



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VÝZNAM, VÝSKYT A DETERMINANTY  
HORIZONTÁLNĚ PŘENOSNÉ REZISTENCE KE  
KOLISTINU U GRAM NEGATIVNÍCH BAKTERIÍ**

SIGNIFICANCE, OCCURRENCE AND DETERMINANTS OF HORIZONTALLY TRANSMISSIBLE  
COLISTIN RESISTANCE IN GRAM NEGATIVE BACTERIA

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Bc. Karolína Kislíková

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2019

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1303/2018  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Karolína Kislíková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**  
Akademický rok: 2018/19

### Název diplomové práce:

Význam, výskyt a determinanty horizontálně přenosné rezistence ke kolistinu u Gram negativních bakterií

### Zadání diplomové práce:

Cílem práce řešené na externím pracovišti – Výzkumném ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. v Brně je objasnit, zda se u G– bakterií izolovaných z non–humánních zdrojů vyskytuje nově popsaná horizontálně přenosná rezistence ke kolistinu kódovaná geny mcr.

V rámci práce budou provedeny následující dílčí úkoly:

- přehledná literární rešerše zaměřená na význam horizontálně přenosné rezistence ke kolistinu, determinanty tohoto typu rezistence a jejich rozšíření, metody detekce bakterií nesoucích geny mcr
- zvládnutí metod detekce, identifikace a charakterizace kmenů
- laboratorní analýza vzorků zakoupených z tržní sítě, případně z dalších zdrojů
- vyhodnocení výsledků a stanovení nejvýznamnějších zdrojů a cest šíření tohoto typu rezistence v ČR.

### Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

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

---

Bc. Karolína Kislíková  
student(ka)

---

doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D.  
vedoucí práce

---

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

---

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## Abstrakt

Kolistín, označovaný aj ako polymyxín E, je účinným antibiotikom proti väčšine gramnegatívnym baktériam a v súčasnej dobe sa používa ako liek poslednej voľby na terapiu infekcií spôsobených multirezistentnými baktériami. Objavenie plazmidom sprostredkovej rezistencie proti kolistínu kódovanej génom *mcr-1* v roku 2015 v Číne predstavuje veľkú hrozbu. Postupom času boli opísané ďalšie *mcr* gény: *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7* a *mcr-8*, ktoré sú rozšírené už po celom svete. Cieľom tejto diplomovej práce bolo objasniť výskyt horizontálne prenosnej rezistencie proti kolistínu kódovanej génmi *mcr* pri gramnegatívnych baktériách izolovaných zo životného prostredia, zvierat a prostredia ich chovu a potravín. Gén *mcr-1* bol detegovaný v 2 izolátoch *Escherichia coli* zo vzoriek odpadovej vody. Gén *mcr-4* bol detegovaný v 1 izoláte *Shewanella putrefaciens* z vody rybníka. Najvýznamnejším zdrojom a cestou šírenia tohto typu rezistencie v Českej republike je životné prostredie.

## Kľúčové slová

kolistín, *mcr*, antimikrobiálna rezistencia, mechanizmy rezistencie, plazmidy, gramnegatívne baktérie

## **Abstract**

Colistin, also known as polymyxin E, is antibiotics active against most of Gram-negative bacteria. In the pas decade, emergency of multidrug-resistant bacteria led to increase of colistin administration as a last resort antibiotic for human infections. The first plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* was identified in 2015 in animals in China and after first detection, additional *mcr* genes: *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7* a *mcr-8* were described throughout the world. The aim of this thesis was to clarify whether there is horizontal transmission colistin resistance encoded by the *mcr* genes in gram-negative bacteria isolated from the environment, animals and their breeding and food. The *mcr-1* gene was detected in 2 strains *Escherichia coli* isolated from waste water. The *mcr-4* gene was detected in 1 strain *Shewanella putrefaciens* isolate obtained from the lake. The environment is the most important source and way of spreading this type of resistance in the Czech Republic.

## **Key words**

colistin, *mcr*, antimicrobial resistance, mechanisms of resistance, plasmids, gram negative bacteria

KISLÍKOVÁ, Karolína. *Význam, výskyt a determinanty horizontálně přenosné rezistence ke kolistinu u Gram negativních bakterií*. Brno, 2019. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/116104>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

## **PREHLÁSENIE**

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

..... podpis študenta

## **POĎAKOVANIE**

Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať externému pracovisku – Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i. v Brně za poskytnutie diplomovej témy a možnosť jej realizácie v ich laboratórnym priestoroch. Moja veľká vďaka patrí Mgr. Alžběte Barákovej a MVDr. Barbore Dzugasovej za ich rady a pomoc pri písaní tejto diplomovej práce.

# Obsah

Úvod .....	8
1 Teoretický prehľad .....	9
1.1 Kolistín – antibiotikum poslednej voľby .....	9
1.1.1 Spektrum účinnosti .....	9
1.1.2 Štruktúra kolistínu .....	10
1.1.3 Mechanizmus účinku .....	11
1.1.4 Mechanizmus rezistencie proti kolistínu .....	13
1.2 Rezistencia proti kolistínu kódovaná génmi <i>mcr</i> .....	16
1.2.1 Gén <i>mcr-1</i> .....	16
1.2.2 Ďalšie známe gény kódujúce rezistenciu proti kolistínu .....	22
1.2.3 Detekcia rezistencie proti kolistínu .....	24
2 Cieľ práce .....	27
3 Metodika práce a metódy skúmania .....	28
3.1 Materiál .....	28
3.1.1 Charakteristika vzoriek .....	28
3.1.2 Použité médiá, chemikálie, reagenty .....	31
3.1.3 Použité prístroje a pomôcky .....	33
3.2 Metódy .....	33
3.2.1 Spracovanie vzoriek .....	33
3.2.2 Izolácia DNA pomocou Blood and tissue kitu .....	33
3.2.3 Detekcia vybraných génov rezistencie .....	34
3.2.4 Detekcia PCR produktu gélovou elektroforézou .....	35
3.2.5 Izolácia DNA – lýza varom .....	35
3.2.6 Identifikácia MALDI-TOF MS .....	36
4 Výsledky práce a diskusia .....	37

4.1	Životné prostredie .....	37
4.2	Zvieratá a prostredie chovu.....	41
4.3	Potraviny .....	42
5	Záver.....	45
6	Zoznam použitej literatúry .....	46
7	Zoznam použitých skratiek .....	54



# Úvod

Kolistín, nazývaný aj ako polymyxín E, je polypeptidové antibiotikum, ktoré sa využíva predovšetkým pre účely veterinárnej medicíny. V humánnej medicíne bolo jeho používanie obmedzené kvôli nefrotoxícite a neurotoxícite. Narastajúci výskyt gramnegatívnych multirezistentných baktérií však viedol k opätovnému zavedeniu kolistínu v humánnej medicíne ako lieku poslednej voľby (Beneš, 2018; Rebelo a kol., 2018).

Gramnegatívne baktérie ako *Proteus*, *Serratia*, *Morganella* alebo *Moraxella* sa vyznačujú prirodzenou rezistenciou proti kolistínu (Poirel a kol., 2017). Sekundárna rezistencia proti kolistínu bola charakterizovaná predovšetkým chromozómovými mutáciami a nepredpokladalo sa, že by mohla byť prenášaná pomocou mobilných genetických elementov. Najčastejším mechanizmom kolistínu je modifikácia lipidu A, ktorý je súčasťou lipopolysacharidov, avšak k rezistencii prispievajú aj efluxné pumpy, poríny či kapsulárny polysacharid (Baron a kol., 2016).

V roku 2015 v Číne bol prvýkrát identifikovaný plazmidom sprostredkovaný gén *mcr-1* zodpovedný za horizontálny prenos rezistencie proti kolistínu (Liu a kol., 2016). V krátkom čase bol gén *mcr-1* zaznamenaný u baktérií z čeľade *Enterobacteriaceae* vo viac ako 40 krajinách po celom svete. Mikroorganizmy pozitívne na výskyt tohto génu boli izolované z rôznych zdrojov: životné prostredie, hospodárske zvieratá, potraviny ale aj z infikovaných ľudských pacientov (Baron a kol., 2016). Postupne boli opísané ďalšie *mcr* gény: *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7* a *mcr-8* (Wang a kol., 2018).

Objavenie plazmidom sprostredkovanej rezistencie proti kolistínu vyvolalo medzinárodne obavy, pretože rezistentné gény majú potenciál ďalšieho šírenia, čo by mohlo viesť k zníženiu účinnosti kolistínu ako lieku poslednej voľby. Rozšírenie rezistencie proti kolistínu predstavuje riziko aj v oblasti, kde je vysoký výskyt multirezistentných baktérií (Rebelo a kol., 2018).

Na základe týchto faktov cieľom tejto diplomovej práce bolo objasniť, či sa pri gramnegatívnych baktériách izolovaných z non-humánných zdrojov vyskytuje horizontálne prenosná rezistencia proti kolistínu kódovaná génmi *mcr*.

# 1 Teoretický prehľad

## 1.1 Kolistín – antibiotikum poslednej voľby

Kolistín (polymyxín E) je polypeptidové antibiotikum, ktoré bolo prvýkrát izolované v roku 1947 z pôdnej baktérie *Peanibacillus polymyxa* var. *colistinus* (Catry a kol., 2015). Okrem kolistínu boli izolované ďalšie štyri skupiny polymyxínov (A, B, C, D), pričom v klinickej praxi sa používa iba polymyxín E (kolistín) a polymyxín B (Beneš, 2008). Kolistín bol v minulosti využívaný predovšetkým pre účely veterinárnej medicíny v ázijských, európskych a severoamerických krajinách. V humánnej medicíne bolo jeho používanie značne obmedzené kvôli jeho nežiadúcim účinkom – nefrotoxícite a neurotoxícite. Množstvo a závažnosť nežiadúcich účinkov bol opísaný častejšie v literatúre z 60. – 70. rokov a ich výskyt závisel na dávke lieku. V súčasnosti sa však kolistín javí ako rovnaký, dokonca menej toxický ako aminoglykozidy (Beneš, 2018; Rebelo a kol., 2018). Narastajúci výskyt gramnegatívnych multirezistentných baktérií (napr. *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*) viedol k opätovnému zavedeniu a zvýšenému podávaniu kolistínu v humánnej medicíne ako lieku poslednej voľby (Rebelo a kol., 2018).

### 1.1.1 Spektrum účinnosti

Kolistín sa vyznačuje širokospektrálnou aktivitou proti gramnegatívnym aeróbne rastúcim baktériám ako je *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp. A *Shigella* spp. Významnú aktivitu má aj proti bežným nefermentujúcim gramnegatívnym baktériám ako je *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Stenotrophomonas maltophilia* (Poirel a kol., 2017; Beneš, 2018). Uvádza sa, že kolistín je potenciálne účinný aj proti niekoľkým mykobaktériám, ako sú napr. *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium phlei* a *Mycobacterium smegmatis* (Falagas a kol., 2005).

Baktérie ako *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Serratia marcescens*, *Pseudomonas mallei*, *Vibrio cholerae*, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium* spp., *Edwardsiella* spp. a *Brucella* sa vyznačujú prirodzenou rezistenciou proti kolistínu. Kolistín však nie je účinný proti väčšine gramnegatívnym kokom (*Neisseria* spp.), grampozitívnym baktériám a anaeróbnym baktériám (tab. 1) (Poirel a kol. 2017).

**Tab. 1:** Spektrum účinku kolistínu (Beneš, 2018, upravené)

Skupina	Obvykle účinný	Účinný <i>in vitro</i> <sup>1</sup>	Neúčinný
Enterobaktérie (rody)	<i>Escherichia</i> <sup>2</sup> <i>Klebsiella</i> <sup>2</sup> <i>Enterobacter</i> <i>Citrobacter</i>	<i>Salmonella</i> <i>Shigella</i>	<i>Proteus</i> <i>Providencia</i> <i>Morganella</i> <i>Serratia</i>
Nefermentujúce tyčinky (rody)	<i>Pseudomonas</i> <i>Acinetobacter</i>		<i>Burkholderia</i> <i>Stenotrophomonas</i>
Ostatné (rody)		<i>Haemophilus</i> <i>Bordetella</i> <i>Legionella</i>	<i>Neisseria</i> <i>Moraxella</i> <i>Helicobacter</i>

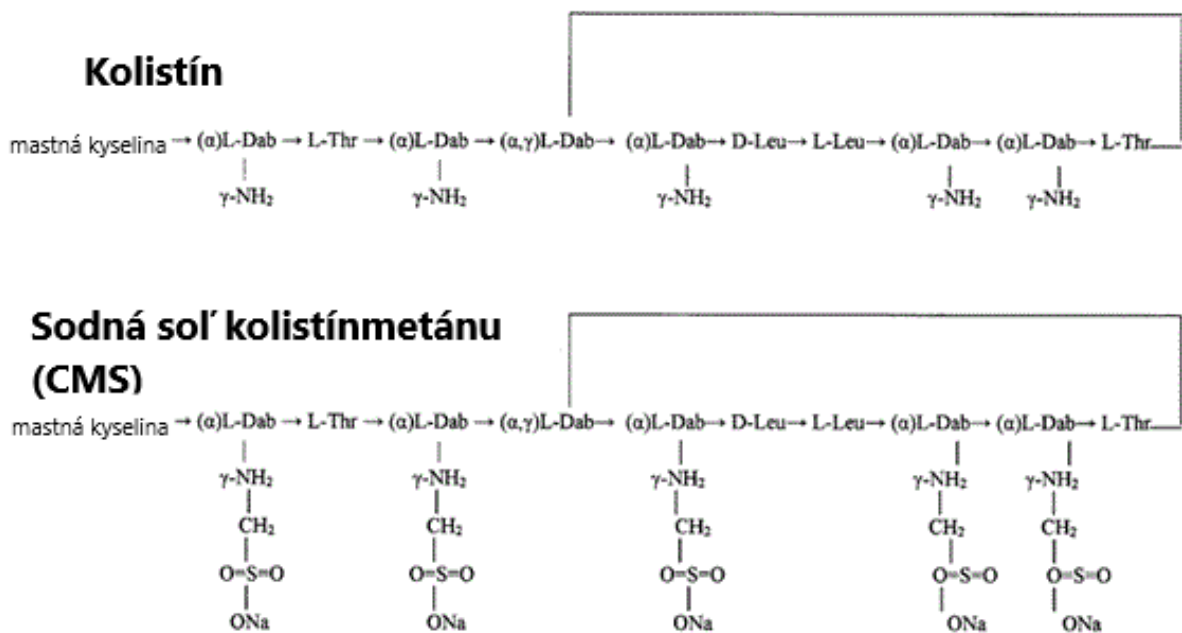
<sup>1</sup> účinnosť *in vivo* je sporná, vzhľadom k ťažšiemu prieniku kolistínu do organizmu

<sup>2</sup> účinnosť na opúzdrené kmene je výrazne znížená

### 1.1.2 Štruktúra kolistínu

Polymyxíny sú kationové polypeptidy, ktoré sa skladajú z cyklického heptapeptidu s tripeptidovým bočným reťazcom acylovaným na N-konci skupinou mastných kyselín (Poirel a kol., 2017). Kolistín pozostáva z kationového cyklického dekaeptidu viazaného na reťazec mastnej kyseliny prostredníctvom  $\alpha$ -amidovej väzby. Aminokyselinové zložky v molekule kolistínu sú D-leucín, L-treonín a kyselina L- $\alpha$ - $\gamma$ -diaminomaslová (obr. 1). Kolistín obsahuje chemicky podobné molekuly (kolistín A, kolistín B), ktoré sa líšia acylovou skupinou na N-konci (obr.1). Kolistín A obsahuje acylovú skupinu (S)-6-metyloktanoyl a kolistín B obsahuje acylovú skupinu 6-metylheptanoyl. Farmaceutické prípravky kolistínu môžu obsahovať rôzne množstvá týchto dvoch zložiek (Orwa a kol., 2001).

V humánnej medicíne sú dostupné dve formy kolistínu: kolistín–sulfát a jeho prekursor sodná soľ kolistínmetánu (CMS). CMS je menej účinný a menej toxický ako kolistín–sulfát a vzniká reakciou kolistínu s formaldehydom a hydrogensiričitanom sodným, pričom dochádza k adícii sulfometylovej skupiny na primárne amíny kolistínu (obr. 1) (Barnett a kol., 1964). Svoju antibakteriálnu aktivitu získava až po podaní, kedy sa hydrolyzuje na kolistín (Catry a kol., 2015). CMS je dostupný v parentálnej forme a môže byť podávaný intravenózne, intramuskulárne alebo nebulizáciou (Falagas a kol., 2005).



**Obr. 1:** Chemická štruktúra kolistínu a sodnej soli kolistínmetánu (Falagas a kol., 2005, upravené)

### 1.1.3 Mechanizmus účinku

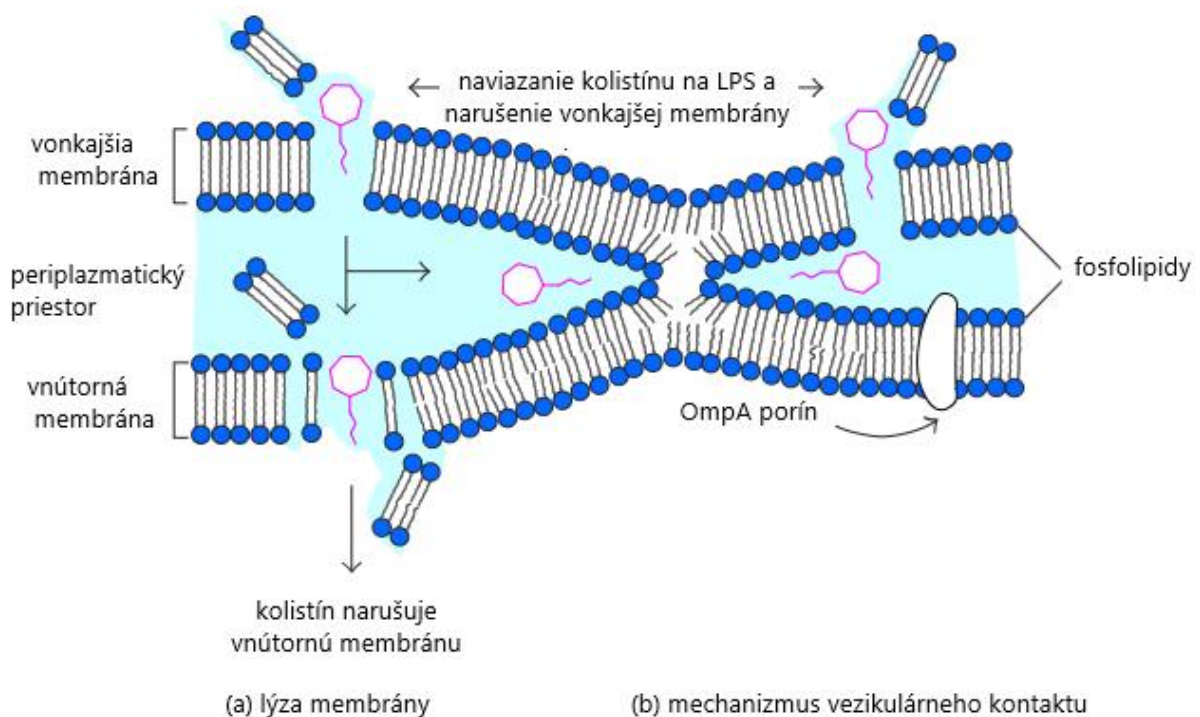
Mechanizmus účinku kolistínu v súčasnosti ešte nie je kompletne opísaný. Výskumy opisujúce mechanizmy účinku boli uskutočnené na polymyxíne B. Kolistín a polymyxín B sa od seba líšia jednou aminokyselinou v peptidovom kruhu (polymyxín B obsahuje fenylalanín, kolistín obsahuje leucín) (Poirel a kol., 2017). Z dôvodu podobnej štruktúry sa predpokladá že mechanizmus účinku bude identický (Li a kol., 2005).

Počiatočným miestom účinku kolistínu je vonkajšia membrána baktérií. V dôsledku elektrostatických interakcií medzi kladne nabitou molekulou kyseliny  $\alpha$ - $\gamma$ -diaminomaslovej a negatívne nabitými fosfátovými skupinami membránových lipidov dochádza k vytesneniu dvojmočných katiónov ( $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ ) zo záporne nabitých fosfátových skupín membránových lipidov (Poirel a kol., 2017; Falagas a kol., 2005). Dochádza k destabilizácii lipopolysacharidov (LPS), čo vedie k strate bariérovej funkcie, úniku intracelulárnych zložiek, vyrovná sa protónový gradient na membráne a dochádza k metabolickej smrti baktérie (obr. 2) (Beneš, 2018).

Ďalším antibakteriálnym mechanizmom kolistínu je anti-endotoxínová aktivita. Kolistín má schopnosť neutralizovať bakteriálny endotoxín počas lýzy buniek naviazaním na LPS. Význam tohto mechanizmu spočíva v prevencii endotoxínového šoku (Li a kol., 2005).

Kolistín je taktiež schopný inhibovať respiračný enzým NADH-chinón oxidoreduktázu typu II (NDH-2) (Deris a kol., 2014).

Alternatívnym mechanizmom účinku kolistínu je tzv. vezikulárny kontakt. Predpokladá sa, že kolistín je schopný vytvoriť kontakt medzi periplazmatickou vrstvou vonkajšej a vnútornej membrány. Pomocou elektrostatickej interakcie dochádza k výmene fosfolipidov čo vedie k narušeniu osmotickej rovnováhy a lýze bunky (obr. 2). Nové štúdie poukazujú na schopnosť kolistínu vyvolať smrť bunky prostredníctvom akumulácie hydroxylového radikálu ( $\cdot\text{OH}$ ) (Yu a kol., 2015).



**Obr. 2:** Mechanizmy účinku kolistínu, (a) mechanizmus lýzy membrány, (b) alternatívny mechanizmus vezikulárneho kontaktu (Yu a kol., 2015, upravené)

### 1.1.4 Mechanizmus rezistencie proti kolistínu

Mechanizmy rezistencie proti kolistínu rozdeľujeme do dvoch skupín, a to na mechanizmy prirodzenej rezistencie a mechanizmy sekundárnej (získanej) rezistencie.

Gramnegatívne baktérie ako *Proteus mirabilis*, *Burkholderia cepacia* či *Serratia mercenscens* sa vyznačujú prirodzenou rezistenciou proti kolistínu. U týchto baktérií bola opísaná kovalentná modifikácia LPS substitúciou fosfátových skupín 4-amino-4deoxy-L-arabinózou (L-Ara4N) a/alebo fosfoetanolamínom (PEtN). Táto modifikácia spôsobuje zvýšenie celkového náboja LPS, ktorý je počiatočným miestom účinku kolistínu, a v dôsledku toho kladné molekuly kolistínu nedokážu reagovať s LPS (Aquilini a kol., 2014; Beneš, 2018).

Sekundárna rezistencia proti kolistínu bola u citlivejších bakteriálnych druhov charakterizovaná predovšetkým chromozómovými mutáciami. Najčastejším mechanizmom kolistínu je modifikácia lipidu A alebo kyseliny 3-deoxy-D-manno-okt-2-ulózonovej (Kdo), ktoré sú súčasťou LPS (Baron a kol., 2016). Nepredpokladalo sa, že rezistencia je prenášaná pomocou mobilných genetických elementov (Landman a kol., 2008). V poslednej dobe však veľký význam zohráva práve plazmidom sprostredkovaná rezistencia. K rezistencií proti kolistínu však prispievajú aj efluxné pumpy, poríny a kapsulárny polysacharid (Baron a kol., 2016).

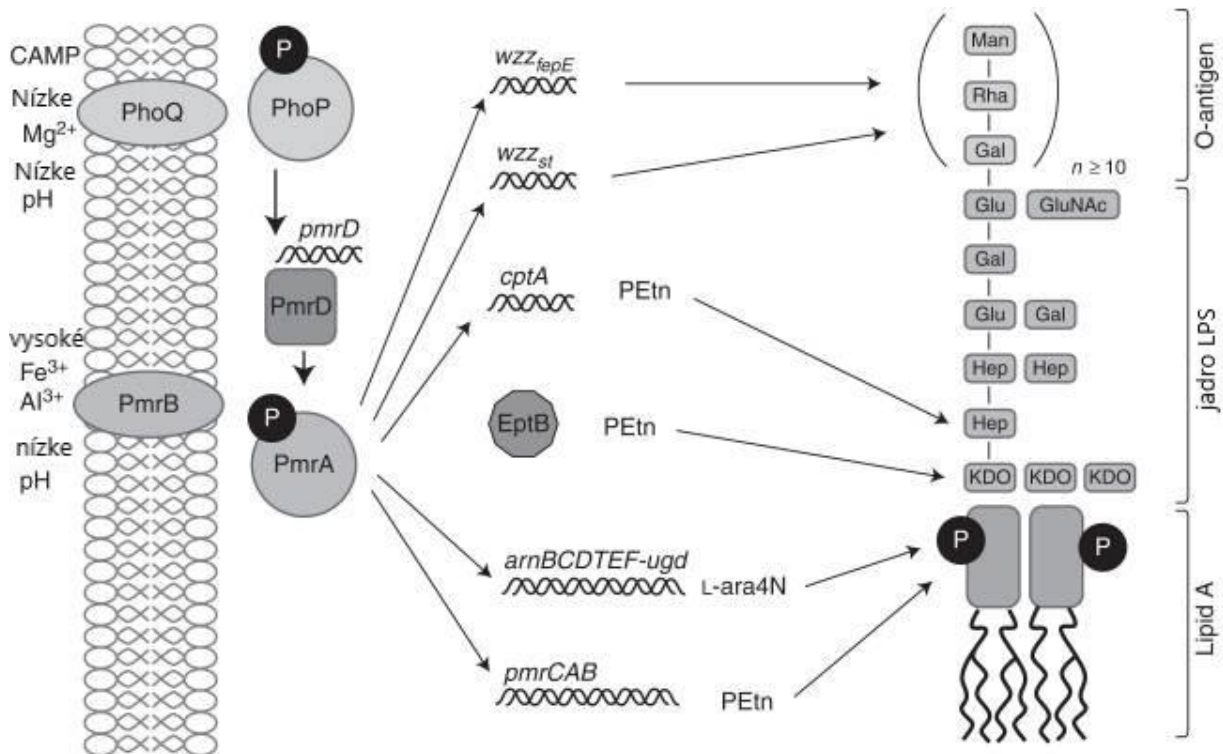
#### 1.1.4.1 Modifikácia lipidu A alebo Kdo spôsobená L-Ara4N/PEtN

Hlavným mechanizmom, ktorý vedie k rezistencií proti kolistínu, je modifikácia lipidu A substitúciou L-Ara4N. Najčastejším cieľom L-Ara4N je 4'-fosfátová skupina lipidu A, ale k naviazaniu môže dôjsť aj na 1-fosfátovú skupinu alebo Kdo. Operón *arnBCADTEF* (známy aj ako *pmrHFIJKLM*) syntetizuje L-Ara4N z kyseliny uridíndifosfát-glukuronovej (UDPGA) a následne ho prenesie na lipid A (Olaitan a kol., 2014). Tento operón bol identifikovaný v *Salmonella* spp., *K. pneumoniae*, *E. coli* a *P. aeruginosa*.

Mutácie dvojzložkových systémov, hlavne PhoP/PhoQ a PmrA/PmrB sú zodpovedné za aktiváciu spomínaného operónu v baktériách, pričom zmeny PmrA/PmrB boli popísané pri *Salmonella* spp., *P. aeruginosa* a *A. baumannii*. Zistilo sa, že zmeny v PhoP/PhoQ sú taktiež zodpovedné za rezistenciu proti kolistínu pri *P. aeruginosa* a *Salmonella* spp. (obr. 3) (Baron a kol., 2016).

K modifikácií lipidu A alebo Kdo môže dôjsť aj *ept* génmi substitúciou PEtN. Existujú rôzne gény, ktoré kódujú PEtN, ako napr. *eptA* (*pmrC*), *eptB* (*pagC*) a *eptC* (*cptA*) a každý z nich je schopný substitúcie PEtN na rôzne časti LPS.

Hlavným mechanizmom rezistencie u *A. baumannii* je mutácia *pmrAB*, ktorá vedie k aktivácii *pmrC* a substitúcií PEtn na LPS (Baron a kol., 2016; Qureshi a kol., 2015).



**Obr. 3:** Všeobecný mechanizmus rezistencie proti kolistínu modifikáciou LPS u *Salmonella* spp. Dvojzložkový systém PhoQ/PhoP aktivuje expresiu *pmrD*, ten aktivuje PmrA, ktorý aktivuje *cptA* a *pmr* a *arn* operóny. EptB a CptA spoločne modifikujú jadro LPS. Dochádza k substitúcií PEtn a L-Ara4N na LPS, zmení sa náboj vonkajšej membrány a dochádza k odpudzovaniu kolistínu (Trimble a kol., 2016, upravené).

#### 1.1.4.2 Kompletná strata lipopolysacharidu

Úplná strata LPS je jedným z dvoch mechanizmov rezistencie, ktoré boli opísané pri *A. baumannii*. Mutácia jedného z prvých troch génov, ktoré sa podieľajú na biosyntéze lipidu A (*lpxA*, *lpxB* a *lpxC*) spôsobuje jej prerušenie a zastavenie tvorby LPS (Baron a kol., 2016).

Mutácia na vonkajšom membránovom proteíne zvanom LptD, ktorý umožňuje translokáciu novo syntetizovanej LPS, spôsobuje taktiež úplnú stratu lipopolysacharidu (Moffatt a kol., 2010).

### 1.1.4.3 Mechanizmus efluxných púmp

Predpokladá sa, že mechanizmy efluxných púmp zohrávajú dôležitú úlohu pri rezistencii proti kolistínu. Rôzne efluxné pumpy alebo regulátory efluxných púmp boli identifikované pri bakteriálnych kmeňoch, ako sú napr. proteíny Sap (citlivé na antimikrobiálne peptidy), komplex AcrAB-TolC, regulátor BrlR alebo efluxné pumpy KpnEF. Sap proteíny sa skladajú z piatich proteínov, ktoré kódujú operón *sapABCDF*. Ukázalo sa, že mutácie v tomto operóne sú zodpovedné za zvýšenie citlivosti proti polymyxínu B a pravdepodobne aj proti kolistínu u mutantného kmeňa *P. mirabilis* (Baron a kol., 2016).

U *K. pneumoniae* bola identifikovaná mutácia efluxnej pumpy KpnEF, ktorá je súčasťou regulónu Cpx, čo má za následok rezistenciu nielen proti kolistínu, ale aj ďalším antibiotikám ako napr. rifampicín, erytromycín a ceftriaxón (Srinivasan a Rajamohan, 2013).

Efluxná pumpa AcrAB-TolC patrí medzi transportéry RND (rezistencia-nodulácia-bunkové delenie). Li a kol. poukazujú na mutantné kmene *E. coli*, pri ktorých bola pozorovaná zvýšená citlivosť proti kolistínu AcrAB (8 násobne) a TolC (10 000násobne) (Li a kol., 2015).

Vo všeobecnosti aktivácia efluxných púmp zvyšuje rezistenciu na niekoľko antibiotík súčasne, vrátane kolistínu.

### 1.1.4.4 Mechanizmus kapsulárneho polysacharidu

Ukázalo sa, že kapsulárny polysacharid (CPS) sa taktiež podieľa na rezistencii proti kolistínu. Mechanizmus CPS bol opísaný u baktérií prirodzene rezistentných proti kolistínu, ako sú napr. *Neisseria meningitidis* a *Campylobacter jejuni*. U *N. meningitidis* strata kapsuly spolu so stratou LPS viedla k 10 násobnému zvýšeniu citlivosti proti polymyxínu B. U *C. jejuni* skrátenie sialovej kyseliny (derivát neuramínovej kyseliny, monosacharid s deviatimi atómami uhlíku), ktorý je súčasťou LPS, došlo k zvýšeniu citlivosti na polymyxín B (Spinosa a kol., 2007). Pri *K. pneumoniae* sa ukázalo, že viac vrstiev CPS pôsobí ako ochranná bariéra proti kolistínu. *K. pneumoniae* je schopná uvoľňovať aniónové CPS zo svojho povrchu. Uvoľnenie CPS vedie k zachytávaniu kationových antimikrobiálnych peptidov, ako je kolistín, kapsulárny polysacharid je spojený s bakteriálnym povrchom pomocou iónovej interakcie s lipopolysacharidom a tieto interakcie sú stabilizované dvojmocnými kationmi. Prítomnosť kolistínu spôsobuje pravdepodobne poruchy medzi interakciami molekúl LPS a uvoľňovaním CPS (Fresno a kol., 2006; Poirel a kol., 2017).



#### 1.1.4.5 Ďalšie modifikácie lipopolysacharidu

Boli opísane aj ďalšie gény podieľajúce sa na biosyntéze lipopolysacharidu, ktoré majú vplyv na rezistenciu proti kolistínu. U *P. mirabilis* mutácia génu kódujúceho O-acetyltransferázu zabraňuje fixácií L-Ara4N, čo vedie k zníženiu rezistencie proti kolistínu (Baron a kol., 2016).

Globálny transkripčný regulátor *ramA* môže modifikovať expresiu viac ako 68 génov vrátane *IpxC*, *IpxL* a *IpxO*. Tento regulátor je prítomný u niektorých baktérií z čeľade *Enterobacteriaceae*, ako je *K. pneumoniae*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. A *Salmonella* spp. Génový lokus *ramA* pozostáva z troch génov (*ramA*, *romA* a *ramR*). Štúdie pri *K. pneumoniae* ukázali, že modifikácia lipidu A za pomoci regulátora *ramA* viedla k zvýšeniu citlivosti proti kolistínu (Majumdar a kol., 2015).

Pilonieta a kol. poukazujú na periplazmatický proteín (Ydel) regulovaný dvojzložkovým systémom PhoP/PhoQ a PmrA/PmrB, ktorý môže interagovať s porínom OmpD čo má za následok zvýšenie rezistencie proti kolistínu u *Salmonella enterica*. (Pilonieta a kol., 2009).

## 1.2 Rezistencia proti kolistínu kódovaná génmi *mcr*

Plazmidom sprostredkovaná rezistencia bola prvýkrát identifikovaná v roku 2015 v Číne. Jednalo sa o horizontálne prenosný gén *mcr-1* (prístupový kód v GenBank KP347127) (Liu a kol., 2016). Postupne boli opísané ďalšie *mcr* gény: *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7* a *mcr-8* (Wang a kol., 2018). Tieto gény patria medzi PEtN transferázy a sú schopné substitúcie PEtN na rôzne časti lipopolysacharidu (Baron a kol., 2016).

Objavenie plazmidom sprostredkovanej rezistencie proti kolistínu vyvolalo medzinárodnú obavu, pretože rezistentné gény majú potenciál ďalšieho šírenia čo by mohlo viesť k zníženiu účinnosti kolistínu ako lieku poslednej voľby. Rozšírenie rezistencie proti kolistínu predstavuje riziko aj v oblasti, kde je vysoký výskyt multirezistentných baktérií (Rebelo a kol., 2018).

### 1.2.1 Gén *mcr-1*

Liu a kol. ako prví zaznamenali plazmidom sprostredkovaný gén *mcr-1*, zodpovedný za horizontálny prenos rezistencie proti kolistínu.. Ich projekt sledoval prevalenciu antimikrobiálnej rezistencie u kmeňov *E. coli* izolovaných z hospodárskych zvierat v rokoch

2011 až 2014. Presnejšie sa jednalo o kmeň *E. coli* SHP45, ktorý bol izolovaný z ošípanej a vykazoval rezistenciu proti kolistínu (Liu a kol., 2016).

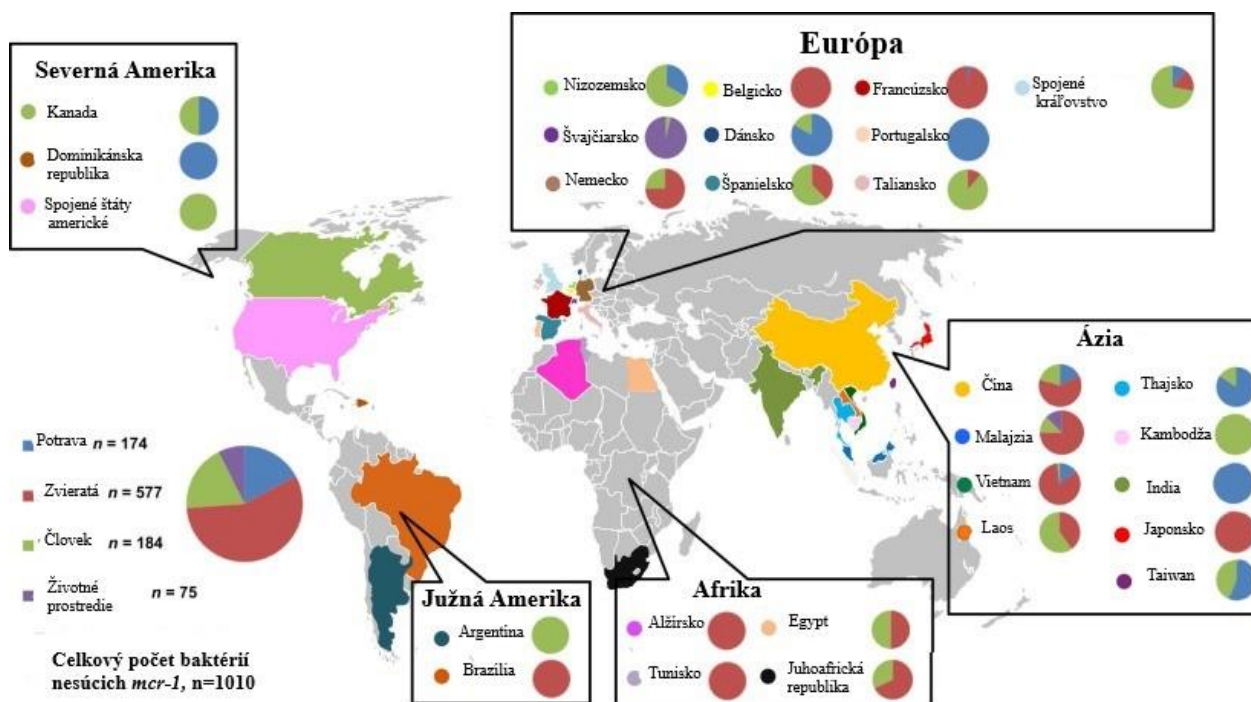
Gén *mcr-1* bol identifikovaný na plazmide pHNSHP45 (IncI2; 64 105 bp) a opísaný ako otvorený čítací rámec o veľkosti 1626 bp s 49 % obsahom guanin-cytozín (GC). Časom sa *mcr-1* gén objavil na viacerých plazmidoch (IncI2, IncHI2, IncP, IncX4, IncFI, IncFIB) a rôznych veľkostiach (Baron a kol., 2016). Schopnosť plazmidu pHNSHP45 prenášať rezistenciu proti kolistínu medzi príslušnými bakteriálnymi druhmi a rodmi je spôsobená konjugáciou a transformáciou (Liu a kol., 2016).

Kódovaný proteín MCR-1 je enzým, ktorý patrí medzi PEtN transferázy a vznik rezistencie proti kolistínu je podobný ako u chromozomálnych mutácií. Produkcia MCR-1 pri *E. coli* vedie až k 8-násobnému zvýšeniu minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) kolistínu. Takéto zvýšenie je dostačujúce pre vznik rezistencie bez prítomnosti ďalších mechanizmov nielen pri *E. coli*, ale aj u iných baktérií z čeľade *Enterobacteriaceae* ako je napr. *K. pneumoniae* (Poirel a kol., 2017).

V krátkom čase gén *mcr-1* a jeho mierne pozmenené génové varianty (*mcr-1.1* až *mcr-1.12*) boli zaznamenané u baktérií z čeľade *Enterobacteriaceae* vo viac ako 40 krajinách na celom svete (Wang a kol., 2018).

### **1.2.1.1 Výskyt génu *mcr-1***

Záznamy *mcr-1* pozitívnych izolátov pochádzajú z mnohých krajín Európy, Ázie, Južnej a Severnej Ameriky, Afriky a väčšina bola detegovaná v baktériách z čeľade *Enterobacteriaceae*. Mikroorganizmy pozitívne na výskyt génu *mcr-1* boli izolované z rôznych zdrojov: životné prostredie, hospodárske zvieratá, potraviny, ale aj z infikovaných ľudských pacientov (obr. 4) (Baron a kol., 2016; Sun a kol., 2018).



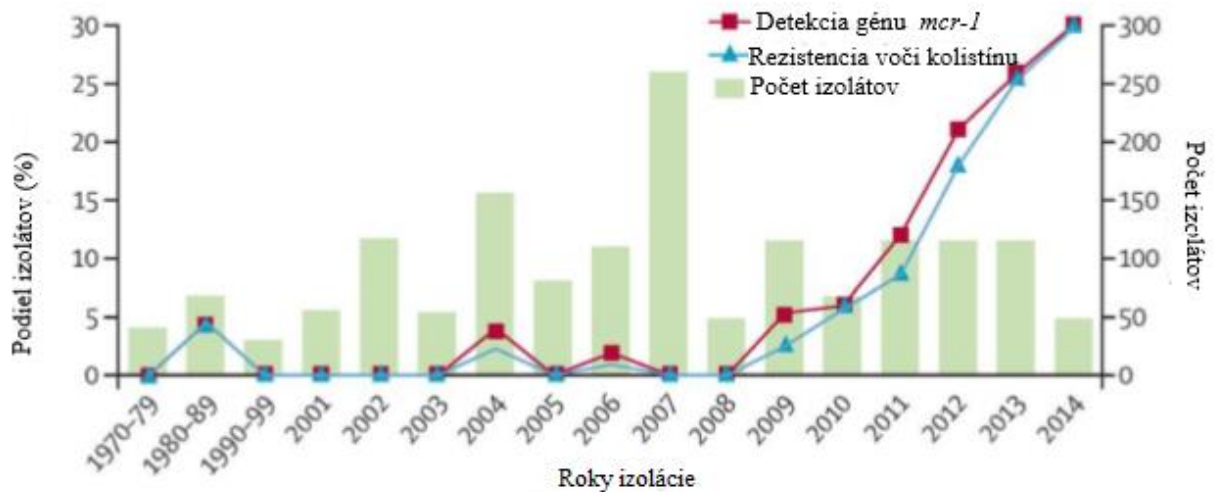
**Obr. 4:** Globálna distribúcia *mcr-1* pozitívnych kolistín rezistentných kmeňov izolovaných v prostredia, potravy, zvierat a človeka (November 2015 – Apríl 2016) (Baron a kol., 2016, upravené)

### 1.2.1.2 Gén *mcr-1* detegovaný u zvierat

Predpokladá sa, že pôvodným zdrojom génu *mcr-1* je veterinárna oblasť, nakoľko pozitívne izoláty *E. coli* boli identifikované predovšetkým pri zvieratách a ich produktoch (kuracie mäso, ošípané, moriak) (Irrgang a kol., 2016). Je fakt, že Čína začala zavádzať kolistín na začiatku 20. rokov a do konca roka 2015 sa stala jedným z najväčších užívateľov tohto antibiotika v poľnohospodárstve na svete (Liu a kol., 2016). Podobná situácia však bola zaznamenaná aj v iných krajinách Ázie, ako napríklad vo Vietname, Indii a Japonsku. Naopak, nízka prevalencia (od 0,1 % do 10 %) génu *mcr-1* bola ohlásená u hospodárskych zvierat v krajinách Severnej Ameriky a Európy (používanie kolistínu v týchto krajinách ako rastového stimulantu nebolo povolené) (Sun a kol., 2018).

Shen a kol. uskutočnili retrospektívne testovanie izolátov *E. coli* zozbieraných v Číne v rokoch 1970 až 2014, aby preskúmali približný čas vzniku génu *mcr-1* u hospodárskych zvierat. U troch izolátov, ktoré pochádzali z 80. rokov, kedy sa kolistín začal používať vo veterinárnej medicíne, bol gén detegovaný. Neskôr, v rokoch 2004 – 2005 bol sporadicky zaznamenaný

výskyt génu *mcr-1*. Od roku 2009 môžeme pozorovať postupný nárast izolátov *E. coli* pozitívnych na gén *mcr-1* (5,2 % v roku 2009 až 30 % v roku 2014) (obr. 5) (Shen a kol., 2016).



**Obr. 5:** Prítomnosť génu *mcr-1* a rezistencie proti kolistínu u kmeňov *E. coli* izolovaných zo slepiek v Číne v rokoch 1970 – 2014 (Shen a kol., 2016, upravené)

Kusumoto a kol. analyzovali patogénne kmene *E. coli* izolované z chorých ošípaných v Japonsku v rokoch 1991-2014. Viac ako 13 % izolátov bolo pozitívnych na gén *mcr-1* (Kusumoto a kol., 2016). Na druhej strane, Kawanishi a kol. testovali kmene *E. coli* izolované zo zdravých zvierat v Japonsku. 39 izolátov (5 z hovädzieho dobytku, 20 z ošípaných a 14 z brojlerov) bolo pozitívnych (Kawanishi a kol., 2016).

Trinásť izolátov *E. coli* zozbieraných v rokoch 2011 – 2012 v Belgicku z ošípaných a hovädzieho dobytku, ktoré trpeli hnačkou, bolo pozitívnych na *mcr-1* (Malhotra-Kumar a kol., 2016).

Extrémne vysoká miera detekcie *mcr-1* (72,5 – 98 %), ktorá je pripisovaná častému používaniu kolistínu na liečbu hnačiek u zvierat, bola zistená v krajinách ako Portugalsko a Taliansko (Sun a kol., 2018).

V Spojených štátoch detegovali v roku 2017 dva izoláty nesúce gén *mcr-1*. Obidva izoláty pochádzali zo slepieho čreva u ošípaných (Meinersmann a kol., 2017).

Niektoré štúdie poukazujú na to, že sťahovavé vtáky sa taktiež podieľajú na celosvetovom šírení rezistencie, nakoľko u týchto vtákov v Ázii, Európe a v Južnej Amerike bol zaznamenaný pozitívny gén *mcr-1* (Mohsin a kol., 2016; Liakopoulos a kol., 2016).

### 1.2.1.3 Gén *mcr-1* detegovaný v potravinách

Prítomnosť MO produkujúcich *mcr-1* gény vo vzorkách potravín, ktoré sú určené na priamu spotrebu, predstavuje vážne riziko pre ľudské zdravie.

Luo a kol. identifikovali prítomnosť génu *mcr-1* v izolátoch *E. coli* a *Raoultella ornithinolytica* z hlávkového šalátu a paradajok. Hoci výskyt génu v izolátoch zo zeleniny bol nižší ako u izolátov zo zvierat a zvieracích produktov v Číne, prítomnosť takýchto baktérií predstavuje hrozbu pre ľudské zdravie nakoľko čerstvá zelenina sa často konzumuje surová (Luo a kol., 2017).

Vo Švajčiarsku bol identifikovaný izolát *E. coli* produkujúci *mcr-1* v zelenine pochádzajúcej z Thajska a Vietnamu (Zurfuh a kol., 2016).

Karpíšková a kol. vo svojej práci prvýkrát popisujú výskyt plazmidom sprostredkovanvej rezistencie proti kolistínu u kmeňov *E. coli* izolovaných z potravín v Českej republike. Pozitívne nálezy *E. coli* nesúce *mcr-1* gén pochádzali zo vzoriek surového mletého morčacieho mäsa, ktoré bolo zakúpené v tržnej sieti Českej republiky a pochádzalo z Poľska (Karpíšková a kol., 2017).

V rokoch 2012 – 2014 gén *mcr-1* bol detegovaný v piatich kmeňoch *E. coli*, ktoré pochádzali z kuracieho mäsa dovážaného z Dánska (Hasman a kol., 2015).

V Brazílii, Monte a kol. prvýkrát uvádzajú vo svojej štúdií výskyt kolistín-rezistentných kmeňov *E. coli* nesúce gén *mcr-1* v surovom kuracom mäse, ktoré bolo zakúpené v 12 supermarketoch v meste São Paulo (Monte a kol., 2017).

V období október až november 2017 bolo zozbieraných 110 vzoriek surových potravín (hydínové mäso, ryby, baranie mäso, ovocie a zelenina) z 22 rôznych zdrojov (14 obchodov a 8 domácností) v Chennai (hlavné metropolitné mesto v Indii), pričom 51 vzoriek obsahovalo kolistín rezistentné baktérie a z týchto vzoriek sa identifikovalo 71 izolátov baktérií, vrátane 11 *E. coli*, 29 *Klebsiella* spp., 17 *Enterobacter* spp., 2 *Citrobacter* spp. A 12 *Pseudomonas* spp. Z týchto izolátov sa zistilo, že 3 izoláty *E. coli* obsahovali gén *mcr-1* (jedna vzorka baranieho mäsa, dve vzorky z hydínového mäsa) (Ghafur a kol., 2019).

Štúdie z marca 2012 až apríla 2013, ktoré prebehli na malej farme vo Vietname, poukazujú na súvislosť medzi používaním kolistínu, prítomnosťou pozitívnych *mcr-1* génov u izolátov zo zvierat a následne šírenie tohto génu prostredníctvom zvieracích produktov určených na výrobu potravín pre ľudí. Výsledkom štúdie bola vysoká prevalencie (59,4 %) *mcr-1* génov vo vzorkách výkalov zo sliepok, pričom zootonický prenos vysvetľuje vysokú prevalenciu (34,7 %) u farmárov (Trung a kol., 2017).

#### 1.2.1.4 Gén *mcr-1* detegovaný v klinických izolátoch

Kolistín a všeobecne polymyxíny si zachovávajú svoju účinnosť *in vitro* proti väčšine gramnegatívnym baktériam. V poslednej dobe zaznamenávame stále viac a viac kolistín rezistentné kmene aj v klinických izolátoch. Kolistín sa bežne používa v nemocniciach ako antibiotikum poslednej voľby na liečbu infekcií, ktoré spôsobujú gramnegatívne baktérie rezistentné proti karbapenémom, predovšetkým *K. pneumoniae*, *A. baumannii* a *P. aeruginosa*. Častejšie užívanie kolistínu však viedlo k vzniku a neustálemu zvyšovaniu rezistencie proti nemu pri spomínaných baktériách (Poirel a kol., 2017).

Priemerná spotreba kolistínu v rokoch 2012 – 2016 nepreukázala štatisticky významnú zmenu. V roku 2016 bola priemerná spotreba kolistínu v nemocnici v EÚ/EHP 0,016 DDD/1000 obyvateľov na deň. Medzi krajiny, pri ktorých bol pozorovaný nárast používania kolistínu, patrí Bulharsko, Dánsko, Grécko, Taliansko, Maďarsko, Malta, Rumunsko, Slovensko a Slovinsko. Pokles bol pozorovaný vo Francúzsku a Írsku (obr. 4) (ECDC, 2016).

Rezistencia proti kolistínu u *K. pneumoniae* bola zaznamenaná v mnohých oblastiach, vrátane Európy, Severnej a Južnej Ameriky a Južnej Afriky. Najväčší výskyt kolistín rezistentných *K. pneumoniae* bol pozorovaný u karbapenemázy produkujúcich kmeňov izolovaných v Taliansku (27,5 – 43 %), Grécku (10,5 – 20 %), Južná Kórea (6,8 %), Singapur (6,3 %) a Kanada (2,9 %) (Ah a kol., 2014).

Prvý kolistín rezistentný kmeň *A. baumannii* bol izolovaný v Českej republike v roku 1999 (Hejnar a kol., 1999).

Prostredníctvom programu SENTRY (program na kontrolu antimikrobiálnych látok) bol uskutočnený celosvetový prieskum od roku 2006 do roku 2009. Dáta z tohto prieskumu poukazujú na oblasti ako Európa, USA, Latinská Amerika a ázijsko-pacifické oblasti kde bol nízky výskyt rezistencie proti kolistínu u kmeňov *A. baumannii* a to v rozpätí 0,9 až 3,3 % (Gales a kol., 2011).

V rámci programu SENTRY sa uskutočnil výskum od januára 2009 do decembra 2011, počas ktorého sa skúmali klinické izoláty od pacientov v USA a deviatich európskych krajinách (Francúzsko, Nemecko, Belgicko, Írsko, Taliansko, Portugalsko, Švédsko, Španielsko a Spojené kráľovstvo). Výskyt kolistín rezistentných kmeňov *P. aeruginosa* bol  $\leq 0,7$  % bez významného rozdielu medzi jednotlivými krajinami a nemocnicami (Sader a kol., 2014).

### 1.2.1.5 Riziko šírenia génu *mcr-1*

Niektoré z plazmidov môžu okrem génu *mcr-1* niesť aj iné gény kódujúce antimikrobiálnu rezistenciu na klinicky dôležité antibiotika, ako sú  $\beta$ -laktámy, aminoglykozidy, chinolóny, sulfónamidy a tetracyklíny. Takáto situácia môže spôsobiť rozšírenie multirezistentných kmeňov nesúcich *mcr-1* bez toho, aby bol kolistín vôbec použitý. Veľké znepokojenie spôsobilo zistenie, že gén *mcr-1* bol identifikovaný v izolátoch multirezistentných kmeňov z čeľade *Enterobacteriaceae*, ktoré obsahovali na plazmidoch gény kódujúce rezistenciu proti karbapenémom (*bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>NDM-5</sub>*, *bla<sub>NDM-9</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>KPC-2</sub>* a *bla<sub>VIM-1</sub>*) (Poirel a kol., 2017). Yao a kol. vo svojej štúdií objavili karbapeném a kolistín rezistentný kmeň *E. coli* produkujúci gény *bla<sub>NDM-9</sub>* a *mcr-1*, ktorý bol získaný zo vzoriek kuracieho mäsa zakúpeného v supermarkete (Yao a kol., 2016).

Nemeckí vedci Falgenhauer a kol. hľadali prítomnosť génu *mcr-1* v ich databáze 577 izolátov, ktoré pochádzali z rôznych zdrojov (človek, zvieratá a prostredie) od roku 2009. Podarilo sa im detegovať *mcr-1* gén v štyroch izolátoch *E. coli*, pričom tri pochádzali z ošípaných a jedna z infikovanej ľudskej rany. Izoláty z ošípaných produkovali ESBL, obsahujúc gén *bla<sub>CTX-M-1</sub>* zatiaľ čo ľudský izolát niesol okrem génu *mcr-1* aj gén karbapenemázy *bla<sub>KPC-2</sub>*. Takéto kmene by mohli byť schopné kolonizovať črevný trakt človeka a preniesť rezistentné plazmidy na iné gramnegatívne patogénne baktérie, čo by mohlo mať za následok neliečiteľné infekcie (Falgenhauer a kol., 2016)

## 1.2.2 Ďalšie známe gény kódujúce rezistenciu proti kolistínu

### 1.2.2.1 Gén *mcr-2*

Xavier a kol. v nadväznosti na správu ohľadom detekcie génu *mcr-1* v Číne, v rokoch 2011 – 2012 odobrali 105 kolistín rezistentných izolátov *E. coli* (kolistín MIC 4 – 8 mg/L) z 52 teliat a 53 ošípaných. Vo svojej štúdií analyzovali izoláty, ktoré vykazovali rezistenciu proti kolistínu ale prítomnosť génu *mcr-1* sa im nepodarilo potvrdiť. Namiesto toho identifikovali nový plazmidom sprostredkovaný gén *mcr-2*, ktorý má 1617 bp, vykazuje 76,75 % nukleotidovú identitu s *mcr-1* a bol nájdený na plazmide IncX4. MCR-2 proteín patrí taktiež medzi PEtN transferázy a pri porovnaní s MCR-1 proteínom vykazovali 80,65 % identitu a vyznačuje sa podobným mechanizmom rezistencie (Xavier a kol., 2016).

### 1.2.2.2 Gén *mcr-3*

Začiatkom roku 2017 bol opísaný gén *mcr-3* z izolátov *E. coli*, ktoré boli odobraté v roku 2015 z ošipáných v Číne. Gén sa nachádzal na plazmide pWJ1 (IncHI2, 261 kb). Ďalšia analýza odhalila, že gén *mcr-3* vykazoval s *mcr-1* 45 % a s *mcr-2* 47 % nukleotidovú identitu. Kódovaný proteín MCR-3 vykazoval na úrovni aminokyselinových sekvencií 99,8 % až 100 % zhodu k PEtN transferázam, ktoré sa vyskytovali u *E. coli*, *K. pneumoniae* a *S. enterica* serovar Typhimurium a 75,6 % až 94,8 % zhodu k PEtN transferázam u baktérií z rodu *Aeromonas* (Yin a kol., 2017).

### 1.2.2.3 Gény *mcr-4* a *mcr-5*

V druhej polovici roku 2017 bol identifikovaný gén *mcr-4* pri izolátoch *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* z ošipáných v Taliansku a pri kmeňoch *E. coli* izolovaných z ošipáných zo Španielska a Belgicka. Gén sa nachádzal na plazmide ColE10 s veľkosťou 8749 bp a bol pomenovaný ako pMCR. ColE plazmidy sú schopné replikovať sa v rôznych bakteriálnych druhoch a rodoch, avšak na zahájenie konjugácie potrebujú pomocný plazmid (Carattolli a kol., 2017).

Krátko po objavení génu *mcr-4* bol v Nemecku identifikovaný gén *mcr-5* u izolátov *Salmonella paratyphi* B dTa+, ktoré boli zozbierané v rokoch 2011 – 2013. Gén *mcr-5* o veľkosti 1644 bp bol lokalizovaný na veľkom transpozóne Tn3 (7337 bp), ktorý sa nachádzal na plazmide ColE (12 201 bp) nazývaný ako pSE13-SA01718 (Borowiak a kol., 2017).

V štúdií z roku 2018 Chen a kol. stanovovali prítomnosť génov *mcr-4* a *mcr-5* vo vzorkách výterov ošipáných a hydiny v Číne. Prevalencia *mcr-4* vo výteroch z ošipáných (41,4 %) bola významne vyššia ako u výterov z hydiny (11,5 %). Pozitívny gén *mcr-4* bol prítomný v husiach (49,5 %), kurčatách (17,2 %), holuboch (17,2 %) a kačiciach (15,4 %). Podobne aj prevalencia *mcr-5* vo výteroch z ošipáných (33,1 %) bola vyššia ako u výterov z hydiny (5,6 %). Gén *mcr-5* bol identifikovaný v husiach (17,4 %), kurčatách (9,9 %), kačiciach (7,7 %) a holuboch (3 %). Prítomnosť génov *mcr-4* a *mcr-5* poukazuje na to, že tieto gény prevládajú a sú rozšírené u hospodárskych zvierat (ošipané a hydina) v Číne (Chen a kol., 2018).

### 1.2.2.4 Gény *mcr-6*, *mcr-7* a *mcr-8*

V súčasnej dobe existujú už aj ďalšie *mcr* gény. AbuOun a kol. opisujú prvú detekciu génu *mcr-6*, ktorý sa nachádzal na chromozóme *Moraxella pluranimalium* (AbuOun a kol., 2017).



V Číne bol identifikovaný gén *mcr-7.1* (1620 bp) u izolátov *K. pneumoniae* zo sliepok, nachádzajúci sa na konjugačnom plazmide IncI2 (Yang a kol., 2018).

Wang a kol. v júly 2018 charakterizovali nový mobilný gén rezistencie proti kolistínu, *mcr-8*. Tento gén bol lokalizovaný na prenosnom plazmide IncFII o veľkosti 95,983 bp u *K. pneumoniae*. Odvodená aminokyselinová sekvencia MCR-8 ukázala 31,08 %, 30,26 %, 37,85 %, 33,51 %, 30,43 % a 37,46 % identitu s *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6* a *mcr-7*. Funkčné klonovanie ukázalo, že získanie jedného génu *mcr-8* významne zvýšilo rezistenciu proti kolistínu ako u *K. pneumoniae* tak aj u *E. coli* (Wang a kol., 2018).

### 1.2.3 Detekcia rezistencie proti kolistínu

#### 1.2.3.1 Fenotypová detekcia

Testovanie antimikrobiálnej citlivosti fenotypovými metódami predstavuje základ pozorovania antimikrobiálnej rezistencie a je potrebné určiť celosvetový výskyt rezistencie proti kolistínu. Objavenie multirezistentných gramnegatívnych baktérií a následne zvýšené užívanie kolistínu viedlo k rozvoju rýchlych a spoľahlivých metód na určenie citlivosti izolátov proti polymyxínom, nakoľko infekcie spôsobené práve multirezistentnými baktériami sa spájajú s vyššou úmrtnosťou pacientov. Testovanie antimikrobiálnej citlivosti na kolistín je však zložitý a najväčšie problémy predstavuje jeho zlá difúzia na agar, inherentné kationové vlastnosti, tendencia kolistínu viazať sa na povrch plastov, či výskyt heterorezistencie u bakteriálnych kmeňov (Poirel a kol., 2017; WHO, 2018). Disková difúzna metóda nie je spoľahlivá z dôvodu zlej difúzie kolistínu, kvôli jeho veľkým molekulám, na pevnom médiu. Správnosť stanovenia gradientových testov (E-testy) bola niektorými prácami spochybnená, pretože podhodnocovali hodnoty MIC (Rebelo a kol., 2018). Medzinárodné organizácie Inštitút pre klinické a laboratórne normy (CLSI) a Európsky výbor pre testovanie antimikrobiálnej citlivosti (EUCAST) odporúčajú ako najideálnejšiu bujónovú mikrodilučnú metódu (BMD) s použitím Mueller-Hinton bujónu, s upraveným obsahom kationov, dvojnásobným riedením kolistínu (v rozmedzí od 0,12 do 512 µg/ml) a bakteriálnym inokulom ( $5 \times 10^5$  CFU/ml) v každej jamke (CLSI., 2012). Za rezistentné sa považujú kmene s hodnotou minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) viac ako 2 mg/L. BMD je referenčnou metódou vďaka svojej reprodukovateľnosti, spoľahlivosti a možnosti automatizácie (Poirel a kol., 2017).

### 1.2.3.2 Genotypová detekcia

Mechanizmy rezistencie proti kolistínu môžeme identifikovať sekvenovaním špecifických génov, ktoré sú za rezistenciu zodpovedné. Plné využitie molekulárnych techník však nie je celkom možné, nakoľko ešte stále nie sú kompletne identifikované chromozomálne kódované mechanizmy rezistencie proti kolistínu. Je ťažké odhadnúť, či substitúcie, ktoré boli identifikované v proteínoch a zapájajú sa do biosyntézy LPS, vedú k rezistencii a taktiež hladiny expresie odpovedajúcich génov sa môžu líšiť a ovplyvniť úroveň samotnej rezistencie (Poirel a kol., 2017). Globálne obavy zo šírenia rezistencie proti kolistínu, nespoľahlivosť väčšiny fenotypových metód, či obmedzená dostupnosť technológie sekvenovania celého genómu v niektorých laboratóriách viedla skupinu výskumníkov k tomu, aby vyvinuli metódu, ktorá umožní skríning relevantných izolátov lacným, rýchlym a účinným spôsobom (Rebelo a kol., 2018).

### 1.2.3.3 PCR amplifikácia a sekvenovanie na detekciu mutácií génov

Metódy molekulárnej biológie založené na stanovení prítomnosti génov rezistencie alebo mutácie sú najcitlivejšie na stanovenie rezistencie proti ATB. Tieto metódy sú komplementárne k fenotypovým technikám a potvrdzujú rezistentný stav bakteriálnych izolátov. Hlavné mutácie pre druhy *Enterobacteriaceae* sú lokalizované na génoch kódujúcich dvojjložkový systém PmrA/PmrB a PhoP/PhoQ. Rezistencia proti kolistínu nie je založená na modifikácii enzýmov, ale na získaní génu rezistencie. Skríning potenciálnych mutácií na chromozomálnych génoch sa uskutočňuje amplifikáciou a sekvenovaním. Proces trvá tri dni a vyžaduje si testovanie všetkých génov. Sekvenované amplikóny sa potom porovnávajú pomocou nástroja BLAST naproti databáze NCBL na skríning možných mutácií v porovnaní s génmi divokého typu (Bardet a Rolain, 2018).

#### **1.2.3.4 Polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase (RT - PCR) na detekciu prítomnosti *mcr* génov**

RT - PCR je rýchla kvantitatívna technika, ktorá slúži na detekciu prítomnosti génov. Princíp je založený na tom, že do reakčnej zmesi sa pridáva fluorescenčné farbivo, ktoré fluoreskuje po naviazaní len na dvojvláknovú DNA. Na tieto účely vedci môžu použiť primery z pôvodnej štúdie alebo si navrhnúť svoje vlastné primery pre štandardnú PCR alebo RT – PCR (Skov a Monnet, 2016). Xavier a kol. navrhli primery na skríning génu *mcr-2*, čo poskytlo produkt o veľkosti 567 bp. Neskôr boli navrhnuté primery aj na detekciu *mcr-3*, *mcr-4* a *mcr-5* (Xavier a kol., 2016; Yin a kol., 2017; Carattolli a kol., 2013; Borowiak a kol., 2017).

Začiatkom roku 2018 bol zverejnený protokol polymerázovej reťazovej reakcie (multiplex PCR) na detekciu piatich *mcr* génov: *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* a *mcr-5* nesúcich rezistenciu proti kolistínu pri čeľadi *Enterobacteriaceae*. Multiplex PCR umožňuje rýchlu identifikáciu *mcr* génov a je užitočná predovšetkým v laboratóriách, kde sú obmedzené prostriedky na uskutočnenie genetických analýz (Rebelo a kol. 2018).

## 2 Cieľ práce

Cieľom diplomovej práce je objasniť výskyt horizontálne prenosnej rezistencie proti kolistínu kódovanej génmi *mcr* u Gram negatívnych baktérií izolovaných z non-humánnych zdrojov.

V rámci diplomovej práce bude riešené nasledujúce dielčie ciele:

1. Spracovanie literárnej rešerše, so zameraním na:
  - a. význam horizontálne prenosnej rezistencie proti kolistínu,
  - b. determinanty tohto typu rezistencie a ich rozšírenie vo svete a v Českej republike,
  - c. metódy detekcie baktérií, ktoré nesú gény *mcr*.
2. Detekcia, identifikácia a charakterizácia kmeňov s následnou laboratórnou analýzou vzoriek zakúpených v tržnej sieti, prípadne z ďalších zdrojov.
3. Vyhodnotenie výsledkov a stanovenie najvýznamnejších zdrojov a ciest šírenia tohto typu rezistencie v Českej republike.

# 3 Metodika práce a metody skúmania

## 3.1 Materiál

### 3.1.1 Charakteristika vzoriek

V tejto práci bolo zisťované, či sa u Gram negatívnych baktérií, ktoré boli izolované z non-humánných zdrojov (životné prostredie, potraviny, zvieratá a prostredie ich chovu) vyskytuje horizontálne prenosná rezistencia proti kolistínu kódovaná génmi *mcr*.

#### 3.1.1.1 Životné prostredie

Zo životného prostredia sme analyzovali 67 vzoriek (bahno, hlina, piesok, pôda, riasy, voda a odpadová voda). Tieto vzorky boli odobraté v roku 2018 v období apríl – august.

Obec/okres a krajina pôvodu hliny, piesku, pôdy a rias nám ukazuje tab. 2. Celkový počet vzoriek hliny bol 3, piesku 2, pôdy 7 a rias 5.

**Tab. 2:** Prehľad vzoriek hliny, piesku, pôdy a rias

Popis vzorky	Obec/okres	Krajina pôvodu
hlina	Kobylá nad Vidnávku Bystřice pod Lopeníkem Vlkov	ČR
piesok	Máchovo jezero	ČR
	Jadran	Chorvátsko
pôda	Radňovec Střelice Behařovice (Znojmo) Přeskače (Znojmo) Máchovo jezero Zlaté jezero	ČR
	Houdringe, Beerschoten EN PANBOS	Holandsko
riasy	Máchovo jezero Pasohlávky Věstonice	ČR
	neuveďené	Holandsko

Počet analyzovaných vzoriek vody bol 21 a celkový počet vzoriek bahna bol 24. Obec/okres a krajina pôvodu sú uvedené v tab. 3.

**Tab. 3:** Prehľad vzoriek vody a bahna

<b>Vzorka</b>	<b>Obec/okres</b>	<b>Krajina pôvodu</b>
<b>voda</b>	Máchovo jezero Brno Strachotín Pasohlávky Zarybničná Lhota Chýnov Přeskače (Znojmo) Behařovice (Znojmo) Radňovec Vlkov Doubravice nad Svitavou Věstonice Zlaté jezero	ČR
	Jadran	Chorvátsko
	Havana	Kuba
<b>bahno</b>	Máchovo jezero Vlčice Doubravice nad Svitavou Brno Krásné - Nový Malín Staré město na Moravě Uherčice Zarybničná Lhota Chýnov Staré město na Moravě Vlkov přehrada Ordějov Kostelany nad Moravou Máchovo jezero Strachotín	ČR
	neuveденé	Holandsko
	Jadran	Chorvátsko
	Chopok (Sedlo Polany) Hiadelské sedlo Útulňa Ďurková	Slovensko

Z čistiarne odpadových vôd (ČOV) v Brne boli odobraté 4 vzorky v rôznom časovom horizonte a jedna vzorka odpadovej vody bola odobratá z Ústrední čistírny odpadních vod (ÚČOV) Praha. Tab. 4 ukazuje dátum odberu odpadovej vody.

**Tab. 4:** Prehľad vzoriek z čistiarni odpadových vôd

Dátum odberu	Vzorka	Krajina pôvodu
25.4	ČOV Brno – odpadová voda	ČR
15.5	ČOV Brno – odpadová voda	
20.6	ČOV Brno – odpadová voda ÚČOV Praha – odpadová voda	
22.8	ČOV Brno – odpadová voda	

### 3.1.1.2 Potraviny

V rámci štúdie bolo analyzovaných 41 vzoriek potravín rastlinného pôvodu a 23 vzoriek potravín živočíšneho pôvodu. Tieto vzorky boli zozbierané v roku 2018 a boli zakúpené v tržnej sieti Českej republiky. Do štúdia sme zahrnuli aj vzorky potravín, ktoré pochádzali a boli dovezené z iných Európskych krajín a krajín mimo Európskej únie (tab. 5).

**Tab. 5:** Prehľad vzoriek potravín

Typ potraviny	Vzorka	Krajina pôvodu
<b>Potraviny rastlinného pôvodu</b>	bylinky	Vietnam
	huba	Vietnam
	korenie	Čína, neuvedené
	ovocie	Španielsko
	smoothie	ČR
	suché plody	Čína, Vietnam
	zelenina	Bulharsko, ČR, Taliansko, Maroko, Nizozemsko, Španielsko, Thajsko
<b>Potraviny živočíšneho pôvodu</b>	hovädzie mäso	ČR, Poľsko
	králičie mäso	ČR
	morčacie mäso	Maďarsko
	kuracie pečienky	Brazília, ČR, Poľsko, Slovensko
	kuracie mäso	ČR, Slovensko, UK
	morské plody	Chile, Tichý oceán, Vietnam

### 3.1.1.3 Zvieratá a prostredie chovu

V období marec – august roku 2018 bolo odobratých 151 vzoriek, ktoré pochádzali z 15 fariem z Českej republiky a z 2 fariem zo Slovenska. Vzorky boli odobraté priamo zo zvierat (trus, rektálny výter, obsah čreva) a z prostredia ich chovu (kadavér, krmítka, napájadlá, podstielka, prach, vzdušné filtre) (tab. 6).

**Tab. 6:** Prehľad vzoriek zo zvierat a prostredia ich chovu

Odber	Zviera	Miesto odberu	Okres (ČR)/ Slovensko
obsah čreva	prasa	farma	Vyškov Znojmo
	sliepka	farma	Náchod Svitavy
		jatky	Blansko Slovensko Žďár nad Sázavou
prostredie farmy	hydina	farma	Brno-venkov Strakonice Třebíč Znojmo
	ovce	farma	Třebíč
rektálny výter	prasa	farma	Blansko Ústí nad Orlicí
		stajne	Ústí nad Orlicí
	hovädzí dobytok	farma	Šumperk
trus	brojler	farma	Třebíč
	ovce	farma	Třebíč
	prasa	farma	- Vysočina

### 3.1.2 Použité média, chemikálie, reagensy

#### Kultivačné média:

- Brilliance UTI *Clarity* Agar (Oxoid, UK) + Colistin sulfate (Discovery, UK)
- Buffered peptone water (Oxoid, UK)
- Krvný agar (Labmedia, ČR)



### Izolácia DNA:

- komerčný kit Blood and tissue (Qiaagen, UK)
- fyziologický roztok
- sterilná deionizovaná voda

### Polymerázová reťazová reakcia:

- PPP Master Mix (Top-Bio, ČR)
- Qiagen Multiplex PCR kit (Dynex, ČR)
- Primery (tab. 7)
- PCR Ultra H<sub>2</sub>O (Top-Bio, ČR)

**Tab. 7:** Primery pre gény *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* a *mcr-5*

Gén	Primer	Sekvencia (5' - 3')	Referencie
<i>mcr-1</i>	CLR5-F	CGGTCAGTCCGTTTGTTC	Liu a kol., 2016
	CLR5-R	CTTGGTCGGTCTGTAGGG	
<i>mcr-2</i>	MCR-2_F	TGTTGCTTGTGCCGATTGGA	Xavier a kol., 2016
	MCR-2_R	AGATGGTATTGTTGGTTGCTG	
<i>mcr-3</i>	MCR3-F	TTGGCACTGTATTTTGCATTT	Yin a kol., 2017
	MCR3-R	TTAACGAAATTGGCTGGAACA	
<i>mcr-4</i>	Mcr4-FW	ATT GGG ATA GTC GCC TTT TT	Carratoli a kol., 2017
	Mcr4-RV	TTACAGCCAGAATCATTATCA	
<i>mcr-5</i>	MCR5_fw	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	Borowiak a kol.,2015
	MCR5_rev	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG	

### Gélová elektroforéza:

- Agaróza (Serva, Nemecko)
- TBE pufor (VWR, USA)
- Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics, Nemecko)
- Hmotnostné markery
  - 155 – 970 bp (Top – Bio, ČR)
  - 50 – 1 500 bp (Nippon Genetics, Nemecko)
- PCR loading buffer (Top – Bio, ČR)

### 3.1.3 Použité prístroje a pomôcky

#### Prístroje:

Cyklér	Biometra TRIO 48	(Biometra GmbH, Nemecko)
Centrifúga	Microspin 12	(Biosan, Lotyšsko)
Termo blok	Thermo-Shaker TS 100	(Biosan, Lotyšsko)
	Dry Bath Incubator	(Major science, USA)

Boxy	SafeFAST Elite	(Schoeller, ČR)
	TOPSAFE 1.2	(EuroClone, Taliansko)

UV transilluminator + zobrazovací systém UVI-1D (Uvitec, UK)

#### Pomôcky:

- odmerné valce, skúmavky, očkovacie kľučky, Petriho misky, špičky na pipety, pipety, PCR skúmavky, nožnice, pinzety, sterilné plastové vrecúška, výbava na elektroforézu

## 3.2 Metódy

### 3.2.1 Spracovanie vzoriek

Na odber vzoriek sme použili sterilné plastové vrecúška alebo sterilné plastové skúmavky. V laboratóriu bolo odobratých 25 ml tekutej vzorky, ktorú sme umiestili do plastového vrecúška s 225 ml pufrovanej peptónovej vody (PPV). V prípade tuhej vzorky sa odobralo 25 g vzorky do plastového vrecúška s 225 ml PPV. Následne bola zmes homogenizovaná a inkubovaná pri 37 °C po dobu 24 hodín.

### 3.2.2 Izolácia DNA pomocou Blood and tissue kitu

Po 24 hodinovej kultivácii sme z pomnoženej PPV odobrali 1 ml vzorky a izolovali sme DNA pomocou Blood and tissue kitu. Výsledný eluát bol použitý v polymerázovej reťazovej reakcii.

### 3.2.3 Detekcia vybraných génov rezistencie

Na detekciu génov *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* a *mcr-5* sme použili polymerázovú reťazovú reakciu (PCR).

Pri príprave PCR zmesi sme namiešali mastermix z jednotlivých zložiek (tab. 8 a tab. 9). Zmes sme následne rozpipetovali po 23 µl do 200 µl mikroskúmaviek a nakoniec sme pridali 2 µl DNA vzorky. Celkový objem reakčnej zmesi bol teda 25 µl. Reakcie prebiehali podľa optimalizovaného teplotného profilu v termocykléri (tab. 10) a po amplifikácii nasledovala separácia produktov pomocou gélovej elektroforézy.

**Tab. 8:** Komponenty reakčnej zmesi *mcr-1*, *mcr-3* a *mcr-4*

<i>mcr-1</i>	1 vzorka	<i>mcr-3</i>	1 vzorka	<i>mcr-4</i>	1 vzorka
PPP Master mix	12,5 µl	PPP	12,5 µl	PPP Master Mix	12,5 µl
CLR5-F (10 µM)	0,5 µl	MCR3-F (10 µM)	0,5 µl	Mcr4-FW (10 µM)	0,5 µl
CLR5-R (10 µM)	0,5 µl	MCR3-R (10 µM)	0,5 µl	Mcr4-RV (10 µM)	0,5 µl
PCR Ultra H <sub>2</sub> O	9,5 µl	H <sub>2</sub> O	9,5 µl	PCR Ultra H <sub>2</sub> O	9,5 µl

**Tab. 9:** Komponenty reakčnej zmesi *mcr-2* a *mcr-5*

<i>mcr-2</i>	1 vzorka	<i>mcr-5</i>	1 vzorka
QIAGEN Master Mix	12,5 µl	QIAGEN Master Mix	12,5 µl
Q solution	2,5 µl	Q solution	2,5 µl
MCR-2_F (10 µM)	0,5 µl	MCR5_fw (10 µM)	2,5 µl
MCR-2_R (10 µM)	0,5 µl	MCR5_rev (10 µM)	2,5 µl
PCR Ultra H <sub>2</sub> O	7,0 µl	PCR Ultra H <sub>2</sub> O	3,0 µl

**Tab. 10:** Teplotný profil jednotlivých reakčných cyklov

Reakčný cyklus	<i>mcr-1</i>	<i>mcr-2</i>	<i>mcr-3</i>	<i>mcr-4</i>	<i>mcr-5</i>
Počiatočná denaturácia	94 °C/15 min	95 °C/15 min	94 °C/15 min	94 °C/15 min	95 °C/15 min
Cykly	<b><u>25 cyklov:</u></b> 94 °C/30 s 58 °C/90 s 72 °C/60 s	<b><u>33 cyklov:</u></b> 95 °C/3 min. 65 °C/30 s 72 °C/60 s	<b><u>30 cyklov:</u></b> 95 °C/30 s 50 °C/30 s 72 °C/45 s	<b><u>25 cyklov:</u></b> 94 °C/30 s 58 °C/90 s 72 °C/60 s	<b><u>30 cyklov:</u></b> 95 °C/30 s 50 °C/30 s 72 °C/95 s
Finálna extenzia	72 °C/10 min	72 °C/10 min	72 °C/7 min	72 °C/10 min	72 °C/5 min
Chladienie	4 °C/PAUSE	10 °C/PAUSE	4 °C/PAUSE	4 °C/PAUSE	4 °C/PAUSE

### 3.2.4 Detekcia PCR produktu gélovou elektroforézou

PCR produkt bol analyzovaný gélovou elektroforézou. Gél sme si pripravili podľa tab. 6. Do zmesi bol pridaný Midori green, ktorý nám umožnil vizualizáciu DNA v UV transiluminátore.

**Tab. 11:** Zloženie agarozového gélu

<b>koncentrácia gélu</b>	2%	1%
<b>agaróza (g)</b>	2	0,75
<b>0,5x TBE (ml)</b>	100	70
<b>Midori green (µl)</b>	2	2

V prípade výskytu niektorého z génov *mcr-1* až *mcr-5* sme z danej vzorky pomnoženej PPV aplikovali alikvotný objem na povrch selektívneho kultivačného média Brilliance UTI Clarity Agar s prídavkom kolistínu. Petriho misku (PM) sme následne nechali kultivovať v termostate pri 37 °C po dobu 24 hodín.

### 3.2.5 Izolácia DNA – lýza varom

Po 24 hodinovej kultivácii sme z PM odobrali pomocou kľučky suspektné kolónie, ktoré sme následne premyli v 1 ml fyziologického roztoku a centrifugovali 11 000 ot/10 min. Supernatant sme zliali a pridalí 200 µl sterilnej deionizovanej vody. Zmes sme nechali

inkubovať v suchej lázni pri teplote 100°C/20 min. Po inkubácii sa zmes nechala centrifugovať pri 12 000 ot/6 min a supernatant bol následne použitý do reakcie.

Detekcia vybraných génov rezistencie *mcr-1* až *mcr-5* bola uskutočnená pomocou PCR, ktorá bola totožná ako v kapitole 3.2.3. PCR produkt bol následne analyzovaný gélovou elektroforézou, tak ako je to spomínané v kapitole 3.2.4.

V prípade výskytu niektorého z génov *mcr-1* až *mcr-5* sme z 24 hod starej kultúry odobrali kolóniu, ktorú sme preočkovali na čistý krvný agar. Po kultivácii pri 37 °C po dobu 24 hodín sme kolónie identifikovali pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF.

### **3.2.6 Identifikácia MALDI-TOF MS**

Hmotnostná spektrálna analýza sa uskutočnila za pomoci rýchlostného prístroja Autoflex (Bruker Daltonics), ktorý pracuje v lineárnom móde pomocou softvéru Flex Control 3.4 (Bruker Daltonics). Hmotnostné spektrá boli spracované štandardným postupom Biotyper (softvérová verzia 3.1, Bruker Daltonics).

Rodová a druhová identifikácia sa uskutočnila pomocou knižnice MALDI Biotyper (MBT) 6903 (Bruker Daltonics) a výsledky boli vyjadrené ako hodnota log podľa odporúčania Bruker Daltonics (0.000 – 1 699 nespoľahlivá identifikácia, 1 700 – 1 999 pravdepodobná identifikácia rodu, 2 000 – 2 299 bezpečná identifikácia rodu a pravdepodobná identifikácia druhov, 2 300 – 3 000 vysoko pravdepodobná identifikácia druhov).

## 4 Výsledky práce a diskusia

Liu a kol. ako prví identifikovali plazmidom sprostredkovaný gén *mcr-1* rezistentný proti kolistínu v Číne. V priebehu niekoľkých mesiacoch vedci poukázali na rozšírenie tohto génu v mnohých krajinách Európy, Ázie, Južnej a Severnej Amerike a v Afrike. Mikroorganizmy (predovšetkým gramnegatívne baktérie) pozitívne na výskyt génu *mcr-1* boli izolované z rôznych zdrojov, predovšetkým z hospodárskych zvierat ale aj zo životného prostredia, potravín a infikovaných ľudských pacientov (Liu a kol., 2016; Baron a kol., 2016; Shen a kol., 2016).

Na základe týchto faktov, v našej práci sme zisťovali, či sa vyskytuje horizontálne prenosná rezistencia proti kolistínu kódovaná génmi *mcr* vo vzorkách z prostredia, zvierat a prostredia ich chovu a potravín. Všetky naše izoláty boli testované na prítomnosť génov *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* a *mcr-5* pomocou PCR metódy.

### 4.1 Životné prostredie

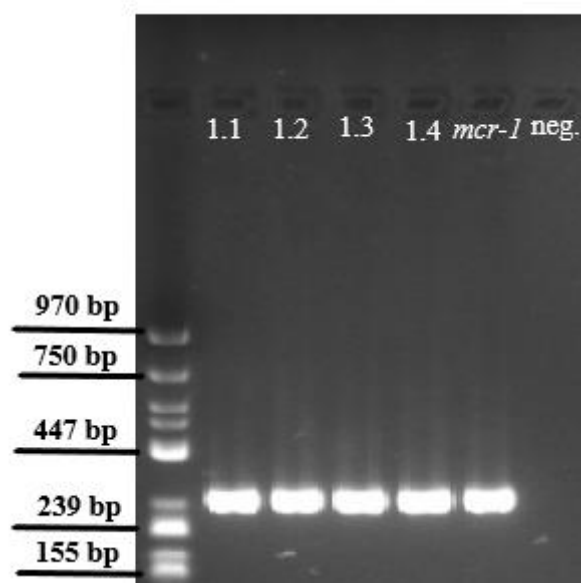
V našej práci sme analyzovali vzorky z vody, ČOV, okolia riek a rybníkov (bahno, hlina, piesok, pôda a riasy). Z testovaných 67 vzoriek v 2 vzorkách z odpadovej vody bol detegovaný gén *mcr-1*. Išlo o izoláty kmeňa *Escherichia coli*. Vo vzorke z rybníka Vlkov bol detegovaný gén *mcr-4* a išlo o izolát kmeňa *Shewanella putrefaciens*. V šiestich vzorkách bol identifikovaný gén *mcr-1* a *mcr-3*, u 15 vzoriek gén *mcr-4* a gén *mcr-5* bol identifikovaný u 8 vzoriek, ale len z PPV. Vykultivovať príslušný bakteriálny izolát sa nám už nepodarilo, čo mohlo byť spôsobené rôznymi faktormi, napr. kultivačnými podmienkami, teplotou, použitým médiom, baktéria mohla byť už mŕtva prípadne prerastaná inými baktériami alebo nízkym počtom baktérií. Príklady elektroforetických záznamov gélov sú uvedené na obr. 6, obr. 7 a obr. 8. Výsledky sú sumárne uvedené v tab. 12.

Gén *mcr-4* bol identifikovaný u *Salmonella* spp. a zistilo sa, že má 99 % nukleotidovú identitu s genómom *Shewanella frigidimarina* a častokrát koexistuje s ďalšími antimikrobiálnymi determinantmi, ktoré sú bežné v baktériách infikujúcich vodné živočíchy. Nakoľko sa kolistín používa aj v akvakultúre, predpokladá sa, že vodné baktérie ako napr. určité druhy *Shewanella*, môžu byť pôvodným genetickým rezervoárom génu *mcr-4* (Carattolli a kol., 2017; Zhang a kol., 2019).

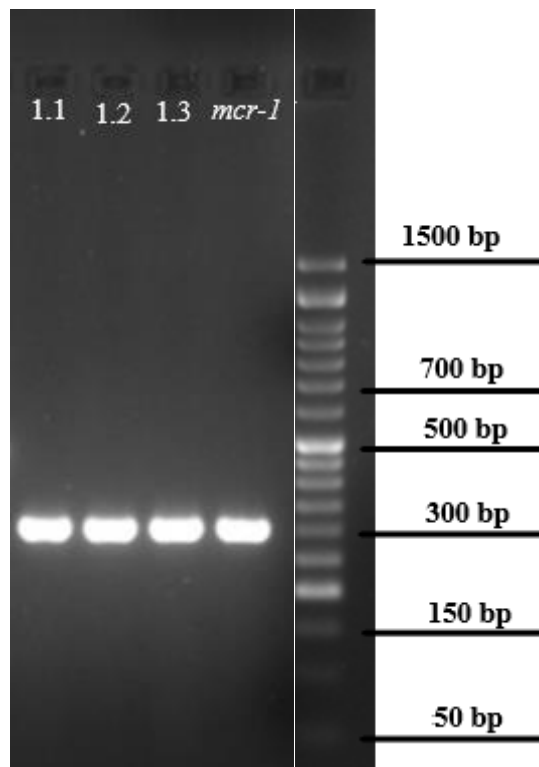
**Tab. 12:** Výsledky testovania výskytu génov *mcr* u testovaných vzoriek zo životného prostredia

Vzorka	Počet vzoriek	Počet pozitívnych vzoriek					Identifikácia na MALDI
		<i>mcr-1</i>	<i>mcr-2</i>	<i>mcr-3</i>	<i>mcr-4</i>	<i>mcr-5</i>	
<b>bahno</b>	24	0	0	0	2*	0	-
<b>hlina</b>	3	0	0	0	0	0	-
<b>piesok</b>	2	0	0	1*	0	0	-
<b>pôda</b>	7	0	0	0	0	0	-
<b>riasy</b>	5	1*	0	0	1*	0	-
<b>voda</b>	21	2*	0	2*	1 7*	3*	<i>Shewanella putrefaciens</i>
<b>odpadová voda</b>	5	2 3*	0	3*	5*	5*	<i>E. coli</i>

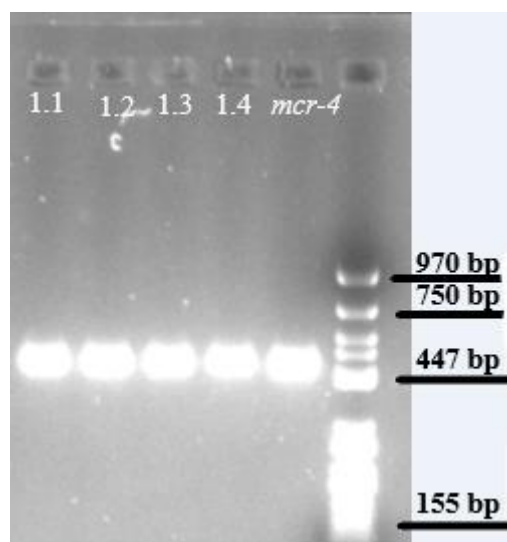
\*-vzorka pozitívna len z PPV, izolát získaný nebol



**Obr. 6:** Agarózová gélová elektroforéza PCR vzorky z ČOV Brno odobratej 25.4.2018. Vo vzorke bol detegovaný gén *mcr-1*



**Obr. 7:** Agarózová gélová elektroforéza PCR vzorky z ČOV Brno odobratej 22.8.2018. Vo vzorke bol detegovaný gén *mcr-1*



**Obr. 8:** Agarózová gélová elektroforéza PCR vzorky z rybníka Vlkov. Vo vzorke bol detegovaný gén *mcr-4*



Prítomnosť génov *mcr-1* v životnom prostredí bola skúmaná aj v ďalších krajinách Európskej únie a boli detegované gény v životnom prostredí. Ovejero a kol. zo vzoriek z rieky a kanalizácie v okolí Barcelony získali celkovo 195 izolátov. Za pomoci MALDI-TOF identifikovali prítomnosť baktérií: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter ludwigii* a *Enterobacter asburiae*. Ani jeden zo 105 izolátov, ktoré boli zozbierané z rieky, neboli pozitívne na gén *mcr-1*. Naopak, 30 z 90 izolátov, ktoré boli získané z ČOV, boli pozitívne na gén *mcr-1*. Pozitívne gény boli detegované u kmeňa *E. coli*, s výnimkou jedného, ktorý bol identifikovaný u *K. pneumoniae* (Ovejero a kol., 2017). Na druhej strane, gén *mcr-1* bol detegovaný v 1 zo 74 kmeňov, izolovaných zo švajčiarskej rieky Birs (Zurfuh a kol., 2016).

Nielen v Európe, ale aj v Južnej Amerike (v meste São Paulo, juhovýchodná Brazília) bol identifikovaný výskyt génu *mcr-1* v izolátoch *E. coli* zo vzoriek z pobrežnej vody z 11 rôznych verejných pláží. To poukazuje na možnosť prenosu génov *mcr-1* na miestnych obyvateľov, turistov i voľne žijúce zvieratá (Fernandes a kol., 2017).

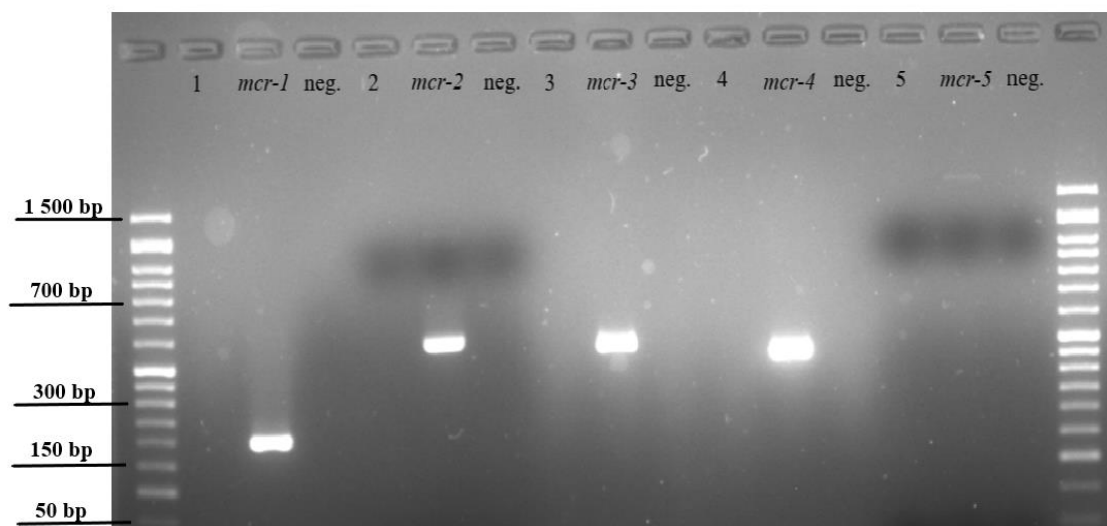
Vodné prostredie a predovšetkým odpadová voda zohráva dôležitú úlohu pri šírení rezistencie na antibiotiká, nakoľko pôsobí ako rezervoár, v ktorom dochádza častokrát k získavaniu, prenosu a genetickému vývoju génov rezistencie. Kombinácia vysokej hustoty buniek v nádržiach s aktivovaným kalom, zvýšená dostupnosť živín, ko-selekcia spôsobená ťažkými kovmi a selektívne tlaky spôsobené nízko koncentrovanými xenobiotikami (napr. ATB, biocídne látky, dezinfekčné prostriedky, liečivá) podporujú horizontálny prenos génov v prostredí odpadových vôd. Prítomnosť génu *mcr-1* vo vode, a teda v životnom prostredí, nielenže uľahčuje šírenie kolistín rezistentných kmeňov v populácií, ale taktiež podporuje prenos tohto génu medzi rôzne druhy (Hembach a kol., 2017).

## 4.2 Zvieratá a prostredie chovu

V období marec – august 2018 sme odobrali 151 vzoriek z 15 fariem z Českej republiky a 2 fariem zo Slovenska (tab. 6, str. 31). Tieto vzorky boli odobraté priamo zo zvierat (trus, rektálny výter, obsah čreva) a z prostredia ich chovu (kadavér, krmidlá, napájadla, podstielka, prach, vzdušné filtre). Výsledky detekcie génov sú zobrazené v tab. 13 a dokumentované na obr. 9. V žiadnej zo vzoriek nebol detegovaný *mcr* gén.

**Tab. 13:** Výsledky testovania výskytu génov *mcr* u testovaných vzoriek zo zvierat a prostredia ich chovu

Vzorka	Počet vzoriek	Počet pozitívnych vzoriek					Identifikácia na MALDI
		<i>mcr-1</i>	<i>mcr-2</i>	<i>mcr-3</i>	<i>mcr-4</i>	<i>mcr-5</i>	
obsah čreva	14	0	0	0	0	0	-
prostredie farmy	53	0	0	0	0	0	-
výter z rekta	74	0	0	0	0	0	-
trus	10	0	0	0	0	0	-



**Obr. 9:** Ukážka agarózovej gélovej elektroforézy PCR so vzorkami (1, 2, 3, 4 a 5), ktoré boli na výskyt génov *mcr* negatívne

Kolistín sa používa vo veterinárnej medicíne už desaťročia na prevenciu a liečbu infekcií spôsobených baktériami z čeľade *Enterobacteriaceae*. Objavenie horizontálneho mechanizmu rezistencie proti kolistínu u izolátov z hospodárskych zvierat (najmä u ošípaných) vyvolalo veľké obavy nakoľko už bola potvrdená aj väzba medzi ošípanými a ľuďmi z hľadiska prenosu kolistín rezistentných kmeňov *E. coli* pri priamom kontakte (Olaitan a kol., 2015).

Údaje, ktoré sa týkajú kolistínovej rezistencie u baktérií zo zvierat, častokrát súvisia s enteropatogénnou *E. coli* a *Salmonella* spp. Percentá rezistencie u patogénnej *E. coli* sú častokrát vysoké a pozitívne gény *mcr-1* boli detegované prevažne z ošípaných, hovädzieho dobytká a hydiny v rôznych krajinách. Pri *E. coli* ako indikátorovej baktérii, je hladina rezistencie proti kolistínu v Európe a Amerike často veľmi nízka, hoci v Ázii boli pozorované vyššie hladiny rezistencie. Gén *mcr-1* bol detegovaný u ošípaných, hovädzieho dobytká, hydiny a ich produktoch. Prevalencia kolistínovej rezistencie u *Salmonella* spp. pri zdravých zvieratách je zvyčajne nízka, ale závisí od pomeru sérotypov rezistentných proti kolistínu. Izoláty *Salmonella enterica* ser. Dublin a *S. enterica* ser. Enteritidis vykazovali vyššiu MIC proti kolistínu ako napr. *S. enterica* ser. typhimurium (Kempf a kol., 2016).

Identifikácia plazmidom sprostredkovanej rezistencie proti kolistínu kódovanej génmi *mcr* pri izolátoch zo zvierat, možnosť prenosu kolistín rezistentných génov zo zvierat na človeka a zachovanie účinnosti kolistínu ako antibiotika poslednej voľby viedla k prehodnoteniu používania kolistínu vo veterinárnej medicíne. Príkladom je Ministerstvo poľnohospodárstva Číny, ktoré rozhodlo zakázať používanie kolistínu ako rastového stimulátora vo výkrme hospodárskych zvierat. Európska agentúra pre lieky vydala v júni 2016 stanovisko, v ktorom sú uvedené aktualizované odporúčania o používaní kolistínových produktov u zvierat v rámci Európskej únie (Poirel a kol., 2017; Walsh a Wu, 2016; EMA, 2016).

## 4.3 Potraviny

V našej práci sme pozorovali výskyt *mcr* génov v 64 vzorkách potravín (41 vzoriek rastlinného pôvodu, 23 vzoriek živočíšneho pôvodu) zozbieraných v roku 2018, ktoré boli zakúpené v tržnej sieti Českej republiky. Do štúdia sme zahrnuli aj vzorky potravín, ktoré pochádzali a boli dovezené z iných Európskych krajín a krajín mimo Európskej únie (tab. 5, str. 30).

Výsledky detekcie génov *mcr* sú zobrazené v tab. 14. V potravinách rastlinného pôvodu nebol detegovaný žiaden *mcr* gén.

V prípade živočíšnych potravín sme v dvoch vzorkách zachytili pozitívny gén *mcr-4* (obr. 10). Išlo o kuracie mäso (kuracie zadné štvrte a kráľovská kuracia polievková zmes), ktoré pochádzalo zo Slovenska. Gén *mcr-4* bol detegovaný zo vzorky, ktorú sme odobrali z pomnoženej PPV. V ďalšom postupne, ktorý je opísaný v kapitole 3.2.5 (str. 35) a detekcií génov *mcr* pomocou PCR (kapitola 3.2.3, str. 34) sa nám však už nepodarilo vykultivovať príslušný bakteriálny izolát. Problémom mohli byť kultivačné podmienky, použité médium, teplota, prípadne došlo k poškodeniu baktérie alebo kontaminácii vzorky iným kmeňom.

**Tab. 14:** Výsledky testovania výskytu *mcr* génov u testovaných vzoriek potravín

Typ potraviny	Vzorka	Počet vzoriek	Počet pozitívnych vzoriek					Identifikácia na MALDI
			<i>mcr-1</i>	<i>mcr-2</i>	<i>mcr-3</i>	<i>mcr-4</i>	<i>mcr-5</i>	
Rastlinný pôvod	bylinky	2	0	0	0	0	0	-
	huba	1	0	0	0	0	0	-
	korenie	9	0	0	0	0	0	-
	ovocie	2	0	0	0	0	0	-
	smoothie	12	0	0	0	0	0	-
	suché plody	2	0	0	0	0	0	-
	zeleniny	13	0	0	0	0	0	-
Živočíšny pôvod	hovädzie mäso	8	0	0	0	0	0	-
	kráľčie mäso	1	0	0	0	0	0	-
	morčacie mäso	1	0	0	0	0	0	-
	kuracia pečienka	4	0	0	0	0	0	-
	kuracie mäso	5	0	0	0	2*	0	-
	morské plody	4	0	0	0	0	0	-

\*-vzorka pozitívna len z PPV, izolát získaný nebol



**Obr. 10:** Využitie multiplex PCR na detekciu génov *mcr-1*, *mcr-2* a *mcr-4*. Agarózová gélová elektroforéza PCR siedmych vzoriek z PPV. Vo vzorke č. 3 a vzorke č.4 (vzorky kuracieho mäsa) bol detegovaný gén *mcr-4*

Výskyt *mcr* génov v izolátoch rastlinných potravín je podstatne nižší ako u izolátov zo živočíšnych potravín. Napriek tomu nedávne štúdie naznačujú že čerstvá rastlinná produkcia môže byť jednou z možnosti šírenia génov rezistencie v komunite (Luo a kol., 2017; Zurfuh a kol., 2016). Karpíšková a kol. vo svojej štúdií potvrdili pozitívny nález plazmidovo viazanej rezistencie proti kolistínu v jednej vzorke mletého morčacieho mäsa pochádzajúceho z Poľska. Ich štúdia popisuje prvý nález *E. coli* s takýmto typom rezistencie izolovanej z potravín z tržnej siete Českej republiky a potvrdzuje, že kolistín rezistentné kmene môžu byť do Českej republiky importované v potravinách zo susedných krajín (Karpíšková a kol., 2017). Používanie kolistínu vo veterinárnej oblasti je predpokladom pôvodného zdroja génu *mcr-1*, nakoľko pozitívne izoláty *E. coli* boli identifikované prevažne u hospodárskych zvierat (Sun a kol., 2018).

Aj napriek tomu, že v našej práci sme *mcr* gény nedetegovali, množstvo štúdií z Ázie, Európy a Ameriky poukazuje na výskyt *mcr* génov v potravinách, ktoré predstavujú možný spôsob prenosu a cestu šírenia kolistínovej rezistencie.

## 5 Záver

Cieľom diplomovej práce bolo objasniť, či sa u gramnegatívnych baktérií izolovaných z non-humánných zdrojov vyskytuje novo opísaná horizontálne prenosná rezistencia proti kolistínu kódovaná génmi *mcr*. Na analýzu sme použili 67 vzoriek zo životného prostredia, 151 vzoriek zo zvierat a z prostredia ich chovu a 64 vzoriek potravín.

Získané výsledky nám dali podklad pre nasledovné tvrdenia:

- gén *mcr-1* bol identifikovaný v 2 izolátoch *Escherichia coli* zo vzoriek odpadovej vody
- gén *mcr-4* bol identifikovaný v 1 izoláte *Shewanella putrefaciens* zo vzorky z vody z rybníka Vlkov
- žiaden gén *mcr* nebol detegovaný vo vzorkách zo zvierat a z prostredia ich chovu
- žiaden gén *mcr* nebol detegovaný vo vzorkách rastlinných potravín
- gén *mcr-4* bol detegovaný v 2 vzorkách potravín živočíšneho pôvodu (kuracie mäso), avšak príslušný bakteriálny izolát sme už nezachytili
- gramnegatívne baktérie nesúce gény *mcr* v životnom prostredí ČR predstavujú možný spôsob prenosu a cestu šírenia tohto typu rezistencie.

Objavenie horizontálne prenosnej rezistencie proti kolistínu kódovanej génmi *mcr* predstavuje veľký problém pri obnovení kolistínu ako lieku poslednej voľby proti infekciám spôsobeným multirezistentnými baktériami. Rýchle šírenie, celosvetová prevalencia *mcr* génov a kolistínová rezistencia na rozhraní človek-zviera-životné prostredie je už teraz hrozbou pre poľnohospodársku výrobu a verejné zdravie a je nutné urýchlene používať koncepty na účinnú kontrolu a prevenciu, ktoré si vyžaduje spoločné úsilie viacerých disciplín a spoluprácu medzi lekármi, veterinármi a ďalšími odborníkmi v oblasti zdravia a životného prostredia.

## 6 Zoznam použitej literatúry

ABUOUN, M. a kol. 2017. *mcr-1* and *mcr-2* (*mcr-6.1*) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017, 72(10), 2745 – 2749. DOI: 10.1093/jac/dkx286

AH, Y.-M. – KIM, A.-J. – LEE, J.-Y. 2014. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2014, 44(1), 8-15. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2014.02.016

AQUILINI, E. a kol. 2014. Functional Identification of *Proteus mirabilis* *eptC* Gene Encoding a Core Lipopolysaccharide Phosphoethanolamine Transferase. *Int J Mol Sci*. 2014, 15(4), 6689-6702. DOI: 10.3390/ijms15046689

BARDET, L. – ROLAIN, J.-M. 2018. Development of New Tools to Detect Colistin-Resistance among Enterobacteriaceae Strains. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2018. DOI: 10.1155/2018/3095249

BARNETT, M. – BUSHBY, S. R. M. – WILKINSON, S. 1964. Sodium sulphomethyl derivatives of polymyxins. *Br J Pharmacol Chemother.*. 1964, 23(3): 552 – 574.

BARON, S. a kol. 2016. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2016, 48, 583-591. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023

BENEŠ, J. 2018. Antibiotika – systematika, vlastnosti, použití. *Grada*. 2018. ISBN: 978-80-271-0636-3

BOROWIAK, M. a kol. 2017. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in *d*-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J Antimicrob Chemother*. 2017; 72: 3317 – 3324.

CARATTOLLI, A. a kol. 2017. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* 2017, 22(31). DOI: 10.2807/1560-7917

CATRY, B. a kol. 2015. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2013, 46(3), 297 – 306. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2015.06.005

DERIS, Z. Z. a kol. 2014. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *Journal of antibiotics (Tokyo).* 2014, 67(2): 147 – 151. DOI: 10.1038/ja.2013.111

ECDC. 2017. Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union. *European Centre for Disease Prevention and Control.* 2017. dostupné na internete: [https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Final\\_2017\\_EAAD\\_ESAC-Net\\_Summary-edited%20-%20FINALwith%20erratum.pdf](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Final_2017_EAAD_ESAC-Net_Summary-edited%20-%20FINALwith%20erratum.pdf)

EMA. 2016. Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health. *European Medicines Agency.* 2016, 231573. dostupné na internete: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2016/05/WC500207233.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/05/WC500207233.pdf)

FALAGAS, M. E. – KASIAKOU, S. K. – SARAVOLATZ, L. D. 2005. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug – Resistant Gram – Negative Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases.* 2005, 40(9), 1333-1341. DOI: 10.1086/429323

FALGENHAUER, L. a kol. 2016. Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. *Lancet Infect Dis.* 2016, 16(3), 282-3. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)00009-8



FERNANDES, M. R. a kol. 2017. Colistin-Resistant *mcr-1*-Positive *Escherichia coli* on Public Beaches, an Infectious Threat Emerging in Recreational Waters. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017, 61(7). DOI: 10.1128/AAC.00234-17

FRESNO, S. a kol. 2006. The ionic interaction of *Klebsiella pneumoniae* K2 capsule and core lipopolysaccharide. *Microbiology.* 2006, 152(6), 1807 – 18.

GALES, A. C. – JONES, R. N. – SADER, H. S. 2011. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the Sentry Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2011. 66, 2070-2074. DOI: 10.1093/jac/dkr239

GHAFUR, A. a kol. 2019. Detection of chromosomal and plasmid-mediated mechanisms of colistin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Indian food samples. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* 2019,16, 48 – 52. DOI: 10.1016/j.jgar.2018.09.005

HASMAN, H. a kol. 2015. Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistance *Escherichia coli* isolated from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Euro Surveill.* 2015, 20(49). DOI: 10.2807/1560-7917

HEMBACH, N. a kol. 2017. Occurrence of the *mcr-1* Colistin Resistance Gene and other Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Microbial Populations at Different Municipal Wastewater Treatment Plants in Germany. *Front. Microbiol.* 2017, 11(8), 1282. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01282

CHEN, L. a kol. 2018. Newly identified colistin resistance genes, *mcr-4* and *mcr-5*, from upper and lower alimentary tract of pigs and poultry in China. *PLoS One.* 2018, 13(3). DOI: 10.1371/journal.pone.0193957

IRRGANG, A. a kol. 2016. Prevalence of *mcr-1* in *E. coli* from Livestock and Food in Germany, 2010 – 2015. *PLoS One.* 2016, 11(7). DOI: 10.1371/journal.pone.0159863

KARPÍŠKOVÁ, R. a kol. 2017. Ojedinělý mechanismus rezistence ke kolistinu u *Escherichia coli* izolované ze syrového drůbežního masa. *Klin mikrobiol inf lék.* 2017, 23(2), 58-60.

KAWANISHI, M. a kol. 2017. Prevalence of Colistin Resistance Gene *mcr-1* and Absence of *mcr-2* in *Escherichia coli* Isolated from Healthy Food-Producing Animals in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017, 61(1). DOI: 10.1128/AAC.02057-16

KEMPF, I. – JOUY, E. – CHAUVIN, C. 2016. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *Int J Antimicrob Agents.* 2016, 48(6), 598-606. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.09.016

KUSUMOTO, M. a kol. 2016. Colistin-Resistant *mcr-1* – Positive Pathogen *Escherichia coli* in Swine, Japan, 2007 – 2014. *Emerg Infect Dis.* 2016, 22(7), 1315 – 1317. DOI: 10.3201/eid2207.160234

LANDMAN, D. a kol. 2008. Polymyxins Revisited. *Clinical Microbiology Reviews.* 2008, 449-456. DOI: 10.1128/CMR.00006-08

LI, J. a kol. 2005. Evaluation of colistin as an agent against multi – resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 2005, 25(1): 11– 25. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2004.10.001

LI, X.-Z. – PLÉSIAT, P. – NIKAIDO, H. 2015. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2015, 28, 337 – 418.

LIAKOPOULOS a kol. 2016. The colistin resistance *mcr-1* gene is going wild. *J Antimicrob Chemother.* 2016, 71(8), 2335-6. DOI: 10.1093/jac/dkw262

LIU, Y. Y. a kol. 2016. Emergency of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and humans in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases.* 2016, 16(2), 161 – 168. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7

LUO, J. a kol. 2017. Emergency of *mcr-1* in *Raoultella ornithinolytica* and *Escherichia coli* Isolates from Retail Vegetables in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017, 61(10). DOI: 10.1128/AAC.01139-17

MAJUMDAR, S. D. a kol. 2015. Elucidation of the RamA regulon in *Klebsiella pneumoniae* reveals a role in LPS regulation. *PLoS Pathog.* 2015, 11(1). DOI: 10.1371/journal.ppat.1004627

MALHOTRA-KUMAR, S. a kol. 2016. Colistin resistance gene *mcr-1* harboured on a multidrug resistant plasmid. *Lancet Infect Dis.* 2016, 16(3), 283 – 284. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)00012-8

MEINERSMANN, R. J. a kol. 2017. Prevalence of *mcr-1* in the Cecal Contents of food Animals in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017, 61(2). DOI: 10.1128/AAC.02244-16

MOFFATT, J. H. a kol. 2010. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010, 54, 4971 – 4977

MOHSIN, M. a kol. 2016. First description of plasmid-mediated colistin-resistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a wild migratory bird from Asia. *Int J Antimicrob Agents.* 2016, 48, 463 – 464.

MONTE, D. F. a kol. 2017. Chicken Meat as a Reservoir of Colistin-Resistant *Escherichia coli* Strains Carrying *mcr-1* Genes in South America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017, 61(5). DOI: 10.1128/AAC.02718-16

OLAITAN, A. O. – MORAND, S. – ROLAIN, J. – M. 2014. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 2014, 5, 643.

OLAITAN, A. O. a kol. 2015. Clonal transmission of a colistin-resistant *Escherichia coli* from a domesticated pig to a human in Laos. *J Antimicrob Chemother.* 2015, 70(12), 3402-4. DOI: 10.1093/jac/dkv252

ORWA, J.A. a kol. 2001. Isolation and structural characterization of colistin components. *Journal of antibiotics (Tokyo).* 2001, 54(7): 595 – 9.

OVEJERO, C. M. a kol. 2017. Spread of *mcr-1* carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017, 72(4), 1050-1053. DOI: 10.1093/jac/dkw533

PERRIN-GUYOMARD, A. a kol. 2016. Prevalence of *mcr-1* in commensal *Escherichia coli* from French livestock, 2007 to 2014. *Euro Surveill*. 2016, 21(6). DOI: 10.2807/1560-7917

PILONIETA, M.C. a kol. 2009. A protein important for antimicrobial peptide resistance, Ydel/OmdA, is in the periplasm and interacts with OmpD/NmpC. *J Bacteriol*. 2009, 191(23), 7243 – 52. DOI: 10.1128/JB.00688-09

POIREL, L. – JAYOL, A. – NORDMANN, P. 2017. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews*. 2017, 30(2): 557 – 596. DOI: 10.1128/CMR.00064-16

QURESHI, Z. A. a kol. 2015. Colistin-resistance *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. *Clin Infect Dis*. 2015, 60, 1295 – 1303.

REBELO, A.R. a kol. 2018. Multiplex PCR for detection of plasmid – mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Euro Surveill*. 2018, 23(6): 17 – 00672. DOI: 10.2807/1560-7917

SADER, H. S. a kol. 2014. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009-2011). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2014, 78, 443-448. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.025

SHEN, Z. a kol. 2016. Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016, 16(3), 293. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)00061-X

SKOV, R. L. – MONNET, D. L. 2016. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill*. 2016, 21(9): 30155. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30155

SPINOSA, M. R. a kol. 2007. The *Neisseria meningitidis* capsule is important for intracellular survival in human cells. *Infect Immun.* 2007, 75, 3594 – 3603.

SRINIVASAN, V. B. – RAJAMOHAN, G. 2013. KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013, 57, 4449 – 4462

SUN, J. a kol. 2018. Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends in Microbiology.* 2018, 26(9), 794-808. DOI: 10.1016/j.tim.2018.02.006

TRIMBLE, M. J. a kol. 2016. Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016, 6(10). DOI: 10.1101/cshperspect.a025288

TRUNG, N. V. a kol. 2017. Zoonotic Transmission of *mcr-1* Colistin Resistance Gene from Small-Scale Poultry Farms, Vietnam. *Emerg Infect Dis.* 2017, 23(3), 529-532. DOI: 10.3201/eid2303.161553

WALSH, T.R. – WU, Y. 2016. China bans colistin as a feed additive for animals. *Lancet Infect Dis.* 2016, 16(10), 1102 – 1103. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30329-2

WANG, X. a kol. 2018. Emergency of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging Microbes & Infections.* 2018, 122(7). DOI: 10.1038/s41426-018-0124-z

WHO. 2018. The detection and reporting of colistin resistance. *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System.* 2018. Dostupné na internete: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277175/WHO-WSI-AMR-2018.4-eng.pdf?ua=1>

XAVIER, B. B. a kol. 2016. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill.* 2016, 21(27). DOI: 10.2807/1560-7917

YANG, Y.-Q. a kol. 2018. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018, 73(7), 1791-1795. DOI: 10.1093/jac/dky111

YAO, X. a kol. 2016. Carbapenem-resistant and colistin-resistant *Escherichia coli* co-producing NDM-9 and MCR-1. *Lancet Infect Dis*. 2016, 16(3), 288-289. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)00057-8

YIN, W. a kol. 2017. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *MBio*. 2017; 8(3). DOI: 10.1128/mBio.00543-17

YU, Z. a kol. 2015. Antibacterial Mechanisms of Polymyxin and Bacterial Resistance. *BioMed Research International*. 2015, 1-11. DOI: 10.1155/2015/679109

ZHANG, H. a kol. 2019. Action and mechanism of the colistin resistance enzyme MCR-4. *Commun Biol*. 2019, 2: 36. DOI: 10.1038/s42003-018-0278-1

ZURFUH, K. a kol. 2016. Occurrence of the Plasmid-Borne *mcr-1* Colistin Resistance Gene in Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in River Water and Imported Vegetable Samples in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016, 60(4), 2594 – 2595. DOI: 10.1128/AAC.00066-16

## 7 Zoznam použitých skratiek

BMD	bujónová mikrodulučná metóda
CLSI	Inštitút pre klinické a laboratórne normy
CMS	sodná soľ kolistínmetánu
CPS	kapsulárny polysacharid
ČOV	čistiareň odpadových vôd
DDD	definovaná denná dávka
ESBL	<i>Enterobacteriaceae</i> produkujúce široké spektrum $\beta$ -laktamáz
EUCAST	Európsky výbor pre testovanie antimikrobiálnej citlivosti
Kdo	kyselina 3-deoxy-D-manno-okt-ulózonová
L-Ara4N	4-amino-4deoxy-L-arabinóza
LPS	lipopolysacharid
MIC	minimálna inhibičná koncentrácia
MO	mikroorganizmy
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PEtN	fosfoetanolamín
UDPGA	kyselina uridíndifosfát-glukuronová