní na rep2<sub>pRE25</sub>, u 15 izolátů byl detekován gen rep11<sub>pEF1071</sub>, u 19 izolátů byl pozitivní průkaz rep18<sub>pEF418</sub>, a u 18 izolátů byl detekován gen rep<sub>pMG1</sub>. Všechny plazmidy (kromě rep11<sub>pEF1071</sub>, který jsme netestovali) z izolátů v polských nemocnicích byly nalezeny i v našich izolátech. rep<sub>pMG1</sub> byl mezi našimi izoláty detekován celkem 7x, ostatní dva geny byly pozitivní u dvou dalších izolátů (z nichž jeden obsahoval rovnou oba dva). Nejčastější sekvenční typ polských izolátů *E. faecium* byl ST18. Nejčastější výskyt ST18 u vankomycin-rezistentních kmenů *E. faecalis* můžeme potvrdit i v naší studii, kdy se tento sekvenční typ vyskytoval ve 42 % izolátů.

### Šíření VRE a vanA genu

Šíření kmenů *Enterococcus faecium* nesoucích vanA gen, nacházející se na transpozonu Tn1546, živočišného původu na člověka popisují v dánské studii Lester a kol. (2006). Bylo testováno, zda bude *E. faecium* s vanA živočišného původu blokován vankomycin-citlivým *E. faecium* humánního původu. 6 dobrovolníků požilo oba druhy izolátů. Transkonjuganty byly získány u 3 z 6 dobrovolníků. V jednom případě byla zjištěna nejen rezistence k vankomycinu, ale také k jiným antibiotikům. Studie tedy ukazuje, že ve střevch člověka může dojít k převodu vanA genu z izolátů *E. faecium* živočišného původu do *E. faecium* izolátů humánního původu. VRE kmeny představují tak rezervoár s potenciálem zoonotického šíření vankomycin-rezistentních kmenů.

Norská studie Johnsen a kol., (2005) testovali vzorky trusu ze dvou švédských drůbežích farem, kde se dříve používal avoparcin. Vzorky se shromažďovaly po dobu jednoho roku z 3, po sobě nasazených, hejn. Popisují dlouhodobé přetrvání izolátů *E. faecium* s vanA genem lokalizovaným na Tn1546 v zemědělském prostředí.

Guardabassi a kol. (2002) popisují výskyt vankomycin-rezistentních enterokoků, pocházejících z průmyslové výroby vankomycinu. Kmeny VRE byly detekovány i na odtoku z čisírny dopoadních vod. Výsledky naznačují, že je třeba posoudit šíření VRE a dalších antibiotik-rezistentních kmenů prostřednictvím nedokonalé úpravy vody z průmyslu.

Výsledky naší studie se zdají být alarmující, a to hlavně díky četnosti výskytu plazmidů, nesoucích širokou škálu genů rezistence.

Eliminace těchto kmenů se zdá být málo reálná, ovšem je třeba se snažit alespoň omezit jeho šíření. A to hned v několika oblastech:

- Omezit používání glykopeptidových antibiotik ve zbytečných případech, a to zpřesněním jejich indikací nejen v humánní medicíně, ale i v medicíně veterinární. Cílem je dosáhnout snížení epidemiologického rizika vzniku a vzestupu rezistence k těmto antibiotickým látkám
- Zaměřit se na odpadové hospodářství v průmyslu a nemocnicích
- Užívání avoparcinu, jako růstového stimulantu v zemědělství

Zůstává samozřejmě otázkou, na kolik se výše uvedené obecné návrhy směřující k zamezení šíření rezistentních kmenů, mohou v praxi skutečně prosadit. Jejich realizace

vyžaduje mezioborovou spolupráci, přípravu lokálních směrnic a doporučení, včetně jejich důsledné implementace, a také nemalé ekonomické prostředky. Nicméně jsem přesvědčen, že analýzy takového druhu mohou, dostane-li se jim dostatečné publicity v odborných kruzích, přispět ke zkvalitnění antibiotické politiky, a tím alespoň částečně omezit negativní trendy ve vývoji rezistence k antibiotikům obecně.

## 8 Závěr

Díky svým vlastnostem jsou glykopeptidová antibiotika často vnímána jako rezervní přípravky pro léčbu těžkých infekcí vyvolaných gram-pozitivními bakteriemi.

Zvýšená spotřeba těchto antimikrobiálních látek se však následně projevila výskytem rezistencí u enterokoků. Ztráta účinnosti vankomycinu a teikoplaninu pak patří k závažným fenoménům, které přinášejí výrazné omezení volby klinicky účinných antibiotik u řady závažných onemocnění. V současné době není výskyt těchto glykopeptid-rezistentních kmenů jen otázkou nozokomiálních infekcí. Stále častěji se objevují studie mapující globální rozšíření těchto izolátů i do životního prostředí.

Předmětem této diplomové práce jsou vankomycin-rezistentní izoláty *E. faecium*, izolované z trusu amerických vran. U těchto izolátů byly pomocí metody PFGE detekován počet a velikost jednotlivých plazmidů. Pomocí PCR metody byly izoláty podrobeny detekci genů replikáz, relaxáz a toxin-antitoxin systému, které charakterizují plazmidy z jednotlivých plazmidových rodin. Dále byl pomocí PCR charakterizován typ transpozonů Tn1546.

Výsledky této diplomové práce dokumentují vysoké zastoupení plazmidů ve vankomycin-rezistentních izolátech *E. faecium*. Tato četnost hraje velkou roli v současné epidemiologii multirezistentních kmenů, zvláště pak, jedná-li se o klony s vyšším potenciálem šíření.

Pro efektivní kontrolu infekcí vyvolaných multirezistentními kmeny jsou analýzy a shromažďování těchto dat naprosto nezbytné.

## 9 Seznam zkratek

Ala	alanin
Angl.	Anglicky
ATB	antibiotikum
Bp	pár/páry bazí (ang. Base pairs)
DDT	diskový difúzní test
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
FVHE	Fakulta veterinární hygieny a ekologie
GRE	glykopeptid-rezistentní enterokoky
IS	inzerční sekvence (angl. Insertion sequences)
Lac	laktát
MGE	mobilní genetické elementy
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MLST	multilokusová sekvenační typizace (angl. Multi locus sequence typing)
PCR	polymerázová řetězová reakce (angl. Polymerase chain reaction)
PFGE	pulzní gelová elektroforéza (angl. Pulsed-Field Gel Electrophoresis)
pXXXX	označení plazmidu (např. pLG1)
Rel	relaxáza
Rep	replikáza
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ser	serin
TEs	transpozony (angl. Transposable elements)
TnXXX	označení transpozonu (např. Tn1546)
VRE	vankomycin-rezistentní enterokoky
VFU Brno	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

### Zkratky k tabulkám: 2, 3, 4

H	kmen z nemocnice(z angl. Hospital)
HH	zdraví lidé (healthy humas)
HHc	zdraví lidé-děti (helathy humans – children)
A	farmová zvířata (animals)
WA	divoká zvířata (wild animals)

F	jídlo (foods)
P	domácí zvířata (pets)
SW	z čističky odpadních vod (sewage)
NA	není k dispozici (Not available)
NI	neidentifikováno (Not identified)

Zkratky k původu izolátů

MA	Massachusetts
KS	Kansas
NY	New York
PEI	Ostrov prince Edwarda



## 10 Seznam literatury

Andrewes, F. W., Horder, T. J. 1906. A study of streptococci pathogenic for man. *Lancet*. 168 (4344). 1539-1540.

Arias, C. A., Contreras, G. A., Murray, B. E. 2010. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 16(6): 555-562.

Arias, C. A., Murray, B. E. 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 10(4): 266-278.

Arthur, M., Molinas, C., Courvalin, P. 1992. The VanS-VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *Journal of Bacteriology*. 174: 2582-2591.

Arthur, M., Molinas, C., Depardieu, F., Courvalin, P. 1993. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *Journal of Bacteriology*. 175: 117-127.

Ashford, P. A., Bew, S. P. 2012. Recent advances in the synthesis of new glycopeptide antibiotics. *Chemical Society Reviews*. 41: 957-978.

Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. 1996. Lékařská mikrobiologie. *Marvil*. 558s.

Bennett P. M. 1999. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 43: 1-4.

Bennett, P. M. 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*. 153(1): 347-357.

Bertelloni, F., Salvadori, C., Moni, A., Cerri, D., Mani, P., Ebani, V. V. 2015. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated from laying hens of backyard poultry flocks. *Anal. of Agricultural and Environmental Medicine*. 22(4): 665-669.

Bhagavan, N. V. 2002. Medical Biochemistry (4th edition). *Academy Press*, UK. 1016s. ISBN: 978-0-12-095440-7.

Brooks, G.f., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A. 2007. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 24th ed. *McGraw-Hill Medical*, USA. 832s. ISBN 13: 978-0-07-147666-9

Bush, K., Courvalin, P., Dantas, G., Davies, J., Eisenstein, B., Huovinen, P., Jacoby, G. A., Kishony, R., Kreiswirth, B. N., Kutter, E., Lerner, S. A., Levy, S., Lewis, K., Lomovskaya, O., Miller, J. H., Mobashery, S., Piddock, L. J. V., Projan, S., Thomas, Ch. M., Tomasz, A., Tulkens, P. M., Walsh T. R., Watson, J. D., Witkowski, J., Witte, W., Wright, G., Yeh, P., Butler, M. S., Hansford, K. A., Blaskovich, M. A. T., Halai, R., Cooper, M. A. 2014. Glycopeptide antibiotics: Back to the future. *The Journal of Antibiotics*. 67: 631-644.

Cambray, G., Guerout, A. M, Mazel, D. 2010. Integrons. *Annual Review of Genetics*. 44:141-166.

Campbell, N. A., Reece, J. B., Mitchell, L. G. 1999. Biology. 5th edition. *Benjamin-Cummings Pub Co*, USA. 1175s. ISBN-10: 0805330445.

Celli, J., Trieu-Cuot, P. 1998. Circularization of Tn916 is required for expression of the transposon-encoded transfer functions: characterization of long tetracycline-inducible transcripts reading through the attachment site. *Molecular Microbiology*. 28(1):103-117.

Collins, M. D., Jones, D., Farrow, J.A., Kilpper-Balz, R., Schleifer, K. H. 1984. *Enterococcus avium* nom. rev, comb. nov; *E. casseliflavus* nom. rev; *E. durans* nom. rev, comb. nov; *E. gallinarum* comb. nov; and *E. malodoratus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 34: 220-223.

- Collis, C. M., Hall, R. M. 1992. Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Molecular Microbiology*. 6: 2875-2885.
- Clewell, D. B., Francia, M. V. 2004. Conjugation in Gram-Positive Bacteria, s. 227-256. In Funnell, B. E., Phillips, G. J. (ed.), Plasmid Biology. *ASM Press*, Washington, DC. 614s. ISBN: 1555812651.
- Clewell, Don B., Weaver, K. E., Dunny, G. M., Coque T. M., Francia, M. V., Hayes, F. 2014. Extrachromosomal and Mobile Elements in Enterococci: Transmission, Maintenance, and Epidemiology. In: Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Ike, Y., Shankar, N. (eds.), Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Inetrnet]. *Massachusetts Eye and ear Infirmary*, Boston. 225-303.
- Cooper, T. F., Heinemann., J. A. 2000. Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 97: 12643-12648.
- Costa, Y., Galimand, M., Leclercq, R., Duval, J., Courvalin, P. 1993. Characterization of the chromosomal aac(6')-II gene specific for *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 37(9): 1896-1903.
- Dale, J. W., Park, S .F. 2004. Molecular genetics of bacteria, 4th ed. *John Wiley & Sons*, West Sussex. 358 s. ISBN: 978-0-470-09388-7.
- Davies, J. 2007. Microbes have the last word. A drastic re-evaluation of antimicrobial treatment is needed to overcome the threat of antibiotic-resistant bacteria. *EMBO Reorts*. 8(7):616-621.
- Davies, J., Davies, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 74(3):417-433.
- Devriese, L. A., Pot, B. 1995. In Wood, B. J. B., Holzapfel, W. H.(eds.), The General of Lactic Acid Bacteria. *Springer US*. ISBN: 978-1-4613-7666-8. 398s.

- Donabedian, S. M., Perri, M. B., Abdujamilova, N., Gordoncillo., M. J., Naqvi, A., Reyes, K. C., Zevros, M., Parlett, P. 2010. Characterization of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolated from Swine in Three Michigan Counties. *Journal of Clinical Microbiology*. 48(11): 4156-4160.
- Elipoulos, G. M., Gold, H. S. 2001. Vancomycin-Resistant Enterococci: Mechanisms and Clinical Observations. *Clinical Infectious Diseases*. 33(2):210-219.
- Facklam, R. R. G., Carvalho da M., Teixeira, L. M. 2002. History, Taxonomy, Biochemical Characteristics and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci. *In*: Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Courvalin, P., Dunny, G. M., Murray, B. E., Rice, L. B. (eds.), *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*. ASM Press, Washington, D. C. 1-54.
- Farrell, D. J., Mendes, R. E., Ross, J. E., Sader, H. S., Jones, R. N. 2011. LEADER Program Results for 2009: an Activity and Spectrum Analysis of Linezolid Using 6,414 Clinical Isolates from 56 Medical Centers in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55:3684-3690.
- Fletcher, S., Yu, W., Huang, J., Kwasny S. M., Chauhan, J., Opperman, T. J., MacKerell, A. D. Jr., Leeuw, E. P. H. 2015. Structure-activity exploration of a small-molecule Lipid II inhibitor. *Journal of Drug Design, Development and Therapy*.9: 2383-2394.
- Freitas, A. R. P. 2011. Ecology and evolution of antimicrobial resistance in *Enterococcus*: A multilayered molecular approach with emphasis in the plasmid diversity. TheThesis. *Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto*. 382s.
- Freitas, A. R., Coque, T. M., Novais, C., Hammerum, A., Lester, C. H., Zervos, M. J., Donabedian S., Jensen, L. B., Francia M. V., Baquero, F., Peixe, L. 2011. Human and Swine Hosts Share Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*CC17 and CC5 and *Enterococcus faecalis* CC2 Clonal Clusters Harboring Tn1546 on Indistinguishable Plasmids. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(3): 925-931.

- Freitas, A. R., Tedim, A. P., Francia, M. V., Peixe, L., Novais, C., Jensen, L. B., a kol. 2012. The spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (1986-2009): an historic view from the plasmid side. *In editorial revision*.
- Freitas, A. R., Novais, C., Tedim, A. P., Francia, M. V., Baquero, F., Peixe, L., a kol. 2013. Microevolutionary events involving narrow host plasmids influences local fixation of vancomycin-resistance in *Enterococcus*. *PLoS ONE*. 8(3):e60589.
- Friedman, L., Alder, J. D., Silverman, J. A. 2006. Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50(6): 2137–2145.
- Garcillan-Barcia, M. P., Francia M. V., Cruz, de la F. 2009. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiology Reviews*. 33:657-687.
- Gavaldà, J., Len, O., Miró, J. M., Muñoz, P., Montejo, M., Alarcón, A, a kol. 2007. Brief communication: treatment of *Enterococcus faecalis* endocarditis with ampicillin plus ceftriaxone. *Annals of Internal Medicine*. 146(8):574–579.
- Georgopapadakou, N. H., Liu, F. Y. 1980. Binding of beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis*: relation to antibacterial activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 18: 834-836.
- Goicoechea, P., Romo, M., Coque, T. M., Baquero, F., Cruz, de la F., Martínez-Martínez, L., Francia, M. V. 2008. Identification of enterococcal plasmids by multiplex-PCR-based relaxases typing. *18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Barcelona, Spain.
- Goessweiner-Mohr, N., Arends, K., Keller, W., Grohmann, E. 2014. Conjugation in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology Spectrum*. 2(4).

- Gonçalves, A., Igrejas, G., Radhouani, H., López, M., Guerra, A., Petrucci-Fonseca F., Alcaide, E., Zorrilla, I., Serra, R., Torres, C., Poeta, P. 2011. Detection of vancomycin-resistant enterococci from faecal samples of Iberian wolf and Iberian lynx, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST573. *Science of the Total Environment*.266-268.
- Gleckman, R., Blagg, N., Joubert, D. W. 1981. Trimethoprim: mechanisms of action, antimicrobial activity, bacterial resistance, pharmacokinetics, adverse reactions, and therapeutic indications. *Pharmacotherapy*. 1(1): 14-20.
- Grady, R., Hayes, F. 2003. Axe-Txe, a broad-spectrum proteic toxin-antitoxin system specified by a multidrug-resistant, clinical isolate of *Enterococcus faecium*. *Molecular Microbiol*. 47(5):1419–1432.
- Grohman, E., Muth, G., Espinosa, M. 2003. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.67(2): 277-301.
- Guardabassi, L., Brønnum, P.T., Danø, R., Forslund, A., Dalsgaard, A. 2002. Dissemination of vancomycin-resistant enterococci harboring vanA through disposal of waste derived from industrial production of vancomycin. *Microbial Drug Resistance*. 8(4): 401-416.
- Halvorsen, E. M., Williams, J. J., Bhimani, A. J., Billings, E. A., Hergenrother, P. J. 2011. Txe, an endoribonuclease of the enterococcal Axe-Txe toxin-antitoxin system, cleaves mRNA and inhibits protein synthesis. *Microbiology*. 157(2):387–397.
- Hartl, D. L., Jones, E. W. 1998. Genetics: Principles and Analysis. 4th edition. *Jones and Bartlett Publishers International*, UK. 1998. 840s. ISBN-10: 076370489X.
- Hacker, J., Carniel, E. 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Reports*. 2:376–381.
- Hollenbeck, B. L., Rice, L. B. 2012. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence*. 3(5): 421-569.

- Hong, H-J., Hutchings, M. I., Buttner, M. J. 2008. Vancomycin resistance VanS/VanR two-component systems. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 631:200–213.
- Horaud, T., Le Bouguenec, C., Pepper, K. 1985. Molecular genetics of resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin B (MLS) in streptococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 16: 111–135.
- Hrabák, J., Zemanová, A., Chudáčková, E. 2010. Mobilní genetické elementy v epidemiologii rezistence bakterií k antibiotikům. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie*. 59: 55-66.
- Hoz, de la B. A., Ayora, S., Sitkiewicz, I., Fernández, S., Pankiewicz, R., Alonso, J. C., Ceglowski, P. 2000. Plasmid copy-number control and better-than-random segregation genes of pSM19035 share a common regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(2):728-733.
- Huh, J., Y, Lee, W. G., Lee, K, Shin, W. S., Yoo, J. H. 2004. Distribution of insertion sequences associated with Tn1546-like elements among *Enterococcus faecium* isolates from patients in Korea. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 1897- 1902.
- Huycke, M. M. 2002. Physiology of Enterococci . *In*: Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Courvalin, P., Dunny, G. M., Murray, B. E., Rice, L. B. (eds.), *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*. ASM Press, Washington, D. C. 133-175.
- Chow, J. W. 2000. Aminoglycoside Resistance in Enterococci. *Clinical Infectious Diseases*. 31: 586-589.
- Chancey, S. T., Zähler, D., Stephens, D. S. 2012. Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. *Future Microbiology Journal*. 959-978.

- Janni re, L., Gruss, A., Ehrlich, S. D. 1993. Plasmids. *In*: Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., Losick, R. *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics. *American Society for Microbiology*, Washington, D. C. 1000 s. ISBN: 9781555818388.
- Jensen, L. B., Ahrens, P., Dons, L., Jones, R. N., Hammerun, A. M., Aestrup, F. M. 1998. Molecular analysis of Tn1546 in *Enterococcus faecium* isolated from animals and humans. *Journal of Clinical Microbiology*. 36:437- 442.
- Jensen, L. B., Garcia-Migura, L., Valenzuela, A. J. S., L hr, M., Hasman, H., Aestrup, F. M. 2010. A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 80:25-43.
- Johnsen, P. J., Osterhus, J. I., Sletvold, H., Sorum, M., Krause, H., Nielsen, K., Simonsen, G. S., Sundsfjord, A. 2005 Persistence of animal and human glycopeptideresistant enterococci on two Norwegian poultry farms formerly exposed to avoparcin is associated with a widespread plasmid mediated *vanA* element within a polyclonal *Enterococcus faecium* population. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:159-168.
- Juhas, M., Meer, van der J. R., Gaillard, M., Harding, R. M., Hood, D. W., Crook, D. W. 2009. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer evolution. *FEMS Microbiology Reviews*. 33(2):379-393.
- Khan, S. A. 1997. Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61: 442-455.
- Kang, J. H., Lee, M. S. 2005. Characterization of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. *Journal of Applied Microbiology*.98(5): 1169-1176.
- Kornberg, A., Baker, T. 2007. DNA replication. *In*: Snyder, L., Champness, W., Molecular genetics of bacteria. 3rd ed. *ASM Press*, Washington, D.C., 735 s. ISBN: 1555813992.



- Kozłowicz, B. K., Dworkin, M., Dunny, M. G. 2006. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: a model for the evolution of biological complexity? *International Journal of Medical Microbiology*. 296:141-7.
- Kristich, C. J., Rice, L. B., Arias, C. A. 2014. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. *In*: Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Ike, Y., Shankar, N. (eds.), *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. *Massachusetts Eye and ear Infirmary*, Boston. 89-134.
- Launay, A, Ballard, S.A., Johnson, P. D., Grayson, M. L., Lamert, T. 2006. Transfer of vancomycin resistance transposon Tn1549 from *Clostridium symbiosum* to *Enterococcus* spp. in the gut of gnotobiotic mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50: 1054-1062.
- Laverde, G. J. A., Schaik, van W., Freitas, A. R., Cowue, T. M., Weaver, K. E., Francia M. V., Witte, W., Werner, G. 2011. A multiresistance megaplasmid pLG1 bearing a *hyl*(Efm) genomic island in hospital *Enterococcus faecium* isolates. *International Journal of Medical Microbiology*. 301: 165-175.
- Lebreton, F., Willems, R. J. L., Gilmore, M. S. 2014. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. *In*: Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Ike, Y., Shankar, N. (eds.), *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. *Massachusetts Eye and ear Infirmary*, Boston. 1-46.
- Leadbetter, M. R., Adams, S. M., Bayyini, B., Fatheree, P. R., Karr, D. E., Krause, K. M., Lam, B. M., Linsell, M. S., Nodwell, M. B., Pace, J. L., Quast, K., Shaw, J. P., Soriano, E., Tapp, S. G., Villena, J. D., Wu, T. X., Christensen, B. G., Judice, J. K. 2004. Hydrophobic vancomycin derivatives with improved ADME properties: discovery of telavancin (TD-6424). *Journal of antibiotics (Tokyo)*. 57(5): 326–336.
- Lederberg, J. 1950. Cell genetics and hereditary symbiosis. *Physiological Reviews*.32: 403-430.
- Leplae, R., Hebrant, A., Wodak, S. J., Toussiant, A. 2004. A Classification of Mobile genetic Elements. *Nucleic Acids Research*. 32 (Database issue): D45-D49.

- Lester, C. H., Frimodt-Møller, N., Sørensen, T. L., Monnet, D. L., Hammerum, A. M. 2006. In Vivo Transfer of the *vanA* Resistance Gene from an *Enterococcus faecium* Isolate of Animal Origin to an *E. faecium* Isolate of Human Origin in the Intestines of Human Volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50(2): 596-599.
- Levine, D. P. 2006. Vancomycin: A History. *Clinical Infectious Diseases*. 42: 5-12.
- Livermore, D. M 2009-. Has the era of untreatable infections arrive? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 64: 29-36.
- Llosa, M., Gomis-Ruth., F. X., Coll, M., Cruz, de la F. 2002. Bacterial conjugation: a two step mechanism for DNA transport. *Molecular Microbiology*: 45: 1-8.
- Maccallum, W. G., Hastings, T. W. 1899. A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* (Nov. Spec.), with a description of the microorganism. *Journal of Experimental Medicine*.4:521-534.
- Mahillon, J., Chandler, M. 1998. Insertion Sequences. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3):725-774.
- Malachowa, N., DeLeo, F. R. 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences*.67 (18):3057-3071.
- Martone, W., J. 1998. Spread of vancomycin-resistant enterococci: why did it happen in the United States? *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 19(8): 539-545.
- Mascaretti, O.A. 2003. Bacteria versus Antibacterial Agents. *ASM Press*, NW, Washington DC 2003. 420s. ISBN: 1555812589
- Mederski-Samoraj, B. D., Murray, B. E. 1983. High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of enterococci. *Journal of Infectious Diseases*. 147: 751-757.

- Moellering, R. C. Jr., Weinberg, A. N. 1971. Studies on antibiotic synerism against enterococci. II. Effect of various antibiotics on the uptake of <sup>14</sup>C-labeled streptomycin by enterococci. *Journal of Clinical Investigation*. 50: 2580–2584.
- Moreno, M. R. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., Vuyst, de L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 106: 1-24.
- Moritz, E. M., Hergenrother, P. J. 2007. Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and plasmid-encoded in vancomycin-resistant enterococci. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 104: 311-316.
- Muñoz-López, M., García-Pérez, J. L. 2010. DNA Transposons: Nature and Applications. in Genomics. In: Dale, W. J., Simon, F P. *Molecular Genetics of Bacteria* 4th Edition. The *Willey Advantage*. 358 s. ISBN: 978-0-470-09388-7.
- Murray, B. E., Mederski-Samaroj, B. 1983. Transferable beta-lactamase. A new mechanism for in vitro penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*. *Journal of Clinical Investigation*. 72: 1168-1171
- Murray, B. E. 1992. Beta-lactamase-producing enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 36: 2355-2359.
- Murray B. E., Weinstock G. M. (1999): Enterococci: new aspects of an old organism. *Proceedings of the Association of American Physicans*. 111(4): 328-334.
- Nagarajan, R. 1991. American Society for Microbiology Antibacterial Activities and Modes of Action of Vancomycin and Related Glycopeptides. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 35(4): 605–609.
- Nes, I. F., Diep, D. B., Holo, H. 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Bacteriology*. 189: 1189-1198.

- Neu, H. C. 1987. Penicillin-binding proteins and beta-lactamases: their effects on the use of cephalosporins and other new beta-lactams. *Current clinical topics in infectious diseases Journal* 8: 37-61.
- Nicolas, E., Lambin, M., Dandoy, D., Galloy, C., Nguyen, N., Oger, C. A., Hallet, B. 2015. The Tn3-family of Replicative Transposons. *Microbiology Spectrum*. 3(4).
- Nilsson, O., Greko, C., Bengtsson B., Englund, S. 2012. Genetic diversity among VRE isolates from Swedish broilers with the coincidental finding of transferrable decreased susceptibility to narasin. *The Society for Applied Microbiology*. 112:716-722.
- Norman, A., Hansen, L. H., Sørensen, S. J. 2009. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 264(1527): 2275-2289.
- Novais, C. 2005Epidemiologia da resistência aos antibióticos em *Enterococcus* spp. Portugueses de origem humana, animal e ambiental (Doctoral Thesis). Faculdade deFarmácia, Universidade do Porto, Porto.
- Oravcova, V., Zurek, L., Townsend, A., Clark, A. B., Cizek, A., Literak, I. 2014a. American Crows as carriers of vancomycin-resistant enterococci with *vanA* gene. *Environmental Microbiology*.16(4): 939-949.
- Oravcova, V., Janecko, N., Ansorge, A., Masarikova, M., Literak, I. 2014b. First record of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Canadian wildlife. *Environmental microbiology reports*.6(3):210-211.
- Osborn, M., Bron, S., Firth, N., Holsappel, S., Huddleston, A., Kiewiet, R., Meijer, W., Seegers, J., Skurrsy, R., Terpstra, P., Thomas, C. M., Thorsted, P., Tietze, E., Turner, S. L. 2000. The evolution of bacterial plasmids, s. 301-362. *In: Thomas, C. M. (ed.), Bacterial plasmids and gene spread. Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 444s. ISBN 9780203304334.*

- Ramsey, M., Hartke, A., Huycke, M. 2014. The Physiology and Metabolism of Enterococci. In: Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Ike, Y., Shankar, N. (eds.), *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. *Massachusetts Eye and ear Infirmary*, Boston. 424-465.
- Reid, K. C., Cockerill, F. R., Patel, R. 1999. Clinical and Epidemiological Features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* Bacteremia: A Report of 20 Cases. *Clinical Infectious Diseases*. 32: 1540-1546.
- Reynolds, P. E. 1989. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 8(11):943-950.
- Reynolds, P. E., Depardieu, F., Dutka-Malen, S., Arthur, M., Courvalin, P. 1994. Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon Tn1546 requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. *Molecular Microbiology*. 13: 1065–70.
- Ribeiro, T., Santos, S., Marques, M. I., Gilmore, M., de Fátima S. L. M. 2011. Identification of a new gene, vanV, in vanB operons of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 37:554-557.
- Roberts, A. P., Chanpodler, M., Courvalin, P., Guédon, G. 2008. Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid*. 60: 167-173.
- Rosvoll, T. C., Pedersen, T., Sletvold, H., Johnsen, P. J., Sollid, J. E., Simonsen, G. S., a kol. 2010. PCR-based plasmid typing in *Enterococcus faecium* strains reveals widely distributed pRE25-, pRUM-, pIP501- and pHT $\beta$ -related replicons associated with glycopeptide resistance and stabilizing toxin–antitoxin systems. *FEMS Immunology and Medical Microbiol.* 58(2): 254–268.
- Shaaly, A., Kalamorz, F., Gebhard, S., Cook, G. M. 2013. Undecaprenyl pyrophosphate phosphatase confers low-level resistance to bacitracin in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 68(7): 1583-1593.

- Seifert, J. L. 2009. Defining the mobilom, s. 489-500. *In: Gogarten, M.B., Gogarten, J.P., Olendzenski, L. (Eds.), Horizontal gene transfer: genomes in flux. Humana Press, New York. 552s. ISBN: 1603278524*
- Sherman, J. M. 1937. The Streptococci. *Bacteriological Reviews*. 1(1): 3-97.
- Scholz, P., Haring, V., Wittmann-Liebold, B., Ashman, K., Bagdasarian, M., Scherzinger, E. 1989. Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene*. 75:271–288.
- Silva, N., Igrejas, G., Rodrigues, P., Rodrigues T., Gonçalves A., Flegar, A. C., Pacheco, R., Gonçalves, D., Cunha, R., Poeta, P. 2011. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-containing *Escherichia coli* isolates in wild birds from the Azores Archipelago. *Avian Pathology*. 40(5): 473-479.
- Simjee, S., White, D. G., McDermott., P. F., Wagner, D. D., Zevros, M. J., Donabedian, S. M., English, L. L., Hayes, J. R., Walker, R. D. 2002. Characterization of Tn1546 in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolated from Canine Urinary Tract Infections: Evidence of Gene Exchange between Human and Animal Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(12): 4659-4665.
- Smillie, C., Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P., Cruy, de la F. 2010. Mobility of plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 74: 434-452.
- Snyder, L., Champness, W. 2007. Molecular genetics of bacteria. 3rd ed. *ASM Press, Washington, D. C., 735 s. ISBN: 1555813992.*
- Solar, del G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M. J., Espinosa, M., Díaz-Orejas, R. 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(2): 434-464.
- Tankovic, J., Mahjobi, F., Courvalin, P., Duval, J., Leclercq, R. 1996. Development of fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis* and role of mutations in the DNA gyrase *gyrA* gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40(11): 2558-2561.

- Teixeria, L. M., Merquior, V. L. C. 2013. *Enterococcus*. In Filippis, de I., McKee, M. L. (eds.), Molecular Typing in Bacterial Infections. *Infectious Disease*. 17-26.
- Tomita, H., Tanimoto, K., Hayakawa, S., Morinaga, K., Ezaki, K., Hisaji, O., Ike, Y. 2003. Highly conjugative pMG1-like plasmids carrying *Tn1546*-like transposons that encode vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Journal of Bacteriology*. 185(23): 7024-7028.
- Thompson, J. K., Collins, M. A. 2003. Completed sequence of plasmid pIP501 and origin of spontaneous deletion derivatives. *Plasmid*. 50: 28-35.
- Venkova-Canova, T., Pátek, M., Nešvera, J. 2003. Control of *rep* Gene Expression in Plasmid pGA1 from *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*. 185(8): 2402-2409.
- Votava, M. 2001. Lékařská mikrobiologie obecná. *Neptun*, Brno. 247s. ISBN 8090289622.
- Wardal, E., Markowska, K., Zabicka, D., Wróblewska, M., Gimza, M., Mik, E., Polovniak-Pracka, H., Wozniak, A., Hryniewicz, W., Sadowy, E. 2012. Molecular Analysis of VanA Outbreak of *Enterococcus faecium* in Two Warsaw Hospitals: The Importance of Mobile Genetic Elements. *BioMed Research International*. Article ID575367, 12s.
- Weaver, K. E., Kwong, S. M., Firth, N., Francia, M. V. 2009. The RepA\_N replicons of Gram-positive bacteria: a family of broadly distributed but narrow host range plasmids. *Plasmid*. 61:97-109.
- Werner, G., Coque, T. M., Hammerum, A. M., Hope, R., Hryniewicz, W., Johnson, A., Klare, I., Kristinsson, K. G., Leclercq, R., Lester, C. H., Lillie, M., Novais, C., Olsson-Liljequist, B., Peixe, L. V., Sadowy, E., Simonsen, G. S., Top, J., Voupio-Varkila, J., Willems, R. J., Witte, W., Woodford, N. 2008. Emergence and spread of vancomycin resistance among Enterococci in Europe. *Eurosurveillance*. 13(47).

- Willems, R. J., Top, J., van Saten, M., Robinson, D. A., Coque, T. M., Baquero, F., Grundmann, H., Bonten, M. J. 2005. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 11(6):821-828.
- Witte, W. 1998. Medical Consequences of Antibiotic Use in Agriculture. *Science*. 279(5353): 996-997.
- Witte, W., Wirth, R., Klare, I. 1999. Enterococci. *Chemotherapy*.45(2): 135-145.
- Woodford, N., Adebisi, A. M., Palepou, M. F., Cookson, B. D. 1998. Diversity of VanA glycopeptide resistance elements in enterococci from humans and nonhuman sources. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42:502-508.
- Yim, G., Thaker, M. N., Koteva, K., Wright, G. 2014. Glycopeptide antibiotics biosynthesis. *Journal of Antibiotics*. 67: 31-41.
- Zapoun, A., Contreras-Martel, C., Vernet, P. 2008. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiology Reviews*.32: 361-385.
- Zechner, E. L. a kol. 2000. Conjugative-DNA processes. In: Thomas, C. M. (ed.), Bacterial plasmids and gene spread. *Harwood Academic Publishers*, Amsterdam. 444s. ISBN 9780203304334.
- Zhu, W., Murray, P. R., Huskins, W. Ch., Jernigan, J. A., McDonald, L. C., Clark, N. C., Anderson, K. F., McDougal, L. K., Hageman, J. C., Olsen- Rasmussen, M., Frace, M., Alangaden G. J., Zevros, M. J., Robinson-Dunn, B., Schreckenberger, P. C., Reller, L. B., Rudrik, J. T., Patel, J. B. 2010. Dissemination of an *Enterococcus* Inc18-Like *vanA* Plasmid Associated with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54(10): 4314-4320.
- Zuniga, M., Prado, I., Ferrer, S. 2003. Conjugative plasmid pIP501 undergoes specific deletions after transfer from *Lactococcus lactis* to *Oenococcus oeni*. *Archives of Microbiology*. 180:367-373.



Internetové odkazy:

HTML1: Bambeke, Van F., Virgincar, N., MacGowan, A. Glycopeptides (Dalbavancin, Oritavancin, Teicoplanin, Telavancin, Vancomycin). [citováno 2016\_03\_05]. Dostupné z: <<http://www.antimicrobe.org/d14.asp>>

HTML2: Peptidoglykan [citováno 2013\_03\_11]. Dostupné z: <<http://mikrobiologie.xf.cz/files/peptidoglykan.doc.html>> citováno dne 11.3.2016)