

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli.

Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



David Hepnar

**Genová exprese genů porinů a beta-laktamáz
během účinku beta-laktamových antibiotik a efekt inokula u klinických
izolátů *Klebsiella pneumoniae***

**Gene expression of porin and beta-lactamases genes during the beta-lactam
antibiotic treatment and effect of inoculum size on *Klebsiella pneumoniae* clinical
isolates**

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

MUDr. Helena Žemličková Ph.D.

Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25.8.2011

Podpis

Poděkování:

Děkuji Ing. Jaroslavu Hrabákovi Ph.D. za jeho obětavost, pochopení, přístup a odborné vedení, které mi umožnilo realizovat tuto diplomovou práci.

Děkuji MUDr. Heleně Žemličkové Ph.D. za její ochotu a vstřícnost, která mi umožnila realizovat diplomovou práci na pro mne zajímavé a profesně blízké téma.

Děkuji Daně Červené, DiS., a Bc. Vendule Študentové za jejich pomoc a spolupráci v laboratořích.

Děkuji mé rodině za neskonalou trpělivost, kterou se mnou mají.

Děkuji svým kolegům v laboratoři za jejich toleranci a pomoc.

Tato diplomová práce vznikla v letech 2009-2011 a byla mimo jiné financována za grantů MSM 0021620819 a NS9717-4/2008.

Genová exprese genů porinů a beta-laktamázy během účinku beta-laktamových antibiotik a efekt inokula u klinických izolátů *Klebsiella pneumoniae*

ABSTRAKT

V posledních letech narůstá počet publikací, které se zabývají *Klebsiella pneumoniae* jako jedním z nejvýznamnějších nozokomiálních patogenů a předmětem studií je především narůstající rezistence k širokému spektru antibiotik. Diplomová práce je zaměřena na expresi genů skupiny *AmpC* – a to β -laktamázy DHA-1 a jejího negativního regulátoru AmpR a současně i porinů OmpK35 a OmpK36 a na efekt inokula. V práci byly použity již dříve charakterizované kmeny *Klebsiella pneumoniae*. Plazmidy, které byly získány z těchto kmenů byly transformovány do typově odlišných divokých kmenů *Klebsiella pneumoniae* a následně byla provedena jejich typizace s pomocí pulzní gelové elektroforézy (PFGE) a multilokusové sekvenační typizace (MLST). Pro sledování genové exprese byla použita metoda RT-PCR s použitím specifických primerů a TaqMan sond. Ve většině vzorků byla exprese závislá na přítomnosti induktoru. Vysoce rezistentní kmeny vykazují různý expresní profil, ale exprese *bla*_{DHA-1} zůstává indukovatelná cefoxitinem. Různá regulace exprese byla také pozorována u transformantů. Na základě získaných údajů se domníváme, že dříve popsany regulační mechanismus genů skupiny *AmpC* není všeobecně použitelný a získané výsledky naznačují, že regulace je ovlivněna více faktory. Skutečnost, že AmpC se chová odlišně v různých klonech, podstatně komplikuje obecně přijatá interpretační kritéria a stejně tak i statistickou analýzu klinických nálezů.

Klíčová slova

AmpC, β -laktamáza, ST11, OmpK35, OmpK36, efekt inokula

Gene expression of porin and beta-lactamases genes during the beta-lactam antibiotic treatment and effect of inoculum size on *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates

ABSTRACT

In recent years, *Klebsiella pneumoniae* has been increasingly reported to be one of the most important nosocomial pathogens, and it is usually resistant to many antibiotics. In this work, we focused on the expression of the *AmpC* group β -lactamase DHA-1 and its negative regulator *AmpR*, as well as the porins OmpK35 and OmpK36 and on effect of inoculum. We used well-characterized *Klebsiella pneumoniae* strains in this study. Plasmids obtained from these strains were also transformed into different wild-type *Klebsiella pneumoniae* strains, which were typed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multi-locus sequence typing (MLST). Gene expression analysis was performed by RT-PCR using specific primers and TaqMan probes. In most strains, expression was dependent on the presence of an inducer. The highly resistant strain showed a different expression pattern, but the expression of *bla*_{DHA-1} remained inducible by cefoxitin. Different regulation was also observed in the transformants. Based on our data, we suggest that the previously described regulatory pathway for *AmpC* is not generally suitable, and we propose that there are more regulatory factors in the pathway. The fact that *AmpC* behaves differently in different clones also complicates the establishment of general interpretation criteria as well as the statistical analysis of clinical outcomes.

Keywords

AmpC, β -lactamase, ST11, OmpK35, OmpK36, inoculum effect

OBSAH

0	<u>ÚVOD</u>	11
1	<u>PŘEHLED LITERATURY</u>	13
1.1	TAXONOMIE RODU <i>KLEBSIELLA</i>	13
1.2	FYZIOLOGIE	14
1.3	GENETIKA	15
1.4	PATOGENITA	16
1.4.1	KAPSULÁRNÍ ANTIGENY	21
1.4.2	FIMBRIE (PILI)	23
1.5	CHARAKTERIZACE A TYPIZACE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	24
1.6	ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE	26
1.6.1	MUTACE	26
1.6.2	ROZŠÍŘENÍ GENOMU	27
1.6.3	MEMBRÁNOVÉ ELEMENTY PODÍLEJÍCÍ SE NA REZISTENCI	34
1.7	PORINY	35
1.8	AMPK β -LAKTAMÁZY	39
2	<u>MATERIÁL A METODIKA</u>	48
2.1	MATERIÁL	48
2.1.1	BAKTERIÁLNÍ KMENY	48
2.1.2	PRIMERY	48
2.1.3	CHEMIKÁLIE	50
2.1.4	KOMERČNÍ SADY	50
2.1.5	ENZYMY	51
2.1.6	ANTIBIOTIKA	51
2.1.7	KULTIVAČNÍ MÉDIA	52
2.1.8	ROZTOKY	52
2.1.9	POČÍTAČOVÉ PROGRAMY A INTERNETOVÉ DATABÁZE	53
2.1.10	PŘÍSTROJE A LABORATORNÍ ZAŘÍZENÍ	53
2.2	METODIKA	54
2.2.1	KULTIVACE BAKTERIÍ V TEKUTÉM MÉDIU	54
2.2.2	KULTIVACE BAKTERIÍ NA PEVNÉM MÉDIU	54
2.2.3	UCHOVÁVÁNÍ BAKTERIÁLNÍCH KULTUR	54
2.2.4	MĚŘENÍ OPTICKÉ DENZITY BAKTERIÁLNÍ KULTURY	54
2.2.5	RŮSTOVÁ KŘIVKA <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	55
2.2.6	STANOVENÍ MINIMÁLNÍCH INHIBIČNÍCH KONCENTRACÍ	56
2.2.7	SLEDOVÁNÍ GENOVÉ EXPRESE GENŮ PORINŮ A BETA-LAKTAMÁZ	56
2.2.8	TRANSFORMACE PLAZMIDŮ	60
2.2.9	PULZNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	62
2.2.10	MULTILOKUSOVÁ SEKVENAČNÍ TYPIZACE (MLST)	64
3	<u>VÝSLEDKY</u>	65
3.1	SLEDOVÁNÍ EFEKTU INOKULA U MINIMÁLNÍCH INHIBIČNÍCH KONCENTRACÍ	66
3.2	ODBĚR VZORKŮ PRO SLEDOVÁNÍ EXPRESE B-LAKTAMÁZY DHA-1, REGULAČNÍHO PROTEINU AMPK A PORINŮ OMPK35 A OMPK36	67
3.3	SLEDOVÁNÍ EXPRESE GENŮ DHA-1, AMPK, OMPK35, OMPK36	70
3.4	PRODUKCE DHA-1 OVLIVNĚNÁ CEFOXITINEM	76
3.5	TRANSFORMACE PLAZMIDŮ	77

3.6	PULZNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	78
3.7	TYPIZACE KMENŮ METODOU MULTILOKUSOVÉ SEKVENAČNÍ TYPIZACE	79
<u>4</u>	<u>DISKUZE.....</u>	<u>80</u>
<u>5</u>	<u>SOUHRN.....</u>	<u>83</u>
<u>6</u>	<u>LITERATURA</u>	<u>85</u>

PŘÍLOHA Č.1 – NÁVRH ČLÁNKU K PUBLIKACI ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Seznam používaných zkratk

- ACC – typ β -laktamázy
- ACT – typ β -laktamázy
- ADP – adenosindifosfát
- BHI – Brain heart infusion médium
- BHQ – black hole quencher
- bla* – označení genů kódujících β -laktamázy
- CAZ – ceftazidim
- CFE – typ β -laktamázy
- CFU – colony forming unit
- CLSI – Clinical laboratory and standards institute
- CMY – typ β -laktamázy
- CTX – cefotaxim (vyplývá z textu)
- CTX – typ β -laktamázy (vyplývá z textu)
- DHA – typ β -laktamázy
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová
- ESBL – širokospektrá β -laktamáza
- EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- FAM – karboxyfluorescein
- FEP – cefepim
- FOX – typ β -laktamázy
- GES – typ β -laktamázy
- IMP – typ β -laktamázy
- IS – inzerční sekvence
- LAT – typ β -laktamázy
- LB – Luria – Bertani médium
- Mbp – milion párů bazí
- MIC – minimální inhibiční koncentrace
- MIR – typ β -laktamázy
- MLST – multilokusová sekvenační typizace
- MOX – typ β -laktamázy
- Omp – vnější membránový protein

OXA – typ β -laktamázy
PCR – polymerázová řetězová reakce
PFGE – pulzní gelová elektroforéza
PSE – typ β -laktamázy
RNA – ribonukleová kyselina
RT – reverzní transkripce
SDS – dodecylsulfát sodný
SHV – typ β -laktamázy
ST – označení kmenu
TE, TBE – Tris EDTA pufr, Tris-borát-EDTA pufr
TEM – typ β -laktamázy
UDP – uridindifosfát
VIM – typ β -laktamázy
XbaI – exonukleáza

0 Úvod

V posledních letech prudce narůstá počet zdokumentovaných případů akvizice genů β -laktamáz (β -laktamázy s rozšířeným spektrem účinku, AmpC cefalosporinázy, karbapenemázy) u druhu *Klebsiella pneumoniae*. Mezi významné β -laktamázy patří především cefalosporinázy AmpC – serinové proteázy, které jsou schopny hydrolýzy penicilinů a cefalosporinů, inhibovatelné kloxacilem a kyselinou fenyloboritou (HRABÁK 2007). Rozsah účinku těchto cefalosporináz je významný především z pohledu antibiotické léčby, protože zmíněná antibiotika patří k významným lékům při léčbě závažných infekcí.

Mechanismus odpovědi na antibiotikum ze strany *Klebsiella pneumoniae* zahrnuje nejenom získané geny pro produkci cefalosporináz kam patří i námi sledovaná skupina genů *AmpC*, ale i regulace produkce porinů OmpK35 a OmpK36, které umožňují vstup β -laktamů do periplasmového prostoru (HRABÁK 2008).

Jednou z rozšířených *AmpC* cefalosporináz u kmenů *Klebsiella pneumoniae* je získaná cefalosporináza DHA-1, kódovaná genem *bla*_{DHA-1}. Původ tohoto enzymu je pravděpodobně u vlastní (angl. intrinsic) *AmpC* přítomné v genomu *Morganella morganii*, kde se gen *bla*_{DHA-1} nachází spolu s negativním regulátorem *AmpR*. Mobilizací tohoto elementu inserční sekvencí *ISCR1* došlo k přenosu celého clusteru na plazmid. Jestliže je mobilizován pouze gen *bla*_{DHA-1}, k indukci produkce enzymu nedochází. Význam regulátoru *AmpR*, který je obecně popisován jako DNA vazebný protein regulující expresi *AmpC*, byl popsán v předchozích studiích (REISBIG *et al.* 2003).

Samotná indukce *AmpC* genů je popisována jako podmíněná přítomností genových produktů v podobě AmpG, AmpD (proteiny podílející se na syntéze peptidoglykanu) a AmpR, lze ji však také indukovat přítomností některých antibiotik, jako například cefoxitin a imipenem (REISBIG *et al.* 2003).

Na rozdíl od sousedních střeoevropských států, je výskyt *AmpC* typu DHA-1 u *K. pneumoniae* v České republice poměrně častý, proto je

předmětem mojí práce především ověření doposud popsaných mechanismů rezistence na úrovni studia exprese genů podílejících se na expresi *AmpC* a hlavních porinů *OmpK35* a *OmpK36* a vlivu subinhibičních dávek cefotaximu. Cefotaxim byl zvolen z důvodu nízkých hodnot minimálních inhibičních koncentrací, kdy toto antibiotikum může být z hlediska současných interpretačních kritérií (EUCAST, CLSI) použito k léčbě infekcí způsobených takovými kmeny. Práce je zároveň zaměřena na zjištění efektu inokula u kmenů *Klebsiella pneumoniae* produkujících enzym DHA-1.

Konkrétní cíle práce jsou:

- 1) Charakterizace klinických izolátů *Klebsiella pneumoniae* (metody multilokusová sekvenční typizace (MLST), pulzní gelová elektroforéza (PFGE), replikonová typizace plazmidů, identifikace β -laktamáz).
- 2) Stanovení minimálních inhibičních koncentrací.
- 3) Zjištění závislosti minimálních inhibičních koncentrací a velikosti inokula u vybraných β -laktamů (cefalosporinů 3. a 4. generace a karbapenemů).
- 4) Stanovení exprese hlavních porinů a β -laktamáz během různých fází letálního účinku antibiotika.

1 Přehled literatury

Klebsiella sp. je popisována jako bakterie všudypřítomná v přírodě. Obvykle jsou v literatuře uváděny dvě oblasti výskytu a to běžně v životním prostředí - v půdě, odpadních vodách nebo na rostlinách a ve druhém případě na povrchu sliznic savců – prasat, koní nebo člověka, které kolonizují. Vyskytuje se jako součást přirozené flóry v ústech, trávicím traktu nebo na kůži.

Klebsiella pneumoniae patří mezi gramnegativní, fakultativně anaerobní bakterie. Taxonomicky se řadí do rozsáhlé čeledi *Enterobacteriaceae*, kam mimo samotnou *K. pneumoniae* patří další druhy jako např. *K. ozaenae* nebo *K. rhinoscleromatis*, ale i jiné významné rody bakterií, především *Shigella sp.* (v současnosti z taxonomického hlediska náležející k druhu *E. coli*), *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.* nebo *Yersinia sp.*

1.1 Taxonomie rodu *Klebsiella*

Od roku 1980 se do rodu *Klebsiella* zařadily i organismy známé jako „*Klebsiella*-like organismy“. V rámci taxonomického rozdělení byly popsány čtyři nové druhy: *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella trevisanii*, nicméně později byly poslední dva druhy sloučeny pod druh *Klebsiella planticola* s ohledem na jejich vysokou homologii sekvencí DNA (GAVINI 1986). Prvotní výskyt nových druhů byl sice zaznamenán především v půdě a ve vodním prostředí, nicméně později byl prokázán i jejich význam jako původců nozokomiálních infekcí, u *Klebsiella planticola* navíc s vysokou frekvencí přenosu. (PODSCHUN a ULLMANN 1994). Většina izolátů pocházela z respiračního traktu, nicméně poměrně častý výskyt byl zaznamenán i při infekci močových cest. Hlavními patogeny zůstávají *Klebsiella pneumoniae* a *Klebsiella oxytoca*, nicméně i jiné druhy *Klebsiella* mohou způsobovat infekční onemocnění. Pro úplnost je nezbytné dodat, že taxonomická klasifikace se u rodu *Klebsiella* mezi autory liší a v některé literatuře je *Klebsiella pneumoniae* uváděna jako

Klebsiella aerogenes, nicméně v diplomové práci je uváděna jako *K.pneumoniae* a to především v návaznosti na Bergey's Manual (www.bergeys.org) Nejpoužívanější taxonomickou klasifikací je klasifikace dle Orskova. Přehled používaných taxonomických rozdělení dle autorů je uveden v Tab. 1.

Autor	Cowan	Bascomb	Orskov
Druh	<i>K. aerogenes, edwardsii</i> subsp. <i>edwardsii</i> subsp. <i>atlantae</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>K. ozaenae</i> <i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. aerogenes, oxytoca,</i> <i>edwardsii</i> <i>K. pneumoniae</i> sensu stricto / lato <i>K. ozaenae</i> <i>K. rhinoscleromatis</i> <i>K. "unnamed group"</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i> <i>K. oxytoca</i> <i>K. terrigena</i> <i>K. planticola</i> (syn. <i>K. trevisanii</i>) <i>K. ornithinolytica</i>

Tab.1 – Taxonomický přehled rodu *Klebsiella* různých autorů (MURRAY et al. 2007)

1.2 Fyziologie

Samotná *Klebsiella pneumoniae* je tyčinkovitá, nepohyblivá, opouzdřená bakterie, charakteristická fermentací laktózy, obvyklého rozměru 2 µm x 0.5 µm.

Klebsiella pneumoniae je opouzdřená polysacharidovým pouzdrem, které chrání bakterii před fagocytózou a dává rostoucím koloniím charakteristickou mukózní podobu. V literatuře bylo popsáno 82 kapsulových antigenů, z nichž 77 tvoří základní rozpoznávací schéma pro popis jednotlivých typů. Serotypizace byla jednou z nejrozšířenějších technik pro srovnávání izolátů *Klebsiella ssp.* (ORSKOV 1984). V současnosti je nahrazena molekulárně-genetickými metodami, jako například multilokusovou sekvenční typizací (MLST) (DIANCOURT et al. 2005). Identifikace druhů se provádí také s pomocí biochemických testů,

charakteristickým projevem je produkce lysinové dekarboxylázy, absence ornithinové dekarboxylázy a většina druhů je pozitivní na Voges-Proskauerův test. Mezdruhové rozlišení lze provést na základě výsledků testů, uvedených v Tab. 2 (MURRAY *et al.* 2007). Pro určení některých druhů se pak používají další vybrané testy jako například utilizace *m*-hydroxybenzoátu nebo hydroxy-L-prolinu.

Pro druh *Klebsiella pneumoniae* je charakteristická fixace dusíku. V čeledi *Enterobacteriaceae* se jedná o unikátní vlastnost, jejímž výsledkem je redukce vzdušného dusíku na amoniak. (HSUEH 1977) Bylo zjištěno, že na regulaci genů pro nitrogenázu se podílí strukturní geny pro glutaminsyntázu *glnA* a *glnG*. Dalším produktem metabolismu je 1,3-propandiol, který vzniká při anaerobní fermentaci z glukózy a následně glycerolu. (HUANG 2002)

Druh	Indol	ODC	VP	Malonát	ONPG	Růst /10°C	Růst /44°C	ADM
<i>K.oxytoca</i>	+	-	+	+	+	-	+	-
<i>K.ozaenae</i>	-	-	-	-	+ / -	NZ	NZ	NZ
<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	+	+	-	+	-
<i>K.rhinoscleromatosis</i>	-	-	-	+	-	NZ	NZ	NZ

Tab. 2 – Rozdělení některých druhů *Klebsiella* dle fenotypových projevů. Vysvětlivky: ODC – ornithin dekarboxyláza, VP – Voges-Proskauerův test, ONPG – *o*-nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid, ADM – produkce kyseliny z *D*-melezitose, NZ – není známo

1.3 Genetika

Kompletní genom *K. pneumoniae* byl sekvenován v roce 2006 na Genome Sequencing Center Washingtonské university v St. Louis u kmene *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* MGH 78578. Zahrnuje jeden cirkulární chromozóm o velikosti 5,3 Mbp. Z nich tvoří 57% GC páry. Sekvenovaný organismus obsahoval ještě 5 plazmidů, označovaných jako

pKPN3, pKPN4, pKPN5, pKPN6, pKPN7 o velikosti jednotlivých plazmidů 0,18 Mbp, 0,11 Mbp, 0,089 Mbp, 0,0043 Mbp, a 0,0035 Mbp s cirkulární DNA. Genom je poměrem GC párů velmi podobný *Escherichia coli* K-12 (MC CLELLAND *et al.* 2000).

1.4 Patogenita

První zmínky se objevují v literatuře již v předminulém století a to v souvislosti s patogenezí pneumonie (FRIEDLANDER 1882). Patogenní účinky *Klebsiella pneumoniae* i přes rozvoj medicíny a především mikrobiologie přetrvávají do dnešní doby. Nejčastěji se jedná o původce onemocnění močových cest, septikémie, pneumonie, cholecystitidy a záněty měkkých tkání. Nejčastější jsou nozokomiální močové infekce (17%) především u pacientů s neuropatiemi močového měchýře, zavedeným močovým katetrem a u pacientů s diabetes mellitus (BENNETT 1995). Některé literární zdroje uvádějí, že rod *Klebsiella* způsobuje až 10% nozokomiálních infekcí u pacientů v Evropě a její výskyt je na druhém místě hned za *Escherichia coli* (PODSCHUN a ULLMANN 1998). Patogenní kmeny *Klebsiella pneumoniae* nalézáme poměrně často u chronických alkoholiků nebo dlouhodobě hospitalizovaných diabetiků. Infekce způsobené *Klebsiella pneumoniae* jsou také významným problémem především pro novorozenecká oddělení nebo jednotky intenzivní péče. *Klebsiella pneumoniae* je obvyklou příčinou novorozeneckých sepsí (GOTOFF 1992). Nárůst výskytu kmenů *Klebsiella pneumoniae* produkujících β -laktamázy s rozšířeným spektrem účinku a související rezistence k dalším skupinám běžně používaných antibiotik vede v posledních letech k nárůstu zájmu o tuto bakterii a ke studiu epidemiologických charakteristik jejího šíření.

Význam infekcí, jejichž příčinou byla *Klebsiella pneumoniae*, byl znám již dříve. Jsou známy studie, kdy 2 týdny po první identifikaci v nemocničním prostředí vzrostl počet infikovaných pacientů díky nozokomiální nákaze *Klebsiella pneumoniae* až čtyřnásobně (POLLACK 1972), přičemž nozokomiální infekce postihla i pacienty léčené širokospektrými antibiotiky.

Zajímavé je, že u léčených pacientů byl nárůst kolonizace *Klebsiella* několikanásobně vyšší než u pacientů neléčených.

Jedním z klíčových parametrů pro správnou léčbu je odpovědná antibiotická politika v nemocnicích. Nesystematické nadužívání antibiotik je jedním z důvodů výskytu multirezistentních kmenů *Klebsiella sp.* v nemocnicích.

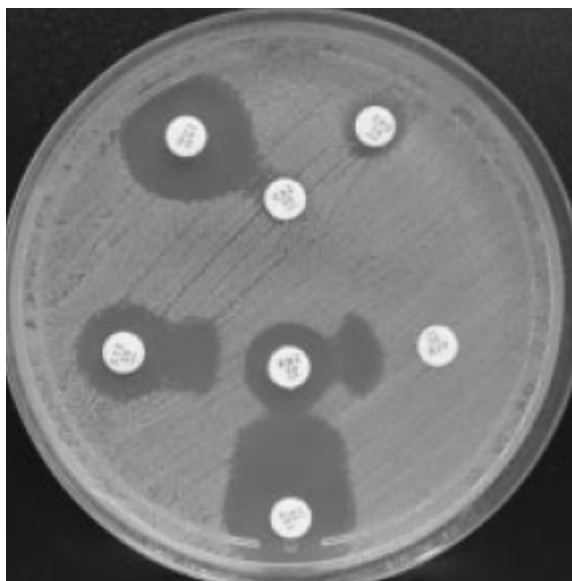
Obzvláště nebezpečné a na léčbu náročné jsou infekce způsobené multirezistentními kmeny. Již v roce 1970 byly identifikovány kmeny *Klebsiella* s rezistencí k aminoglykosidům (CHRISTENSEN 1972) a následně od roku 1982 byl opakovaně potvrzen výskyt kmenů, produkujících β -laktamázy s širokým spektrem účinku (ESBL – extended spectrum β -lactamase) (BAUERNFEIND *et al.* 1981, COOVADIA *et al.* 1992, REISH *et al.* 1993). Následkem produkce těchto enzymů jsou kmeny rezistentní k cefalosporinům všech generací. Charakteristickým znakem je pak jejich rezistence k ceftazidimu a to nejenom pro izoláty *Klebsiella pneumoniae* ale také pro *Klebsiella oxytoca*. V Evropě nejčastější byly kmeny produkující β -laktamázu SHV-5, ve Spojených státech amerických TEM-10 a TEM-12. V posledních letech jsou dominantní ESBL typu CTX-M (LIVERMORE 2007). Z aktuálních statistických dat za rok 2009 vyplývá, že v Evropě je podíl ESBL produkujících kmenů *Klebsiella pneumoniae* vůči celkovému počtu rezistentních k třetí generaci cefalosporinů od 72,7 % do 100 %, v České republice je to pak 79,9 % z celkového počtu 737 izolátů zahrnutých do statistických dat (ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE IN EUROPE, 2009). Z dlouhodobé statistiky pak vyplývá, že rezistence kmenů *Klebsiella pneumoniae* od roku 2005 do roku 2009 stoupla z 32,43 % na 52,08 %.

Geny β -laktamáz patřících do skupiny širokospektrých (ESBL) jsou nejčastěji nesené na plazmidech. Díky poměrně snadnému přenosu plazmidů mezi členy čeledi *Enterobacteriaceae* dochází ke kumulaci genů zodpovědných za rezistenci a jednotlivé kmeny se vyskytují s tzv. multirezistentními plazmidy. Ty jsou zodpovědné za rezistenci vůči většímu spektru antibiotik (např. aminoglykosidy, fluorochinolony). U rodu *Klebsiella* je výskyt těchto plazmidů nesoucích geny pro sdruženou rezistenci spojen s vysokou stabilitou plazmidů, což úzce souvisí se stále

složitější antibiotickou terapií v případě výskytu infekce kmeny, nesoucích tyto plazmidy. Riziko nákazy těmito kmeny je spojeno s délkou pobytu v nemocnici (HIBBERTROGERS *et al.* 1995).

Výskyt kmenů produkujících ESBL značně omezuje možnosti antibiotické terapie. Za jedny z léků, ke kterým jsou tyto kmeny citlivé, jsou považovány karbapenemy, především pak imipenem a meropenem. Kromě těchto antibiotik zůstávají tyto kmeny citlivé pouze k polymyxinům (kolistinu). Nicméně evoluční vývoj *Klebsiella sp.* a mezidruhový přenos genů rezistence je pravděpodobnou příčinou výskytu rezistence některých kmenů vůči imipenemu. Tyto kmeny obsahují plazmidově kódovanou karbapenemázu (např. KPC, NDM), která podstatně zužuje možnosti antibiotické léčby.

Pro běžnou diagnostiku ESBL kmenů jsou používány double-disc synergy test modifikovaný pro AmpC β -laktamázy (DRIEUX *et al.* 2008) nebo komerčně dostupný E test (např. AB Biodisk, Dalvågen, Švédsko). První metoda je založena na použití antibiotických disků kyseliny klavulanové a některého z cefalosporinů třetí a čtvrté generace (např. ceftazidim). Producent ESBL vytváří zvětšenou inhibiční zónu, obvykle ve tvaru „zátky od šampaňského“, kolem disku alespoň jednoho z antibiotik (aztreonamu, cefotaximu, ceftazidimu, cefepimu) na straně sousedící s diskem kombinace amoxicilin/klavulanová kyselina (Obr. 1) Producent inducibilní AmpC vytváří deformovanou inhibiční zónu ve tvaru písmene „D“ u aztreonamu nebo některého z cefalosporinů na straně sousedící s diskem kombinace amoxicilin/klavulanová kyselina (resp. cefoxitinu, nebo imipenemu) (Obr. 2). Produkce ESBL může být skryta, pokud kmen současně produkuje AmpC. Pro průkaz ESBL je nutno produkci AmpC inhibovat (HRABÁK, 2007). Druhá metoda je založena na porovnání rozdílu samotného účinku ceftazidimu a účinku ceftazidimu a kyseliny klavulanové současně.



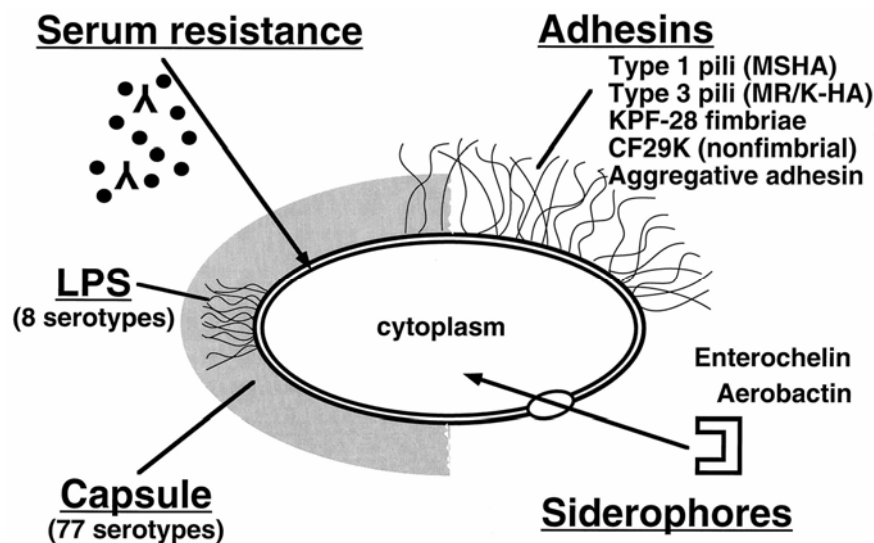
Obr. 1. Rozšíření inhibičních zón mezi disky amoxicilinu/klavulanové kyseliny a cefalosporinů (aztreonamu), které je na obrázku zřetelné. Mezi inhibičními zónami u disku cefpodoximu a kombinace cefpodoxim/klavulanová kyselina je rozdíl ≥ 5 mm. Rozložení disků (zleva do prava, ze shora dolů): cefpodoxim/klavulanová k., cefpodoxim, ceftazidim, cefotaxim, amoxicilin/klavulanová k., aztreonam, cefepim (převzato z www.betalaktamazy.cz, HRABÁK et al. 2009).



Obr. 2. Exprese β -laktamázy AmpC za přítomnosti induktoru (1-kyselina klavulanová) – kmen *K.pneumoniae* produkující enzym DHA-1. Dochází k vytvoření typické „D“ zóny v místech, kde je dostatečná koncentrace induktoru – cefalosporin (2-cefotaxim, 3-ceftazidim) je v těchto místech hydrolyzován β -laktamázou (převzato z www.betalaktamazy.cz, HRABÁK et al. 2009).

Nejvyšší výskyt při nozokomiálních infekcích lze nalézt v močovém a dýchacím ústrojí. Rozdílnost lokalizace účinku vede k domněnce, že patogenese infekcí vyvolaných *Klebsiella* sp. se bude dle lokalizace lišit. Faktory virulence u rodu *Klebsiella* sp. jsou vícečetné (Obr. 3). V minulosti byly zkoumány modely *in vitro* a *in vivo* především na myších a potkanech. Není bez zajímavosti, že výsledky zkoumání *in vitro* poskytly odlišné výsledky než výsledky získané na myších a to především při zkoumání patogenese močových infekcí. *In vivo* modely se projevily nižším patogenním účinkem a průběhy způsobených cystitid byly podstatně lehčí, než bylo očekáváno (FADER et al. 1980). Podobné modely byly použity při studiu patogenese urosepsy. Výsledky získané pomocí elektronové mikroskopie nasvědčují rozdílným mechanismům patogenese a rozdílnému chování *in vivo* a *in vitro* modelů, což ztěžuje laboratorní diagnostiku a rozhodování v navrhované léčbě (MAAYAN et al. 1985). Dlouholeté

studium faktorů virulence zahrnuje především oblasti studia patogenity kapsulárních antigenů, adhesinů, lipopolysacharidu a sideroforů.



Obr. 3. Schematická prezentace faktorů patogenity *Klebsiella pneumoniae* (PODSCHUN et al. 1998)

1.4.1 Kapsulární antigeny

Kapsulární antigeny jsou předmětem studia nejenom z pohledu patogenity, ale v minulosti byly využívány jako důležitý prvek laboratorní diagnostiky pro určení jednotlivých kmenů *Klebsiella*. Základ kapsuly tvoří komplex polysacharidů s opakujícími se polysacharidovými podjednotkami tvořenými především deriváty uronových kyselin, díky nimž získávají záporný náboj (ORSKOV 1984). Skladba jednotlivých jednotek vytváří povrch kapsuly a dává možnost rozlišit až 77 serotypů. Rozdílnost jednotlivých serotypů je příčinou rozdílné virulence. Kapsula vytváří na povrchu bakterie tlustý obal s fibrilární strukturou, jehož základní funkcí je chránit bakterii před fagocytózou, polymorfonukleárními granulocyty a baktericidními látkami (WILLIAMS et al. 1989). Jedním z významných faktorů patogenity je schopnost inhibice aktivace komplementu, především pak C3 komplementu (WILLIAMS 1990). *In vitro* pokusy prokázaly, že schopnost eliminovat fagocytózu je postavena na inhibici diferenciaci a omezení funkční kapacity

makrofágů (YOKOCHI *et al.* 1977). Je nezbytné poznamenat, že imunitní odpověď hostitele je závislá na množství konkrétního specifického kapsulárního antigenu, resp. množství mikroorganismů zodpovědných za infekci. Zobecnit virulenci na základě skladby povrchových polysacharidů však nelze. Studie rozlišující různé polysacharidové antigeny poskytují velmi různorodé výsledky. Jako jedny z mála reprodukovatelných výsledků jsou prokazatelné virulentní účinky serotypů K1 a K2 (SIMOONS-SMIT 1984). Právě tyto typy bývají nejpoužívanější ve studijních modelech zabývajících se patogenitou a virulencí, nicméně je nezbytné zmínit, že ne všechny kapsulární antigeny byly ve vztahu k jejich virulenci dostatečně prostudovány. Studie PODSCHUNA a ULLMANNA z roku 1992 a OFEKA *et al.* z roku 1993 se zabývá příčinou rozdílných stupňů virulence. Jednou z hlavních příčin je pravděpodobně rozdílný obsah manózy v kapsulárních polysacharidech. Kapsulární typy s nízkou virulencí, kam patří např. typy K7 nebo K21a obsahují repetitivní sekvence manózy- α -2/3-manózy nebo L-rhamnózy- α -2/3-L-rhamnózy. Tyto sekvence jsou dobře rozpoznávány povrchovými lektiny makrofágů, které zprostředkovávají fagocytózu nezávislou na opsoninu, známou jako lektinfagocytóza. Lektinfagocytóza je definována jako neopsoninová fagocytóza postavená na rozpoznání povrchových lektinů na jedné buňce a povrchových sacharidů na druhé buňce. Tento typ fagocytózy může být řízen některými bakteriálními povrchovými lektiny, jako jsou například fimbrie nebo lektinovými strukturami podílejícími se na tvorbě struktury receptorů. Makrofágy s manóza- α -2/3-manóza specifickými lektiny nebo receptory rozpoznávajícími manózu vstřebávají, resp. následně zabíjejí ty serotypy *Klebsiella*, které obsahují repetitivní sekvence manóza- α -2/3-manóza nebo L-rhamnóza- α -2/3-L-rhamnóza. Naopak serotypy, které mají malou frekvenci nebo naprostý deficit těchto repetitivních sekvencí nejsou makrofágy rozpoznávány a nespouštějí proces fagocytózy. Jedním z důkazů může být například virulence serotypu K2, který v kapsulovém obalu sekvenci manóza- α -2/3-manóza vůbec nemá (OFEK *et al.* 1993). Rozdílnost chemického složení povrchové kapsuly a především výskyt nebo absence manózy nebo rhamnózy může být faktorem rozhodujícím o virulenci, resp. o významnosti infekce způsobené různými serotypy *Klebsiella sp.*

Nicméně studium kapsulových antigenů a jejich význam v imunitní odpovědi hostitele má i rozporuplné výsledky. Různé studie uvádějí různé dominantní kapsulární typy, jedním z mála shodných serotypů je serotyp K2 a jeho případné rekombinanty. K2 je ve většině studií zmiňován jako příčina infekcí močových cest, pneumonií nebo bakteriemií. Za zmínku v případě serotypu K2 stojí i skutečnost, že K2 se obvykle vyskytuje v klinických izolátech a jeho výskyt v okolním prostředí je minimální. Tato skutečnost potvrzuje i interakce již zmíněné v případě lektinofagocytózy – právě absence tohoto serotypu v běžném prostředí neumožňuje imunitnímu systému hostitele dostatečnou imunitní přípravu a navazující odpověď. Ani tato skutečnost však není jednoznačná a například ve studii KABHY *et al.* z roku 1997 je uváděno několik mechanismů, které mají vznik a průběh infekce vliv. V případě pneumonií hrají významnou roli alveolární makrofágy s takzvaným SP-A proteinem podílejícím se na fagocytóze spojené s kapsulárními typy obsahujícími repetitivní sekvence manózy (K21a). První mechanismus zahrnuje aktivaci makrofágů SP-A proteinem, druhý pak vyžaduje nezbytnou opsonizaci mikroorganismu SP-A před samotnou fagocytózou.

1.4.2 Fimbrie (pili)

Nedílnou součástí infekce mikroorganismem je vždy prvotní kontakt - adheze, který v případě *Klebsiella* sp. zajišťují fimbrie (pili). Úkolem fimbrií je zprostředkovat kontakt s hostitelským, obvykle mukózním, povrchem a udržet mikroorganismus v kontaktu s hostitelskou buňkou. Fimbrie jsou neflagelární, filamentózní struktury na povrchu bakterie. Struktury jsou obvykle dlouhé do 10 μm a mají průměr od 1 do 11 nm. Obsahují polymerní globulární proteinové podjednotky – piliny s molekulovou hmotností od 15 do 26 kDa (OFEK a DOYLE 1994). Schopnost fimbrií udržovat kontakt bakterie s buňkami hostitele je obvykle demonstrována na erythrocytech. Fimbrie jsou schopny s povrchem erythrocytů aglutinovat a na základě této aglutinační reakce spolu s D-manózou lze rozdělit bakterie do dvou skupin – manóza-senzitivních (MSHA) a manóza-rezistentních (MRHA). Oba tyto typy jsou charakteristické pro rod *Klebsiella*.

1.5 Charakterizace a typizace *Klebsiella pneumoniae*

Identifikace izolátu jako *Klebsiella* sp., případně jeho druhová identifikace vychází z obvykle užívaných metod v rutinních laboratořích - běžnou metodou je kombinace biochemických testů a kultivačních postupů, používán je také komerčně dostupný API systém, který je založen na vyhodnocení reakcí se substráty nabízenými určované bakterii (např. výrobce bioMérieux, SA, Marcy l'Etoile, France). Nicméně délka kultivace v kombinaci s biochemickými testy není příliš vhodnou metodou s ohledem na dobu odezvy pro získání výsledku ve vztahu k závažnosti epidemiologického nálezu. V minulosti běžnou metodou byla serotypizace, která využívá rozličných forem kapsulových antigenů (ORSKOV 1984). Rod *Klebsiella* má obvykle dobře vyvinutý polysacharidový obal, který dává koloniím charakteristický mukózní vzhled a je jednou z typických vlastností pro určení druhu při kultivačních vyšetřeních. Jak již bylo zmíněno, celkem bylo popsáno 82 kapsulových antigenů, z nichž 77 bylo použito jako základ pro rozpoznávací schéma kapsulových antigenů. Nevýhodou serotypizace bylo velké množství zkřížených reakcí, které se mezi 77 typy antigenů vyskytují. Je nutné poznamenat, že serotypizace je náročná na čas a prostředky (je nutné mít k dispozici velké množství sér) a její interpretace je poněkud subjektivní, protože slabé reakce s antigeny je někdy obtížné interpretovat. Nevýhodou je také komerční nedostupnost některých anti-kapsulových sér, takže dourčení pak může probíhat až ve specializovaných laboratořích. Objektivně je nutné poznamenat, že biochemické testy, serotypizace, bakteriocinová typizace nebo fágová typizace nejsou samostatně dostatečně výtěžnou metodou a při typizaci musela být používána obvykle kombinace zmíněných metod.

Fágová typizace byla poprvé použita již v roce 1960. Metoda je poměrně snadná, má poměrně dobrou reprodukovatelnost, nicméně typizace je spolehlivá od 19% do 67% v závislosti na určovaném kmene. Metoda se i přes snadné provedení příliš nerozšířila a je používána obvykle v kombinaci se serologickým testováním (COOVADIA 1992).

Jednou z alternativ pro určení kmene je bakteriocinová typizace. Je alternativou, která nezávisí na kapsulových antigenech a je vhodným

doplněním pro typizaci s pomocí kapsulových antigenů (HART 1993). Bakteriociny jsou baktericidní substance, obvykle proteiny, které bakterie produkují za účelem inhibice růstu ostatních bakterií, obvykle členů vlastního rodu. Izoláty je možné charakterizovat díky jejich schopnosti inhibovat specifické kmeny nebo díky jejich sensitivitě k bakteriocinům jiných kmenů. Rod *Klebsiella* je znám svojí nepříliš vysokou frekvencí produkce bakteriocinů a bakteriocinová typizace je jednou z používaných metod. Nejpoužívanější byla metoda „scrape-and-point“, která nevyužívá na rozdíl od jiných již hotové bakteriociny, ale bakteriociny jsou syntetizovány chemicky na agaru těsně před naočkováním mikroorganismem. K očkování se používá vícebodový inokulátor.

Moderními a v poslední době stále více využívanými metodami jsou molekulárně biologické metody. Mezi nejčastěji používané patří ribotypizace, multilokusová sekvenční typizace (MLST) nebo pulzní gelová elektroforéza fragmentů (PFGE) DNA po štěpení vhodnou endonukleázou. Ribotypizace zahrnuje určení DNA fragmentů, které obsahují geny kódující 16S a 23S podjednotky ribozomální RNA. Databázovým porovnáním lze určit kmen zkoumaného mikroorganismu. Obdobně lze s využitím databází typizovat mikroorganismy metodou MLST, která vychází z přítomnosti tzv. housekeeping genů (obvykle 7 genů). Pro typizaci se používá sekvenování fragmentů DNA o délce do 500 bp a rozdílnost v sekvencích tzv. housekeeping genů dává možnost rozlišit jednotlivé bakteriální klony (URWIN 2003). Pulzní gelová elektroforéza je určena především pro velké fragmenty DNA. Běžná elektroforéza je schopna poměrně dobře rozlišit fragmenty o velikosti do cca 15-20 kbp, díky pulzní gelové elektroforéze je možné rozlišit fragmenty o velikosti až 2 Mbp. Procedura je postavena na principu běžné elektroforézy, nicméně s tím, že elektrody jsou rozloženy pod úhlem 120° a elektrické pole je do gelu vpouštěno v definovaných časových intervalech. Opakovaná změna orientace elektrického pole je schopna zajistit velmi dobré rozlišení velkých fragmentů DNA v agarózovém gelu (SCHWARZ 1984).

1.6 Antibiotická rezistence

Antibiotickou rezistenci lze obecně rozdělit na dvě skupiny. Do první skupiny, tzv. přirozené (primární) rezistence, patří rezistence u organismů, které ve své vlastní struktuře nemají cílová místa, na která by antibiotikum mohlo působit. Druhý typ rezistence bývá obvykle nazýván jako získaná (sekundární) a je výsledkem evoluce bakteriálního genomu a selekčního tlaku prostředí. Ten je způsoben nejenom výskytem antibiotika v prostředí obecně, ale v případě patogenních organismů účinkem k léčbě vybraných antibiotik a obvykle jejich nadužíváním. Získaná rezistence k antibiotikům vzniká obecně dvěma způsoby – prvním jsou mutace, druhým rozšíření genomu o nové, získané geny, které s sebou nesou informaci pro zajištění rezistence vůči antibiotiku. Obecně pak lze k rezistenci dodat, že je přirozeným biologickým fenoménem a v prostředí lze očekávat vznik rezistence vůči jakémukoliv, byť nově zaváděnému antibiotiku. Šíření rezistence se odehrává nejenom na úrovni druhu, ale i mezidruhově. Vznik rezistence je významně ovlivněn způsobem užívání antibiotika (European Surveillance of Antimicrobial Consumption Project, SINGER *et al.* 2003)

1.6.1 Mutace

Antibiotická rezistence vzniklá mutacemi se v současné době rozlišuje na dva typy. Tím prvním je mutace genů, jejichž produkty jsou cílovými místy antibiotik. Výsledkem je, že se antibiotikum nenaváže. Patří sem například rezistence *Mycobacterium tuberculosis* vůči streptomycinu (SANDER *et al.* 1997, HALLING *et al.* 2006).

Za zmínku určitě stojí i ribosomální mutace ať už v 16S podjednotce například u *Escherichia coli* (STASIO *et al.* 1989) nebo 23S podjednotce u *Streptococcus pneumoniae* nebo *Chlamydia trachomatis* (CANU *et al.* 2002, MISYURINA *et al.* 2004) nebo mutace gyrázy, čímž u některých mikroorganismů vzniká rezistence vůči fluorochinolonům (LUZZARO 2008, SMITH *et al.* 2010)

Dalším typem jsou mutace genů, které kódují enzymy podílející se na inaktivaci účinku antibiotika. V důsledku tohoto typu mutace dochází ke změně substrátové specifity, která je cílená na strukturu antibiotika.

Mikroorganismy jsou schopny díky těmto mutacím modifikovat aktivní místa enzymů a přizpůsobovat expresi genů kódujících tyto enzymy aktuálně působícímu antibiotiku. Z pohledu rezistence je důležité, že se změna odehrává na úrovni genetické informace, nikoliv změnou sekundární nebo terciární struktury enzymu. Tím je tato informace dostatečně uložena a připravena pro další odpověď vůči novému antibiotiku nebo pro přenos do jiného mikroorganismu (HEINRICHFREISSE *et al.* 2008, RAMDANI-BOUGUESSA *et al.* 2011, RAYAMAJHI *et al.* 2011).

Dnes nejméně prostudovanou a pro charakterizaci antibiotické rezistence nejnáročnější oblastí studia jsou mutace promotorů, způsobující hyperprodukcí inaktivujícího enzymu, exfluxních pump podílejících se na exportu antibiotika z buňky nebo mutace dalších složek buněčné stěny. Hyperprodukce inaktivujícího enzymu jsou oblastí, kde je nezbytné zkoumat celé regulační dráhy, včetně jejich negativních i pozitivních regulátorů a za podmínek, které jsou pro konkrétní mikroorganismus v konkrétním prostředí obvyklé. Jednou z takovýchto regulačních drah je regulační dráha exprese DHA-1 β -laktamázy u kmenů *Klebsiella pneumoniae*, což je získaná cefalosporináza typu AmpC, kódovaná genem *bla*_{DHA-1} (REISBIG *et al.* 2003). Právě studium regulace této dráhy je mimo jiné předmětem méj diplomové práce.

1.6.2 Rozšíření genomu

Genetické vybavení zajišťující rezistenci vůči antibiotiku může buňka získat i jinými způsoby. Přenos takovéto informace se může odehrávat přenosem na plazmidech, konjugativních transpozonech nebo bakteriofágy zajišťovanou transdukcí. Je samozřejmé, že takovýto přenos genetické informace vyžaduje i připravenost recipientní buňky (HRABÁK 2010).

Inserční sekvence

Jednou z možností přenosu je transpozice inserčních sekvencí krátkých úseků DNA s velikostí do 2,5 kbp. Funkce těchto inserčních sekvencí je omezena pouze na zajištění jejich mobility (MAHILLON 1998). Tyto sekvence jsou díky svým vlastnostem schopny způsobovat inserční mutace, rekombinace, někdy mobilizují geny virulence nebo rezistence.

Základní strukturou je gen transposázy, která je ohraničená tzv. invertovanými repetice, z nichž každá má dvě domény. První doména je krátký element 2-3 bp, který transposáza rozpoznává jako štěpné místo a druhá doména slouží jako vazebné místo. K transpozici inserční sekvence dochází přímou vazbou transposázy na invertované repetice s následným rozpojením vazby a přenesením na cílové místo recipientní molekuly DNA. Inserční sekvence jsou klasifikovány podle své struktury. V současnosti je u prokaryot popsáno již kolem 25 různých rodin, z nichž každá čítá i několik set různých inserčních sekvencí (FLUIT *et al.* 2004, SOHN *et al.* 2009).

Inserční sekvence se mohou podílet i na mobilizaci genů. Pokud se na molekule DNA vyskytují sekvence podobné invertovaným repeticím, mohou být tato místa transposázou nesprávně rozpoznána a místo přenosu samotné inserční sekvence dojde k transportu celého elementu. Podobná situace může nastat s úsekem, který ohraničují dvě stejné inserční sekvence. Takováto struktura se nazývá kompozitní transpozon (POIREL *et al.* 2005, GARZA-RAMOS *et al.* 2009). Mezi nejčastější inserční sekvence spjaté s mobilizací genů rezistence patří *ISEcp1* a *ISCR*. *ISEcp1* je zodpovědná za mobilizaci některých β -laktamáz, především skupiny CTX-M, ale jsou nalézány také u genů způsobujících rezistenci k fluorochinolonům - *qnr* (LARTIGUE *et al.* 2006). Elementy *ISCR* mobilizují celou řadu genů rezistence. Ze skupiny β -laktamáz patří do této skupiny DHA-1, CMY, OXA-1, OXA-4 nebo geny ze skupiny *dfr* zodpovědné za rezistenci k trimetoprimu (TOLEMAN *et al.* 2006).

Inserční sekvence se podílejí také na zvýšení exprese genů rezistence. Důvodem je především to, že invertované repetice tvoří silné promotory. Pokud se takovýto promotor nachází v oblasti genu transposázy dochází ke zvýšené expresi genů nacházejících se za inserční sekvencí. Jedním z příkladů je inserční sekvence *ISEcp1* u enterobakterií. V případě genů ESBL typu CTX-M (*bla*_{CTX-M}) není tedy důsledkem pouze mobilizace. U bakteriálních izolátů s genem *bla*_{CTX-M} v jejímž 5' okolí se nenachází inserční sekvence jsou tyto geny exprimovány v zanedbatelné kvantitě a nezpůsobují klinicky významnou rezistenci k cefalosporinům. Pokud však dojde k transpozici *ISEcp1* před gen *bla*_{CTX-M}, dojde ke zvýšení exprese

významným způsobem a k projevům rezistence k cefalosporinům (HRABÁK *et al.* 2010).

Transpozony

Transpozony jsou mobilní genetické elementy, které jsou přenášeny v rámci jedné, případně více molekul DNA (mezi chromozomem a plazmidem) v intracelulárním prostředí (ROBERTS *et al.* 2008). Mezi transpozony patří ještě konjugativní transpozony, které jsou vybaveny systémem pro konjugativní přenos. Rozdíl mezi transpozony a inserčními sekvencemi spočívá v tom, že kódují další geny, které přímo nesouvisí s jejich funkcí. Transpozony obecně obsahují tři funkční jednotky – gen transposázy, která stejně jako u inserčních sekvencí umožňuje transpozici a invertované sekvence na obou koncích. Zvláštní skupinou transpozonů jsou kompozitní transpozony, které jsou ohraničené dvěma inserčními sekvencemi v které mohou být v opačné orientaci nebo jejichž vnitřní repetice jsou neefektivní. Funkční jednotky se pak liší tím, že se na koncích nachází vnější a vnitřní konec, které jsou vůči sobě opačně orientované. Mechanismus transpozice transpozonu zahrnuje několik kroků, jejichž výsledkem je vystřížení z molekuly DNA. Získaná cirkulární molekula je pak přenesena na cílové místo recipientní molekuly, čímž dochází k přenosu genetické informace, obsažené v transpozonu (HRABÁK *et al.* 2010).

Transpozony jsou využívány při mobilizaci integronů. Již zmíněný gen ESBL *bla*_{CTX-M-9} byl nalezen na komplexním integronu třídy 1 a jeho mobilizaci zajišťuje pravděpodobně transpozon Tn402 (NOVAIS *et al.* 2006). Podobným příkladem je kompozitní transpozon Tn21, který sdružuje integron třídy 1 a dále geny zodpovědné za rezistenci ke rtuti a jejím sloučeninám (LIEBERT *et al.* 1999). U gram pozitivních bakterií se transpozony podílejí na přenosu *van* genů, které kódují produkty způsobující rezistenci k vankomycinu a aminoglykosidům u enterokoků. Patří sem kompozitní transpozony ohraničené inserčními sekvencemi IS1216V a IS256. Transpozon Tn1546 byl rovněž nalezen u kmenů meticilin rezistentních *Staphylococcus aureus* současně rezistentních k vankomycinu (VRSA) v USA (CLARK *et al.* 2005).

Integrony

Integron je dvoukomponentní systém, který se obvykle nachází v molekulách DNA – plazmidech, chromozomech a někdy na transpozonech. První komponenta v sobě zahrnuje gen kódující místně specifickou rekombinázu se specifickou sekvencí pro rekombinaci, druhá komponenta sestává z úseků DNA, které se nazývají genové kazety a které mohou být vloženy nebo posunuty (KOVALEVSKAYA 2002). V literatuře je místně specifická rekombináza nazývána s ohledem na její funkci a lokalizaci integráza. Obecně pak integron sdružuje otevřené čtecí rámce – genové kazety a vkládá je do jiných genů, čímž jim poskytuje silné promotory a umožňuje jejich expresi (CARATOLLI 2001). Pro řádné nasednutí promotoru je nezbytnou součástí integronu vazebné místo. Integrony jsou prezentovány jako samostatně nemobilní elementy, nicméně jsou-li součástí transpozonů, pak je jejich přenos zajištěn mechanismem přenosu transpozonu (NAAS *et al.* 2001). Integron může obsahovat velký počet genových kazet. Takové integrony lokalizované na chromozomu některých bakterií se nazývají superintegrony. Doposud bylo popsáno několik superintegronů, z nichž asi nejznámější je superintegron obsažený ve *Vibrio cholerae* na chromosomu 2 (FLUIT *et al.* 2004). Není bez zajímavosti, že některé sekvence, jejichž funkce není známa, jsou v některých integronech vysoce konzervované a jsou přenášeny v rámci superintegronu. Ve vztahu k rezistencím jsou integrony zajímavé tím, že sdružují geny pro rezistenci k antibiotikům (FLUIT *et al.* 2004). Významnou složkou integronů sdružujících geny pro rezistenci jsou již zmíněné genové kazety. Jejich součástí je čtecí rámeček a sekvence obvykle označovaná jako attC o velikosti od 57 do 141 bp. Genové kazety jsou mobilními elementy cirkulární DNA, které se mohou volně vyskytovat v cytoplazmě, nicméně nejsou schopny autonomní replikace. Integraci těchto volných genových kazet zajišťuje do integronových struktur zajišťuje již zmíněná integráza. Mechanismus integrace není postaven na přímém rozštěpení vlákna DNA jako je tomu u endonukleáz, ale je velmi podobný mechanismu rozštěpení

prováděným topoizomerázou. Integrace genové kazety je tedy dokončena až po replikaci celé molekuly DNA (HRABÁK *et al.* 2010).

Mobilizace integronů nebyla dosud zcela popsána. Jedná se pravděpodobně o multifaktoriální mechanismus s více regulačními drahami a s ohledem na velikost genetické informace obsažené v integronech je jejich studium velmi náročné. V současné době je známo 5 tříd integronů, které se liší především strukturou integrázy a strukturou 3' konzervované sekvence. Jednotlivé třídy integronů jsou pak charakteristické obsaženými genovými kazetami, nicméně je nutné poznamenat, že na různých integronech byly prokázány stejné genové kazety, což nasvědčuje vzájemné výměně mezi jednotlivými integrony.

Původ integronů není zcela znám. Nízká homologie integráz nasvědčuje výskytu více než 60 let, tj. déle, než jsou používána antibiotika. Zajímavou teorii původu integronů přinesl například MAZEL v roce 2006, nicméně v oblasti původu integronů nepanuje přílišná shoda. Jako součásti chromozomů jsou superintegrony pravděpodobně po dobu evoluce bakterií. Jak uvádí FLUIT (2004) lze se domnívat, že původ genových kazet souvisejících s antibiotickou rezistencí je v superintegronech. Mezi nejznámější geny vyskytující se na superintegronech i integronech kódujících rezistenci k antibiotikům patří *gmr*, který kóduje proteiny zajišťující rezistenci k fluorochinolonům (HRABÁK *et al.* 2010).

Výskyt integronů byl již mnohokrát popsán u gramnegativních bakterií, nicméně jejich význam narůstá s šířením metalo- β -laktamáz a dalších karbapenemáz, jenž jsou většinou kódovány na integronech. K integronům se váží i β -laktamázy GES, IMP, VIM, OXA a jiné (FLUIT *et al.* 2004). Samotná exprese na integronech s více kazetami je pak závislá od promotoru a pořadí jednotlivých kazet. Obvykle je exprese nejvyšší u prvních genů za promotorovou oblastí, nicméně někdy jsou tyto exprese inhibovány a v expresních profilech se objevují jako podstatně více exprimované geny na vzdálenějších genových kazetách (FONSECA *et al.* 2011). Nehledě na expresní profily je nezbytné zmínit, že pořadí genových kazet zahrnutých v integronu podstatně mikroorganismu zjednodušuje produkci molekul podílejících se na rezistenci, což v důsledku znamená

sduženou selekci rezistence k všem antibiotikům, jejichž genové kazety jsou zahrnuty v integronu.

Pro moji práci je typickým a vhodným příkladem komplexní integron třídy 1 vyskytující se u kmenů *K. pneumoniae*, které produkují AmpC β -laktamázu DHA-1. Ve studii VERDET *et al.* (2006) bylo sledováno 11 izolátů *Klebsiella pneumoniae*, u nichž byly nalezeny a sledovány 4 typy integronů se 2 – 4 genovými kazetami obsahujícími různé typy genů vztahujících se k rezistenci. Podrobná analýza oblasti *bla*_{DHA-1} ukázala, že některé oblasti zahrnují sekvence velmi podobné některým operonům ze zcela jiných bakterií (*sap* ze *Salmonella enterica* nebo *psp* obvykle se vyskytující v *Enterobacteriaceae*). Navíc v některých integronech se objevily inserty pravděpodobně kódující aminoglykosidovou acetyltransferázu a rifampinovou ADP-ribosyltransferázu. Je velmi pravděpodobné, že bakterie obsahující takovýto integron je schopna být rezistentní k širokému spektru antibiotik. Takovéto izoláty se objevují i v České republice (HRABÁK *et al.* nepublikovaná data) a jsou mimo jiné předmětem studia méj diplomové práce.

Plazmidy

Plazmid je obvykle malá kruhová dvouvláknová molekula DNA schopná autoreplikace. Geny obsažené na plazmidech nejsou pro mikroorganismus esenciální, nicméně jejich význam, zvláště pak ve vztahu k rezistenci vůči antibiotiku nelze podcenit. Velikost plazmidů se obvykle pohybuje od 1 do 1000 kbp a jejich počet v buňce dosahuje rozpětí od 0 do několika set plazmidů na jednu buňku. Typově lze plazmidy rozdělit na F-plazmidy kódující geny pro konjugaci, R-plazmidy kódující geny pro rezistenci, Col-plazmidy kódující bakteriociny nebo degradativní plazmidy kódující geny pro degradaci některých chemických sloučenin, například toluenu. Některé literární zdroje uvádějí ještě další skupiny plazmidů, obvykle pak vztažené k funkci genů obsažených na plazmidu (BARON *et al.* 1996).

Klíčovým prvkem pro zachování plazmidu v bakteriální buňce je vzájemná inkompatibilita plazmidů. Dle NOVICKA (1987) lze rozdělit inkompatibilitu na symetrickou nebo vektorovou. U symetrické se při dělení ztrácí každý různý plazmid ve stejném poměru k jiným plazmidům, u vektorové se jeden plazmid ztrácí s podstatně vyšší pravděpodobností než

jiné přítomné plazmidy. V jedné buňce se mohou vyskytovat oba mechanismy inkompatibility. Symetrická je pravděpodobně způsobena sdílením esenciálních replikačních molekul a souvisejících mechanismů v rámci celkového plazmidového čísla. Vektorová je pravděpodobně ovlivněna interferencemi mezi fragmenty klonovaného plazmidu obsahujícího prvky pro replikační kontrolu nebo podpůrné systémy nebo prvky zajišťujícími kontrolu replikace. Někdy je replikace vybraného plazmidu zcela blokována. Je nezbytné poznamenat, že plazmidová inkompatibilita je vysoce pravděpodobnostní záležitost, která je ovlivněna mnoha faktory.

S ohledem na vzájemnou inkompatibilitu byly definovány čtyři základní skupiny plazmidů, označované jako IncF, IncP, Ti, IncI, z nichž každá má ještě vnitřní rozdělení.

Přenos plazmidů a s nimi i nezbytné genetické informace je prováděn horizontálně a je nazýván konjugací. Jak uvádí HRABÁK *et al.* (2010), je konjugace nejdůležitějším způsobem výměny genetické informace u bakterií a v určitém ohledu je srovnatelná se sexuálním životem u eukaryot. Co do objemu výměny genetické informace je konjugace asi nejvýznamnějším mechanismem, zajišťujícím tuto výměnu. Dnes jsou známy transfery z konjugativních plazmidů bakterií (*Agrobacterium*, *Rhizobium*) do genomů eukaryotních buněk za účelem přenosu genetické informace obsažené na plazmidu (THOMSON *et al.* 2011).

Konjugativním plazmidem se rozumí plazmid, který kóduje kompletní genetickou informaci nezbytnou pro jeho transfer z jedné buňky do druhé. Některé plazmidy, které toto vybavení nemají a využívají pomoci konjugativních plazmidů, se nazývají mobilizovatelné. Samotný konjugativní plazmid mívá velikost i více než 30 kbp, mobilizovatelné plazmidy mají velikost obvykle menší než 15 kbp, nicméně na rozdíl od konjugativních se vyskytují ve velkém počtu kopií. Pro samotný transfer do recipientní buňky je nezbytné, aby plazmid obsahoval MOB oblast potřebnou k mobilizaci, konjugativní plazmidy mají navíc genetickou informaci pro T4SS protein, který umožňuje vytvoření spojovacího kanálu mezi donorovou a recipientní buňkou (GARCILLÁN-BARCIA *et al.* 2009).

Typizace plazmidů s pomocí PCR replikonového typování je relativně mladá metoda a epidemiologická data o typech plazmidů nesoucích geny

rezistence jsou dosud neúplná. Přesto se zdá, že geny některých širokospektrých β -laktamáz nebo některých ostatních genů rezistence jsou kódovány na plazmidech stejných typů (HRABÁK *et al.* 2010). Například *bla*_{CMY} na plazmidech IncA/C, IncI1, IncN, *bla*_{VIM} na plazmidech IncA/C, IncN. Komplexní analýza kmenů *Escherichia coli* produkujících ESBL_A typu CTX-M-15 izolovaných v různých zemích světa prokázala plazmidy IncFII, někdy pak s replikony FIA a FIB. Na těchto plazmidech byly nesené geny *bla*_{OXA-1} a *aac(6')-Ib-cr* (COQUE *et al.* 2008).

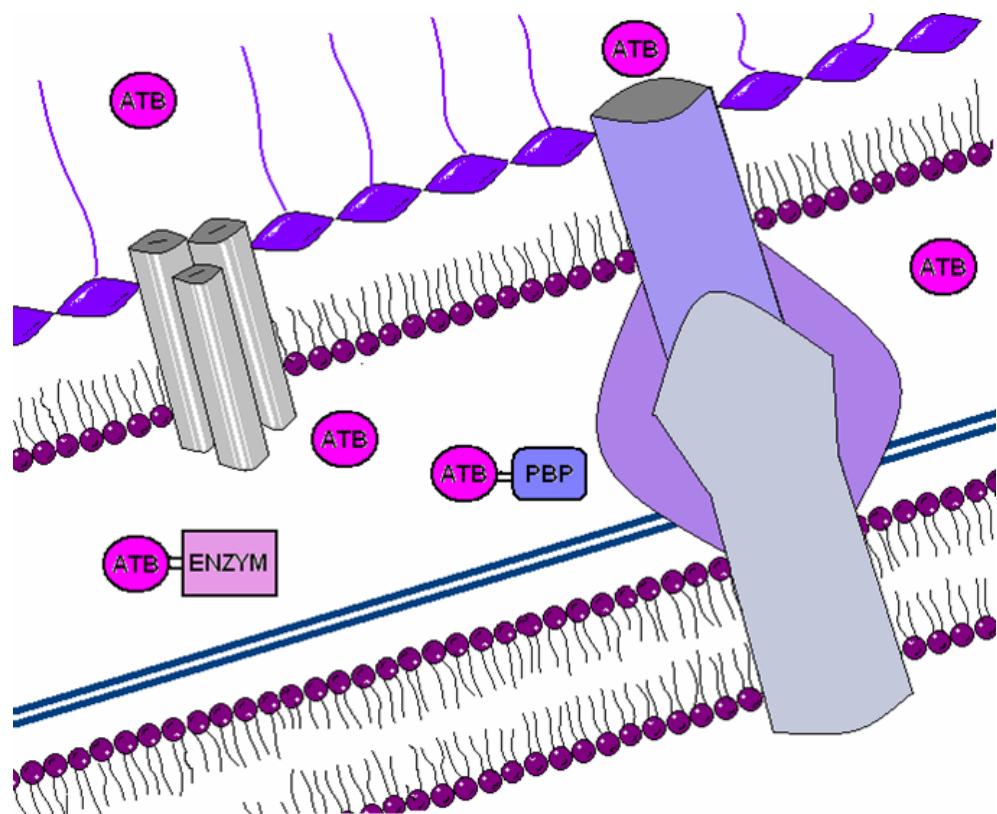
1.6.3 Membránové elementy podílející se na rezistenci

Mezi další oblasti studia rezistence patří například chování mikroorganismů vůči různým typům antibiotik. Základní rozdělení antibiotika na hydrofobní a hydrofilní je důležitou diferencí pro chování u gramnegativních bakterií a na syntéze porinů, obsažených v membráně a zajišťujících vstup do buňky. Právě množství porinů, regulované na úrovni exprese, může být klíčovou odpovědí buňky na účinek antibiotika. Zajímavým mechanismem jsou i efluxní pumpy, které aktivně z buňky vypuzují antibiotikum. Efluxní pumpy a poriny jsou pro *Enterobacteriaceae* typickou kombinací pro zajištění odpovídající membránové permeability. Kontrola efluxních pump a exprese porinových genů je zajištěna na několika úrovních. První z nich je pozitivní regulace obecnými nebo specifickými transkripčními faktory, které koordinují expresi na více genech, dále je to negativní regulace represorů na genech kódujících porinové nebo efluxové komponenty a odpověď na chemické faktory, které spouštějí jeden nebo více komplexů provázaných regulačních kaskád (DAVIN-REGLI *et al.* 2008, TAKATSUKA *et al.* 2010).

1.7 Poriny

Buněčné membrány jsou základem adaptivní bariéry, která chrání prokaryotický genom před jeho poškozením. Na tomto nepropustném povrchu vytvářejí buňky hydrofilní kanály tvořené proteinovými strukturami, jejichž úkolem je zajistit prostup membránou pro definovanou skupinu molekul, obvykle živin (Obr. 4). Takovým typem kanálu jsou poriny. Nejčastěji se poriny vyskytují u gramnegativních tyčků, což je dáno především skladbou membrán na jejich povrchu, která se od grampozitivních výrazně liší. Významnou roli hraje periplasmový prostor, který u gramnegativních bakterií může tvořit až 40 % objemu buňky. V periplasmě probíhá velké množství biochemických reakcí vedoucích k získávání živin, syntéze peptidoglykanu, transportu elektronů a zneškodňování toxických sloučenin. Právě v periplasmě se nacházejí enzymy podílející se na rezistenci k antibiotikům (HOLST *et al.* 2005, KLEIN *et al.* 2005).

Poprvé byly poriny popsány v roce 1976 (NAKAE). První identifikované poriny byly OmpC a OmpF u *Escherichia coli*. Později byly objeveny i u grampozitivních bakterií a k dnešnímu dni jsou nalézány napříč druhy jak z prokaryot, tak z eukaryot. V závislosti na jejich fyzikálněchemických vlastnostech a okolí se poriny vyskytují nejčastěji jako trimerní nebo monomerní struktury. OmpA u *Escherichia coli* nebo OprF u *Pseudomonas aeruginosa* jsou typickými monomerními poriny, OmpF u *E. coli* je příkladem trimerního proteinu. Trimerní poriny jsou tvořeny třemi monomery, které jsou většinou spojeny četnými povrchovými smyčkami nebo podjednotkami (WEISS *et al.* 1992). Disociace těchto monomerů je možná pouze za velmi kritických podmínek – za vysokých teplot nebo při účinku silných detergentů.



Obr. 4. Schematické znázornění některých kanálů zajišťujících vstup bakteriálními membránami. Vlevo trimerní porin, vpravo efluxová pumpa. (kresbu poskytl E. Chudáčková)

Proteiny tvořící poriny jsou v závislosti na druhu a podmínkách exprimovány v poměrně vysokém množství, počet monomerů připadajících na jednu buňku se pohybuje od 10^4 - 10^6 kopií. Regulace syntézy porinů je někdy závislá na přítomnosti odpovídající molekuly vyskytující se v prostředí – maltóza indukuje expresi maltoporinu LamB, sacharóza nebo fruktóza podobně reguluje porin ScrY. Hladovění na fosfáty umožňuje expresi PhoE. Úroveň exprese osmoporinu OmpC u *Escherichia coli* je řízena *ompB* regulonem, složeného z *envZ* a *ompR* genů – jedná se o klasický dvoukomponentový regulační systém s histidinkinázovou aktivitou. Exprese osmoporinu je pozitivně regulována vysokým pH, vysokou iontovou silou a vysokou teplotou. Naopak exprese OmpF u *Escherichia coli* a OmpK35 u *Klebsiella pneumoniae* je za těchto podmínek regulována negativně. (PRATT *et al.* 1996). Podobná regulace může nastat při odpovědi buňky

na výskyt antibiotika, těžkých kovů, detergentů – jejich výskyt bývá iniciačním krokem pro regulaci porinů řízených regulační kaskádou kódovanou *mar* nebo *sox* operony.

Kanál, který tvoří porin, je více než jen regulačním prvkem pro prostup malých hydrofilních molekul. Důležitým prvkem je vnitřní uzavřený region, jakési „očko“, které je vázáno ke kanálu záporně nabitými karboxylovými skupinami a obklopené kladně nabitými rezidui argininu a lyzinu, které jsou k němu nasměrovány z β -listu tvořícího stěnu porinu. Tato specifická struktura vytváří elektrostatické pole v lumenu, čímž je regulována difúze skrze konstrikční oblast uvnitř porinu. Funkčnost tohoto systému nebyla doposud zcela dobře zdokumentována (DELCOUR 1997). Primární struktura proteinů tvořících poriny je klíčovým prvkem pro zachování jejich funkčnosti. Při studiích mutací, které se zabývaly změnou některých aminokyselin v primární struktuře bylo zjištěno, že i bodové mutace způsobující záměnu jedné aminokyseliny za jinou mohou významně ovlivnit funkčnost porinu (DELCOUR 2009).

Struktura porinů je obvykle tvořena hydrofobními doménami, které jsou zapojeny do okolní membrány a obsahují mnoho β -barelových struktur. Zkoumané proteiny vnější membrány, jejichž struktura je již známa, byly tvořeny 16 řetězci β -barelů u nespecifických porinů a 18 řetězci u porinů zajišťujících transport cukrů. Rozmístění hydrofobních a hydrofilních skupin je vždy specifické ve vztahu k druhu mikroorganismu, ve kterém se protein vyskytuje. Typickou strukturou je pak kruh aromatických aminokyselin lokalizovaných blízko spojení monomerních jednotek uprostřed lipidové dvojvrstvy (KOEJNIK *et al.* 2000). Krystalografické studie prokazují, že β -listy jsou orientovány kolmo k sobě, čímž se vytváří struktura tzv. β -cylindru – ten je ve svém nejužším místě klíčovým regulačním bodem pro průchod porinem. Je důležité zmínit, že terciární struktura proteinů tvořících poriny je napříč druhy vysoce konzervativní a nasvědčuje efektivní a stabilní funkci porinů jako součásti vnější membrány. Případná variabilita struktury je způsobena rozdíly v délce a orientaci smyček vystavených na povrch membrány, rozdíly v délce a organizaci β -listů, rozdíly v interakcích β -struktur s lipopolysacharidy s ohledem na různé sterické bránění a vznikajícími interakcemi mezi podjednotkami (ACHOUAK *et al.* 2001).

Poriny hrají důležitou roli v rezistenci vůči antibiotikům. U gramnegativních bakterií způsobujících četné infekce v nemocnicích byla zdokumentována široká flexibilita v expresi porinů ve vztahu k jejich množství i aktivitě. U *Neisseria meningitidis*, *Klebsiella pneumoniae* nebo *Enterobacter aerogenes* byly zdokumentovány výskyty izolátů s variabilními primárními strukturami porinů a to především v oblastech domén zajišťujících transport porinem. Tato variabilita ukazuje na různé fenotypové projevy ve vztahu k antibiotické rezistenci. Tím lze alespoň částečně vysvětlit přetrvávání infekčních agens i přes obvyklou antibiotickou léčbu. Variabilita v pozici otvoru porinu a fenotypové chování je vždy spojena se záměnou aminokyseliny, obvykle s jiným nábojem. Změna náboje se zobrazí uvnitř lumenu a narušuje normální difúzi antibiotika. Při změně velikosti otvoru a při variabilitě exprese porinů může docházet k velmi rozdílnému chování při reakci na antibiotikum, resp. při šíření infekce. Nozokomiální infekce především u enterobakterií se šíří obvykle díky produkci β -laktamáz s rozšířeným spektrem. Produkce β -laktamáz těmito mikroorganismy inaktivuje většinu β -laktamových antibiotik a jejich rezistence k jiným antibiotikům, například aminoglykosidům nebo chinolonům, významně omezuje výběr účinných antibiotik. Při výskytu některých antibiotik bakteriální patogeny vypínají nebo snižují expresi porinů. Toto chování bylo již několikrát potvrzeno (PAGÉS *et al.* 2008, BOLLA *et al.* 2011). Ztráta porinů u ESBL, resp. AmpC produkujících *Klebsiella pneumoniae* způsobuje rezistenci k cefoxitinu, narůstá rezistence k cefalosporinům třetí generace a monobaktamům a vůči fluorochinolonovým antibiotikům. Některé izoláty *Klebsiella pneumoniae* s nízkou produkcí ESBL exprimují dva poriny - OmpK36 a OmpK35, přičemž většina ostatních izolátů produkujících ESBL exprimuje pouze OmpK36 a OmpK35 je obvykle exprimován velmi málo nebo je jeho exprese zcela potlačena (HERNANDÉZ-ALLÉS *et al.* 1999, DOMÉNECH-SANCHÉZ *et al.* 2003).

Díky svojí lokalizaci a vysokému počtu kopií získaly poriny v evoluci bakterií multifunkční význam. Jsou schopny plnit funkci fágových receptorů, bakteriocinů, podílejí se na produkci protilátek imunitního systému, jsou vazebnou doménou pro komplement, podílejí se na příjmu různých výživových látek. Na těchto úlohách se podílejí především peptidové domény

na povrchu buňky. Porinové domény jsou potenciální stranou pro vazbu baktericidních látek k povrchu gramnegativních bakterií. Příkladem může být vazba lactoferrinu jako antibakteriálního činidla k porinům. Po navázání lactoferrinu na poriny se mění stabilita a permeabilita vnější bakteriální membrány (SALLMANN *et al.* 1999). Porinové proteiny *Klebsiella pneumoniae* při kontaktu s imunitním systémem aktivují komplement po vazbě na C1q a aktivace tohoto systému vede k produkci opsonizačních proteinů C3b nebo iC3b. Imunitní odpověď pak využívá poriny jako rozpoznávací místa pro spuštění fagocytózy (ALBERTÍ *et al.* 1993).

1.8 AmpC β -laktamázy

Nejčastější příčinou rezistence gramnegativních bakterií k β -laktamům je hydrolyza těchto antibiotik β -laktamázy. Protože β -laktamy patří mezi nepostradatelná antibiotika při léčbě nejzávažnějších infekcí, je studium mechanismů rezistence k této skupině antibiotik důležitou součástí lékařsko-mikrobiologického výzkumu (HRABÁK *et al.* 2009).

Vůbec první zmínka o bakteriálním enzymu, který je schopen zničit penicilin, byla AmpC β -laktamáza u *Escherichia coli* a to již v roce 1940 (ABRAHAM). Mutace s postupně rozšiřujícími se rezistencemi byly nazvány *ampA* a *ampB* (ERIKSSON-GRENNBERG *et al.* 1965). Mutace v *ampA* kmeni jejichž výsledkem byla snížená rezistence, byla označena jako *ampC* (LINSTROM *et al.* 1970). Sekvence *ampC* genu z *E. coli*, která byla zjištěna v roce 1981 (JAURIN *et al.*), se od sekvencí β -laktamáz penicilinázových typů (např. TEM-1) liší, nicméně enzym má v aktivním místě stejně jako tyto β -laktamázy serin. V Amblerově strukturní klasifikaci β -laktamáz patří AmpC do třídy A (AMBLER 1980), ve funkční klasifikaci dle Bushové patří do skupiny 1 (BUSH *et al.* 1995).

Geny *ampC* jsou zahrnuty ve skupině COG 1680 (cluster for orthologous groups, GenBank), kam mimo zmíněných genů patří i penicilin vazebné proteiny třídy C. Skupina zahrnuje mimo jiné proteiny z gramnegativních i z grampozitivních bakterií, striktních anaerobů nebo fakultativních anaerobů. Samotná sekvenace je pro diferenciaci AmpC β -laktamáz nedostatečná. Např. *E. coli* někdy produkuje strukturně velmi

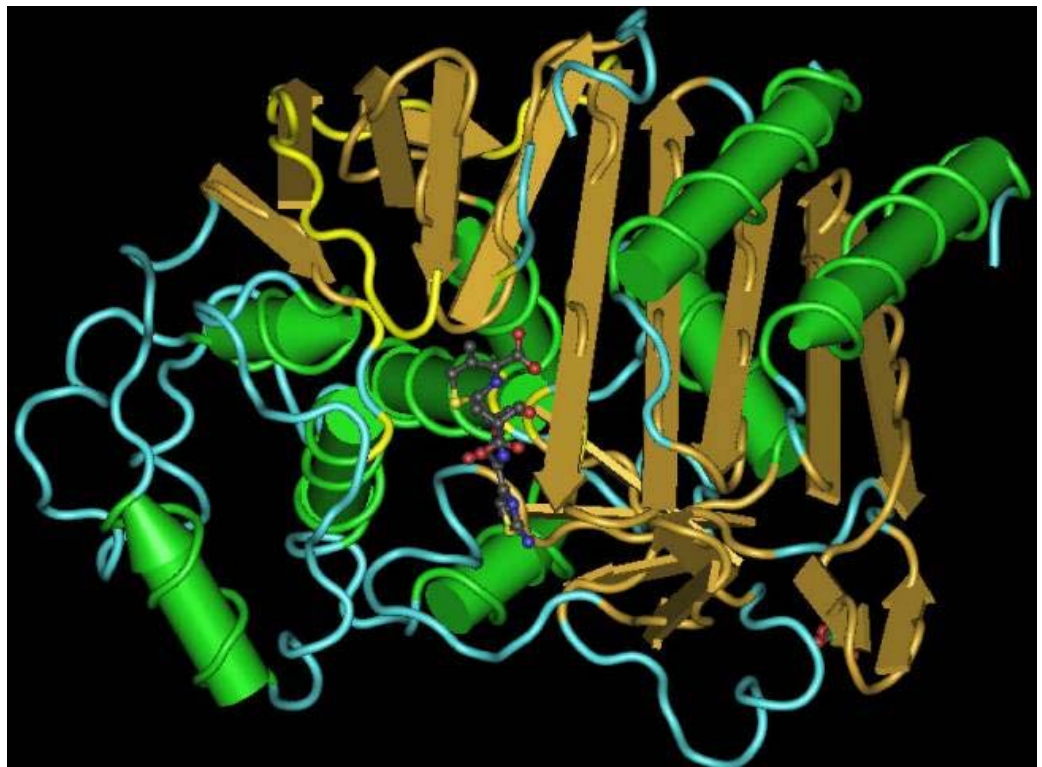
podobný protein AmpH, tomuto proteinu však chybí β -laktamázová aktivita (HENDERSON *et al.* 1997).

Molekulová hmotnost enzymů typu AmpC se obvykle pohybuje od 34 do 40 kDa s isoelektrickým bodem obvykle větším než 8,0. Za zmínku stojí skutečnost, že isoelektrický bod plazmidově přenášených FOX enzymů je podstatně nižší (6,7 – 7,2) (PHILIPPON *et al.* 2002) a jedna z chromozomálně kódovaných AmpC z *Morganella morganii* (kmen PP19) má isoelektrický bod 6,6 (POWER *et al.* 2006). Enzymy jsou lokalizovány v periplazmě, nicméně i zde existuje výjimka, kdy AmpC β -laktamáza *Psychrobacter immobilis* je vylučována do okolního média (FELLER *et al.* 1997). Aktivita těchto enzymů je zaměřena především na cefalosporiny a mohou hydrolyzovat cefamyciny jako např. cefoxitin, oxyiminocefalosporiny - ceftazidim, cefotaxim apod. nebo některé monobaktamy. Hydrolýza některých antibiotik je pomalá díky nízké deacetylaci, ale enzymová afinita k substrátu je vysoká, což je velmi důležité pro nízké koncentrace substrátu (JACOBY *et al.* 2009). Inhibitory enzymů třídy A jako kyselina klavulanová, sulbaktam nebo tazobaktam mají podstatně nižší efekt na AmpC β -laktamázy. AmpC β -laktamázy jsou v ojedinělých případech inhibovány *p*-chloromerkurbenzoáty, vůbec nejsou inhibovány EDTA. Dobrymi inhibitory jsou kloxacilin, oxacilin nebo aztreonam (MONNAIE *et al.* 1993, BUSH *et al.* 1993, BUSH *et al.* 1995)

Terciární struktury AmpC enzymů jsou si velmi podobné (Obr. 5). Struktura je obvykle tvořena α -helikální doménou na jedné straně molekuly a α/β -doménou na druhé. Aktivní strana je umístěna uprostřed enzymu vedle opakujících se β -listů a z druhé strany ji uzavírá NH_4 -konec centrálního α -helixu. Obecně lze konstatovat, že struktura AmpC je podobná β -laktamázám třídy A kromě vyjma vazebné strany pro substrát, která je více otevřená pro enzymy třídy C. Důvodem tohoto rozdílu je pravděpodobně objemnější struktura substrátu – cefalosporinů. Katalyticky aktivní místo u AmpC enzymů tvoří již zmíněný Ser64 a Lys67, Tyr150, Asn152, Lys315 a Ala318. Substituce kterékoliv aminokyselin významně snižuje enzymatickou aktivitu (CHEN *et al.* 2006). Většina popsaných enzymů AmpC vyznačuje rezistencí k používaným inhibitorům serinových β -laktamáz (k. klavulanové, tazobaktamu a sulbaktamu). Nicméně byl popsán i enzym,

který je citlivý k tazobaktamu a sulbaktamu, méně ke kyselině klavulanové. Popsaný enzym se lišil od inherentně přítomné AmpC druhu *E. coli* substitucí některých aminokyselin a tripeptidovou delecí. Právě zjištěná tripeptidová delece byla zodpovědná za citlivost k inhibitorům. Byť by se dle členění Bushové a Amblera mělo jednat o enzym třídy 2, resp. A, původem tato β -laktamáza spadá do skupiny 1, resp. C. Zmíněný příklad ukazuje na vzájemnou prostupnost a prolínání jednotlivých skupin β -laktamáz (KAZMIERCZAK *et al.* 1990, KAYE *et al.* 2004)

U AmpC inherentně přítomné u druhu *Serratia marcescens* byl pozorován fenomén, kdy delece 4 aminokyselin způsobila změnu substrátové specifity. Původní kmen byl rezistentní k penicilinům a cefalosporinům první a druhé generace (včetně cefoxitinu). Nově vzniklý enzym měl schopnost hydrolyzovat ceftazidim, cefepim a cefpirom. Relativně stabilní zůstal ceftriaxon, cefotaxim a aztreonam. Při vyšetření citlivosti nebyla zjištěna žádná synergie mezi cefalosporiny a kyselinou klavulanovou (MAMMERI *et al.* 2004, HRABÁK *et al.* 2009).



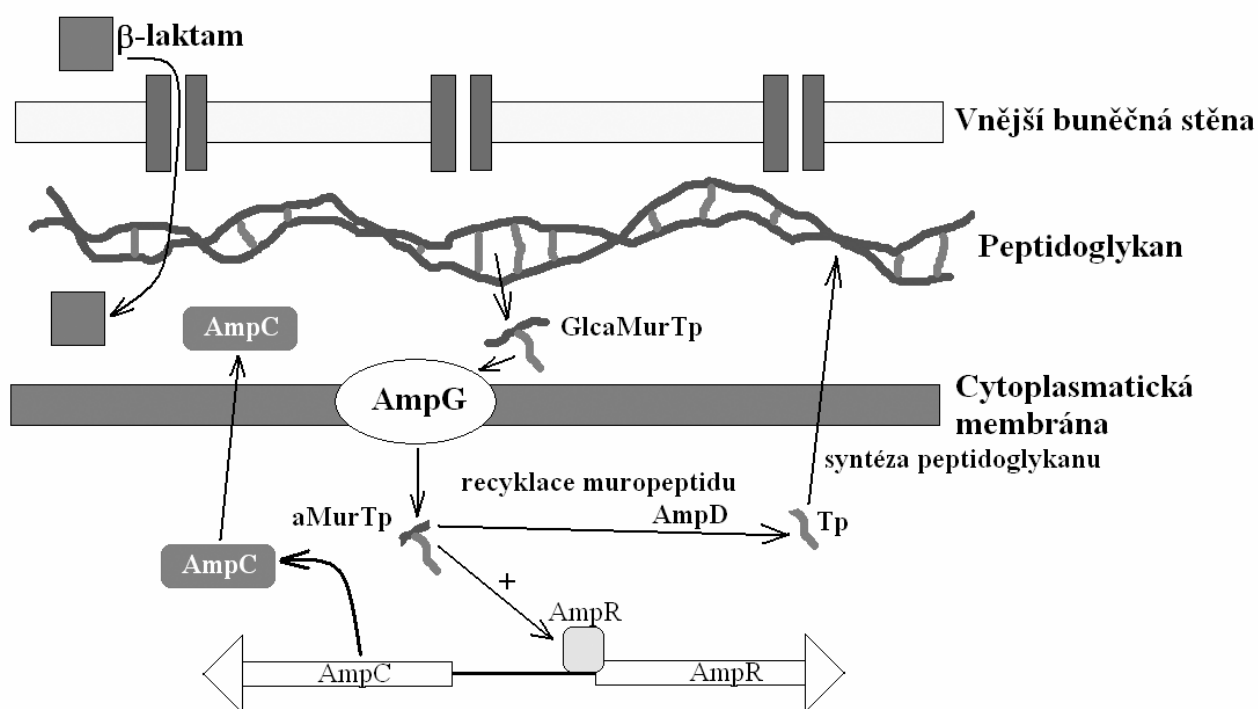
Obr. 5. AmpC inherentní u *E.coli* v komplexu s ceftazidimem v aktivním místě (POWERS *et al.* 2001).

U většiny členů čeledi *Enterobacteriaceae* je exprese nízká, ale inducibilní s návazností na přítomnost β -laktamů. Mechanismus indukce je komplexní (HANSON *et al.* 1999). Porušení biosyntézy mureinu za přítomnosti β -laktamu vede k akumulaci *N*-acetylglukosamin-1,6-anhydro-*N*-acetylmuramátového oligopeptidu. *N*-acetylglukosaminová část je odstraněna za vzniku 1,6-anhydro-*N*-acetylmuramátového tri-, tetra- a pentapeptidu. Tyto oligopeptidy soutěží s oligopeptidy UDP-*N*-acetylmuramátu o vazebnou doménu u AmpR, který patří do LysR rodiny transkripčních regulátorů. Nahrazení UDP-*N*-acetylmuramátu alternativním peptidem vede ke konformační změně AmpR, který aktivuje transkripci *ampC*. Kromě toho, buňka má k dispozici AmpD, což je cytoplazmatická *N*-acetyl-muramyl-L-alanin amidáza, která odštěpuje peptidový zbytek z 1,6-anhydro-*N*-acetylmuramátových a

N-acetylglukosamin-1,6-anhydro-*N*-acetylmuramátových oligopeptidů, čímž snižuje jejich koncentraci a brání zvýšené expresi AmpC (Obr. 6).

Častou příčinou zvýšené exprese u klinických izolátů je mutace v *ampD* vedoucí ke zvýšené inducibilitě nebo konstitutivní nadprodukci AmpC (HANSON *et al.* 2006). Mutace AmpR jsou méně časté ale projevují se také konstitutivní nadprodukcí nebo zvýšenou inducibilitou (KANEKO *et al.* 2005). Nejméně častými jsou mutace v AmpG, jejichž výsledkem jsou konstitutivní nízkoproduktivní exprese. AmpG je permeáza na vnější membráně, která přenáší oligopeptidy zúčastňující se recyklace buněčné stěny a regulace AmpC v cytosolu (LINDQUIST *et al.* 1993).

V regulaci AmpC pomáhají u různých organismů i jiné funkce. U *E.coli* chybí *ampR* gen (HONORÉ *et al.* 1986). AmpC je v tomto případě tedy neindukovatelný, ale je regulován atenuačními mechanismy, což je například i případ produkce AmpC u *Shigella sp.* U *Acinetobacter baumannii* také chybí *ampR*, takže AmpC β -laktamáza je neinducibilní (BOU *et al.* 2000). U *Serratia marcescens* je AmpC regulován *ampR*, ale *ampC* transkript má neobvyklý region nepodléhající translaci o velikosti 126 bazí, který vytváří regulační smyčku ovlivňující průběh transkripce (MAHLEN *et al.* 2003).



Obr. 6. – Schéma regulační dráhy AmpR/AmpC (převzato z www.betalaktamazy.cz, HRABÁK, 2007)

β -laktamy se liší svojí schopností indukce. Benzylpenicilin, ampicilin, amoxicilin a cefalosporiny jako cefazolin a cefalotin jsou silnými induktory dobrými substráty pro AmpC β -laktamázy (SANDERS *et al.* 1986, LIVERMORE 1987). Cefoxitin a imipenem jsou také silnými induktory, ale jsou více odolnými hydrolyze. Cefotaxim, ceftazidim, cefepim, cefuroxim, piperacillin a aztreonam jsou slabými induktory a slabými substráty, ale mohou být hydrolyzovány, pokud je k dispozici dostatečné množství enzymu. Z toho vyplývá, že minimální inhibiční koncentrace slabě indukujících oxyimino- β -laktamů významně rostou se zvýšenou produkcí AmpC. Naopak, minimální inhibiční koncentrace látek, které jsou silnými induktory, nevykazují významnější změny v závislosti na mutacích, protože úroveň exprese indukovaného *ampC* je vždy vysoká. β -laktamázové inhibitory jsou také induktory, zvláště pak kyselina klavulanová, která má malý inhibiční efekt na AmpC β -laktamázovou aktivitu (WEBER *et al.* 1999). Paradoxně se v návaznosti na malý inhibiční efekt může objevit narůstající AmpC

zprostředkovaná rezistence. Indukční efekt klavulanové kyseliny je zvláště důležitý u *Pseudomonas aeruginosa* (LISTER *et al.* 1999).

β -laktamázy AmpC kódované na plazmidu jsou známy od roku 1989 (PHILLIPON *et al.* 2002). Byly nalezeny v klinických izolátech převážně enterobakterů, kde produkce těchto enzymů nebyla očekávaná. Malé rozdíly mezi aminokyselinovým složením dávají možnost zařazení do jednotlivých rodin. V roce 2009 (JACOBY) bylo známo 43 CMY alel a v databázi GenBank bylo k dispozici 7 různých druhů pro FOX, čtyři druhy pro ACC, LAT a MIR, tři druhy pro ACT a MOX a dva druhy pro DHA. Některé z těchto druhů byly kódovány chromozomálními geny a reprezentovány jako možní předchůdci plazmidové kódovaných enzymů. V současné době je známo 73 CMY alel a např. DHA je známo 8 alel. Jak uvádí JACOBY (2009), jsou některé z těchto genů velmi podobné chromozomálně kódovaným AmpC β -laktamázám. Plazmidově kódované enzymy typu CMY jsou reprezentovány hned dvěma skupinami, původ jedné skupiny je velmi blízký *Aeromonas spp.*, původ druhé skupiny je pravděpodobně blízký *Citrobacter freundii*. Plazmidově kódované AmpC β -laktamázy se stejně jako chromozomálně kódované podílejí na rezistenci vůči širokému spektru β -laktamů včetně penicilinů, oxyimino- β -cefalosporinům, cefamycinům a někdy aztreonamům. Citlivost vůči cefepimu, cefpiromu a karbapenemům je malá, pokud se vůbec vyskytuje. Výjimku tvoří ACC-1, která se nepodílí na rezistenci vůči cefamycinům a je inhibována cefoxitinem (GIRLICH *et al.* 2000). Geny pro ACT-1, DHA-1, DHA-2 a CMY-13 jsou velmi blízké *ampR* genům a jsou indukovatelné, zatímco ostatní AmpC geny nejsou a to včetně ostatních CMY alel a CFE-1 propojeného s geny *ampR* (NAKANO *et al.* 2004). Umístění genu na plazmidu nebo chromozomu hraje významnou roli v jeho expresi. Například u *Enterobacter cloacae* je exprese plazmidově kódovaných ať už inducibilních (ACT-1) nebo neinducibilních (MIR-1) 33 až 95-krát vyšší než exprese chromozomálně kódovaných AmpC genů a to především díky plazmidovému číslu plazmidů kódujících tyto geny (2 kopie pro *bla*_{ACT-1} a 12 kopií pro *bla*_{MIR-1}) a silnější vazbě promotoru pro plazmidově kódované geny (REISBIG *et al.* 2003). Plazmidům kódujícím AmpC chybí *ampD* geny, ale úroveň ACT-1 exprese narůstá se ztrátou funkce chromozomálně kódovaného AmpD. AmpD deficientní kmeny *E.coli*

produkující ACT-1 jsou částečně citlivé k imipenemu (MIC, 2 µg/ml), ale např. u klinických izolátů *Klebsiella pneumoniae* byly hodnoty MIC větší než 16 µg/ml a byly spojeny se ztrátou produkce porinů na vnější membráně (BRADFORD *et al.* 2003). Izoláty *Klebsiella pneumoniae* s deficitem porinů měly plazmidově kódované AmpC enzymy zajišťující rezistenci vůči imipenemu a meropenemu (JACOBY *et al.* 2004). Takové kmeny bývají citlivé k cefepimu, ale jinak jsou rezistentní k oxyimino-β-cefalosporinům. Plazmidy nesoucí geny pro AmpC β-laktamázy často nesou i geny pro rezistenci vůči jiným antibiotikům – aminoglykosidům, chloramfenikolu, chinolonům, sulfonamidu a také geny pro jiné β-laktamázy jako například TEM-1, PSE-1, CTX-M-3 a různé typy SHV. Gen kódující AmpC (*bla*_{AmpC}) bývá často součástí integronů ale není inkorporován do genové kazety s přidruženým 59bp elementem. Tentýž *bla*_{AmpC} gen může být nesen na různých vláknech na různých plazmidech (CARATOLLI *et al.* 2002).

Jak uvádí HRABÁK (2007), je klinický význam β-laktamáz AmpC pravděpodobně zcela srovnatelný s ESBL. U producentů AmpC se výběr vhodných antibiotik jednoznačně omezuje o kombinaci β-laktam/inhibitor, resp. o cefamyciny. Některé inhibitory mohou v případě inducibilních enzymů fungovat jako induktory a cefamyciny jsou hydrolyzovány.

V případě producentů ESBL byly tyto dlouhou dobu považovány za klinicky rezistentní ke všem β-laktamům kromě karbapenemů, bez ohledu na výsledky vyšetření citlivosti. U producentů AmpC podobný konsensus dosud neexistuje, avšak celá řada studií zabývajících se jejich klinickým významem naznačuje, že by obdobná definice mohla platit i v těchto případech.

I když nebyl ve skupině AmpC dosud popsán žádný enzym, který by měl schopnost hydrolyzovat karbapenemy, je rezistence k této skupině β-laktamů u producentů AmpC popisována relativně často. Ta je obvykle dána snížením permeability vnější buněčné stěny. Dále je u producentů AmpC popisována rezistence k ostatním skupinám antibiotik, např. fluorochinolonům, rifampicinu, aminoglykosidům atp., kódovaná pravděpodobně geny nesenými na stejném mobilním elementu jako *AmpC* (PHILIPPON *et al.* 2002, HRABÁK 2007).

Zajímavý případ přenosu genů AmpC *in vivo* a vzniku adaptivní rezistence ke karbapenemům popsal BIDEET (2005). Jednalo se o jednoroční dítě, u něhož byla izolována *K. pneumoniae* produkující enzym ACC-1. Pod selekčním tlakem imipenemu došlo ke vzniku rezistence tohoto kmene ke karbapenemům (snížením exprese pórů). Následně byl enzym ACC-1 *in vivo* přenesen na přítomný kmen *E. coli*.

Další nebezpečí selhání léčby u producentů AmpC spočívá v projevujícím se efektu inokula (KANG *et al.* 2004). Jedná se o jev, kdy minimální inhibiční koncentrace (MIC) není konstantou, ale je závislá na množství přítomných bakterií. Při standardním vyšetření citlivosti je používáno inokulum 10^5 CFU/ml (URBÁŠKOVÁ, 1998). V organismu však může být při infekci koncentrace bakterií i o několik řádů vyšší, a tak přítomná koncentrace antibiotika, byť je kmen hodnocen jako citlivý, nemusí být účinná.

Nebezpečí producentů AmpC dle Hrabáka (2007) lze tedy shrnout v následujících bodech:

- vznik a šíření β -laktamáz s novým spektrem účinku,
- šíření rezistence k ostatním skupinám antibiotik vázaných na stejném mobilním elementu jako AmpC,
- snížení permeability vnější buněčné stěny – vznik rezistence k ostatním skupinám antibiotik, především karbapenemům,
- projevující se efekt inokula.

Tyto důvody mohou vést k selhání léčby, v krátkodobém pohledu, resp. k šíření nových typů rezistence v prostředí z hlediska dlouhodobého pohledu.

2 Materiál a metodika

2.1 Materiál

2.1.1 Bakteriální kmeny

Pro diplomovou práci byly použity tyto kmeny *Klebsiella pneumoniae*:

- Kmen 5 (EMPEL *et al.* 2010), v práci uváděn jako kmen S12
- Kmen 18 (EMPEL *et al.* 2010), v práci uváděn jako kmen S4
- Kmen 32 (EMPEL *et al.* 2010), v práci uváděn jako kmen I371

U těchto kmenů byla již v minulosti provedena molekulárně epidemiologická charakterizace (EMPEL *et al.* 2010; CHUDÁČKOVÁ *et al.* 2010). Kmeny patří ke klonu ST11.

Pro transformaci byly použity tyto klinické izoláty *Klebsiella pneumoniae* (izolované od pacientů ve Fakultní nemocnici Plzeň):

- Kmen I784, klon ST461
- Kmen I785, klon ST11 s jiným profilem PFGE
- Kmen I877, klon ST8

2.1.2 Primery

Pro qRT-PCR analýzu byly navrženy primery uvedené v Tab. 3. Ze sledovaných genů *OmpK35*, *OmpK36*, *DHA-1*, *AmpR* byla vybrána sekvence o délce cca 300-400 nukleotidů, zvolen rozsah Forward a Reverse sekvence, velikost PCR produktu a definována teplota tání. Pro získání primerů byl použit webový nástroj Primer BLAST. Pro každou analýzu byla navržena Forward a Reverse sekvence, pro PCR v reálném čase pak Taqman proba formátu 5'-(FAM)-sekvence-(BHQ)-3', kde FAM představuje 6-carboxyfluorescein a BHQ Black hole Quencher. Primery byly dodány dle navržených sekvencí Sigma – Life Science (Praha, Česká republika).

<i>Typ primer / probe</i>	<i>Sekvence</i>
OmpK35 – Forward	5'-GTGGTGATCCCTGCCCTGCT-3'
OmpK35 – Reverse	5'-CCACTGGCCGTAGCCGATCA-3'
OmpK35 – Probe	5'-(FAM)-TCGGCGAGCACGTCTGGACCACCAAT-(BHQ)-3'
OmpK36 – Forward	5'-GTCCCTCCTGGTACCGGCTC-3'
OmpK36 – Reverse	5'-TGCCAGACGAGTCCATGCCT-3'
OmpK36 – Probe	5'-(FAM)-CGTCGACGGCGACCAGACCTACAT-(BHQ)-3'
DHA-1 – Forward	5'-TGAATGATCCGGCGGCAAAA-3'
DHA-1 – Reverse	5'-TCAGCAACTGCTCATAACGGC-3'
DHA-1 – Probe	5'-(FAM)-AGGCGGACTGCCGTTACAGGTGCC-(BHQ)-3'
AmpR – Forward	5'-GTAACCGCGTCAGCCAGTAG-3'
AmpR – Reverse	5'-TGTTACCGCTTTACCCTGC-3'
AmpR – Probe	5'-(FAM)-CGGCTGTACCAGTGCGCCTGACTGTAAC-(BHQ)-3'
16S – Forward	5'-ACATGCAAGTCGAGCGGTAG-3'
16S – Reverse	5'-AAGGTCCCCACTTTGGTCT-3'
16S – Probe	5'-(FAM)-CTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGA-(BHQ)-3'
AmpR1 – Forward	5'-GGCGAATTGCTGCATGGCCG-3'
AmpR1 – Reverse	5'-CCGCTTTACCCTGCTGCGCT -3'
AmpR1 – Probe	5'-(FAM)-ACCCCGGCACCCAGTTGTGCCGCC-(BHQ)-3'
AmpR2 – Forward	5'-TCCGCAATCCGGTCAAACGC-3'
AmpR2 – Reverse	5'-TGAATGTCACCCATGCCGCCG-3'
AmpR2 – Probe	5'-(FAM)-TGCGCGCCTTTGAGGCCGCCG-(BHQ)-3'

Tab. 3. Použití primery pro qRT-PCR analýzu

2.1.3 Chemikálie

Název	Výrobce
Agaróza	Bio-Rad
Ethidium bromid	Sigma
Krevní agar	Bio-Rad
Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Sigma
EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina)	Sigma
Izopropanol	Sigma
70% ethanol	Lachema
Trypton	Oxoid
SDS – dodecylsulfát sodný	Sigma
Kyselina boritá	Sigma
NaCl	Sigma
Kvasničný autolyzát	Oxoid
Sarkozyl	Sigma
Zkumavky Eppendorf	Eppendorf
Pipetovací špičky	
Pipety Eppendorf	Eppendorf
Skleněné zkumavky	

2.1.4 Komerční sady

SeaKem® Gold Agarose (výrobce Cambrex Bio Science Rockland, Inc.)

- agaróza pro přípravu pulzní gelové elektroforézy

Aurum™ Total RNA Mini Kit (výrobce Bio-Rad Laboratories, Inc.)

- souprava pro izolaci a přečištění RNA

AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (výrobce Applied Biosystems)

- souprava pro polymerázovou řetězovou reakci s reverzní transkripcí

NucleoBond® Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel, Duren) - souprava pro izolaci a přečištění plazmidové DNA

Při použití komerčních souprav bylo postupováno dle přiložených návodů a doporučení výrobců.

2.1.5 Enzymy

Název	Výrobce
lysozym	Sigma
proteínáza K	Sigma
ribonukleáza A	Sigma
<i>Xba</i> I	Fermentas

Použití enzymů, jejich příprava a uchovávání bylo provedeno v souladu s pokyny výrobce. *Xba*I od firmy Fermentas byla použita včetně dodaného pufru.

2.1.6 Antibiotika

Název	Výrobce
Cefotaxim (sodná sůl)	Sigma
Ceftazidim (hydrát)	Sigma
Cefepim (Hcl)	Livzon Syntpharm
Cefoxitin (sodná sůl)	Sigma

Použitá antibiotika byla připravována do zásobních roztoků vždy před použitím v konkrétním laboratorním postupu. Před použitím byla antibiotika uchovávána dle pokynů výrobce. Cefoxitin byl přidán do LB média při ochlazení pod 50 °C.

2.1.7 Kultivační média

2.1.7.1 Komplexní média

LB (Luria – Bertani) médium

- 1 % (w/v) trypton
- 0,5 % (w/v) kvasničný autolyzát
- 0,17 M NaCl
- destilovaná voda

pH bylo upraveno na 7,0 a to přidáním 1 M NaOH, sterilizace provedena autoklávováním, příprava pevné půdy byla provedena přidáním po úpravě pH 2 % (w/v) agaru a sterilizována autoklávováním.

Brain heart infusion (BHI) médium

- 18,5 g sušeného média
- 500 ml destilované vody

pH média bylo upraveno na rozmezí $7,4 \pm 0,2$. Medium bylo po přípravě autoklávováno po dobu 20 minut při teplotě 121 °C.

2.1.8 Roztoky

TE pufr

Tris, pH upraveno pro způsob použití

EDTA, pH upraveno pro způsob použití

Pufry byly sterilizovány filtrací. Jednotlivé použité koncentrace Tris a EDTA jsou uvedeny v pracovních postupech.

TBE pufr (10x koncentrovaný)

108 g Tris

55 g kyselina boritá

40 ml 0,5 M EDTA

doplněno do 1 l H₂O

2.1.9 Počítačové programy a internetové databáze

Bioedit (Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, USA,

<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)

REST (M.W.Pfaffl, Physiology Weihenstephan, Technical University of Munich, Germany, <http://www.gene-quantification.de/rest.html>)

<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos.html>

2.1.10 Přístroje a laboratorní zařízení

Kultivační zařízení

Termostat Innovens IGO

Třepačka Infors HT

Centrifugy

Centrifuga Eppendorf

Ostatní

Vortex

Densi-La-Meter (Lachema, Česká republika)

SmartCycler® II (Cepheid®, Dunnyvale, USA)

Gene Pulser™ (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)

PFGE CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)

Sekvenátor ABI 3130 (Applied Biosystems, USA)

2.2 Metodika

2.2.1 Kultivace bakterií v tekutém médiu

Pro kultivaci bakterií v tekutém médiu bylo připraveno Brain Heart Infusion (BHI) - Broth medium. Kultivace bakteriálních kultur probíhala ve zkumavkách umístěných v termostatu při 37 °C.

2.2.2 Kultivace bakterií na pevném médiu

Pro kultivaci bakterií na pevném médiu byl použit komerčně dodávaný krevní agar na Petriho miskách. Bakteriální kultura byla nanesena a rozetřena na pevné médium. Kultivace bakteriálních kultur probíhala v Petriho miskách umístěných v termostatu při 37 °C.

2.2.3 Uchovávání bakteriálních kultur

Bakteriální kultury byly dlouhodobě uchovávány při -70 °C ve zkumavkách Eppendorf v médiu BHI s přídavkem 10% glycerolu. Pro jejich opakované použití byly zamražené kultury ohřáty na pokojovou teplotu a kultura byla opakovaně vyočkována ke kultivaci na tekutém nebo pevném médiu.

2.2.4 Měření optické denzity bakteriální kultury

Pro měření optické denzity bakteriální kultury byl použit spektrofotometr Densi-La-Meter. Měření probíhalo na fixní vlnové délce 525 nm. Jako slepý vzorek byl použit vzorek obsahující matici (fyziologický roztok, sterilní médium) bez buněčné kultury. Minimální objem pro měření vzorku byl 2 ml, pro měření byly použity skleněné zkumavky.

2.2.5 Růstová křivka *Klebsiella pneumoniae*

1. Zamražené vzorky odpovídajících kmenů byly rozmrazeny a temperovány na laboratorní teplotu. Poté byl vzorek vyočkován na pevné médium a kultivován 24 hodin v termostatu při teplotě 37 °C.
2. Z pevného média byl vzorek přeočkován do tekutého média a bakteriální kultura byla pěstována přes noc v termostatu při teplotě 37 °C.
3. Poté bylo 100 µl kultury přeočkováno do vytemperovaného média o objemu 10 ml a to tak, aby optická denzita zaočkovaného média dosahovala hodnoty 0,1. Poté byla kultura pěstována do hodnoty optické denzity 0,7-0,8.
4. Takto narostlá kultura byla opět přeočkována do 10 ml vytemperovaného média na optickou denzitu 0,1, ke vzorkům byl přidán cefotaxim v koncentracích uvedených v Tab. 4. Koncentrace cefotaximu byly určeny na základě předchozího testování citlivosti jednotlivých kmenů vůči cefotaximu - jednalo se o subinhibiční koncentrace (HRABÁK, nepublikovaná data).
5. Poté byla bakteriální kultura pěstována v termostatu při teplotě 37 °C a v časech 0;2;3;3,5;4;5 hodin byl odebrán vzorek kultury do zkumavky Eppendorf a uchován při teplotě.
6. Z naměřených hodnot byly vyneseny proti času sestaveny růstové křivky. Pro každý kmen byla růstová křivka stanovena pro tři samostatně zpracované vzorky.

Kmen	MIC / CTX (mg/l)	koncentrace CTX (mg/l)			
S4	1,00	0,00	0,25	0,50	0,75
S12	1,00	0,00	0,25	0,50	0,75
I371	32,00	4,00	8,00	12,00	16,00

Tab. 4 – koncentrace cefotaximu (CTX) pro jednotlivé kmeny *Klebsiella pneumoniae* s uvedeným minimálními inhibičními koncentracemi (MIC) jednotlivých kmenů

2.2.6 Stanovení minimálních inhibičních koncentrací

Pro stanovení minimálních inhibičních koncentrací byl použit postup ředěním v bujónu mikrodiluční metodou doporučený European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) a interpretace byla provedena dle odpovídajících doporučení (www.eucast.org).

1. Výchozí koncentrací pro přípravu inokula byla zaočkovaná kultura s optickou densitou dle McFarlanda 1,0.
2. Pro zohlednění efektu inokula byly připraveny koncentrace inokula CFU 3×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 .
3. S ohledem na dříve získané informace o citlivosti jednotlivých kmenů byly použity výchozí koncentrace cefepimu 1024 µg/ml, ceftazidimu 1024 µg/ml a cefotaximu 1024 µg/ml.
4. V mikrotitrační destičce byly připraveny do výchozí jamky antibiotika s bujónem o výchozí koncentraci uvedené v předchozím bodě a ředěním 1:1 v každé následující jamce byla připravena koncentrační řada pro cefepim v rozmezí 1024 - 4 µg/ml, pro ceftazidim v rozmezí 1024 - 0,031 µg/ml a pro cefotaxim v rozmezí 1024 - 0,031 µg/ml.
5. Takto připravené koncentrační řady bujónu s antibiotikem byly očkované bakteriální kulturou s definovaným inokulem.
6. Po 18 hodinové inkubaci v termostatu při teplotě 37 °C byl proveden odečet inhibice pro jednotlivé koncentrace antibiotik a vyhodnocena rezistence / citlivost pro jednotlivá inokula a antibiotika.

2.2.7 Sledování genové exprese genů porinů a beta-laktamáz

2.2.7.1 Příprava vzorku

Pro sledování exprese RNA byly při provádění růstových křivek odebírány vzorky v definovaných časech. Takto odebrané vzorky byly přepipetovány do zkumavek Eppendorf a zamraženy při teplotě -70 °C.

Po rozmražení byla ze vzorku níže uvedeným způsobem izolována RNA.

2.2.7.2 Izolace RNA

Pro izolaci RNA byla použita souprava AurumTM total RNA Mini Kit. Dle pokynů výrobce byly připraveny k použití roztoky pro izolaci RNA s pomocí uvedené soupravy.

1. Rozmražené vzorky byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku a jejich optická densita byla ředěním upravena na stupeň 3,0 dle McFarlanda.
2. 1,5 ml takto připravené bakteriální kultury bylo přepipetováno do mikrocentrifugační zkumavky a vzorek byl centrifugován po dobu 15 minut při 12 000 x g.
3. Z centrifugovaného vzorku byl slit supernatant a k sedimentu bylo přidáno 100 μ l 500 μ g/ml lysozymu rozpuštěného v TE pufru (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5). Po přidání pufru byl vzorek řádně promíchán pipetou a inkubován při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
4. Po inkubaci bylo přidáno 350 μ l lyzačního roztoku s β -merkaptoethanolem a vzorek byl řádně promíchán pipetou.
5. Poté byl přidán 250 μ l 70% isopropanolu a vzorek byl řádně promíchán tak, aby vznikl homogenát bez viditelných fázových rozhraní.
6. Takto připravený vzorek byl přelit do 2ml RNA izolačních kolonek.
7. Kolonky byly centrifugovány po dobu 30 s při 12 000 x g. Po centrifugaci byl filtrát slit a kolonka ponechána v centrifugační nádobce.
8. Na kolonku byl napipetován low stringency promývací roztok o objemu 700 μ l a vzorek byl centrifugován dobu 30 s při 12 000 x g. Po centrifugaci byl filtrát slit a kolonka ponechána v centrifugační zkumavce.
9. Pro účely rozštěpení DNA ve vzorku byla připravena DNáza I, která je součástí soupravy, rozpuštěním v 250 μ l 10 mM Tris, pH 7,5.
10. Pro každý vzorek bylo připraveno 5 μ l rozpuštěné DNázy I spolu s 75 μ l DNázového ředícího roztoku. Takto připravená DNáza I byla přidána na membránu kolonky a vzorek byl s přidanou DNázou inkubován při pokojové teplotě po dobu 15 minut.
11. Po inkubaci bylo přidáno 700 μ l high stringency promývacího roztoku do RNA kolonky a vzorek byl centrifugován dobu 30 s při 12 000 x g.

12. Po promytí high stringency promývacím roztokem bylo přidáno 700 µl low stringency promývacího roztoku a vzorek byl centrifugován dobu 30 s při 12 000 x g.

13. Poté byl vzorek centrifugován dobu 2 minut při 12 000 x g pro odstranění zbytků ředícího roztoku.

14. Na membránu kolonky bylo nanášeno 80 µl elučního roztoku a vzorek byl takto inkubován po dobu 1 minuty při pokojové teplotě. Poté byl vzorek centrifugován po dobu 2 minut při 12 000 x g. Získaný vzorek obsahoval RNA k další analýze.

2.2.7.3 Příprava transformantů pro qRT-PCR

Pro provedení qRT-PCR s transformovanými buňkami dle postupu FOURNETA-FAYARDA byly získané transformované buňky kultivovány níže uvedeným způsobem.

1. Získané vzorky transformovaných kmenů vyočkovány na pevné médium a kultivovány 18 hodin v termostatu při teplotě 37 °C.
2. Z média byl vzorek přeočkován do LB média a bakteriální kultura byla kultivována 1 hodinu v termostatu při teplotě 37 °C.
3. Poté byl z bakteriální kultury odebrán vzorek do zkumavky Eppendorf a uchován při teplotě -70 °C.
4. Do LB média s naočkovanou kulturou byl přidán cefoxitin a kultivace probíhala další 2 hodiny.
5. Poté byl z bakteriální kultury odebrán druhý vzorek do zkumavky Eppendorf a uchován při teplotě -70 °C.
6. Takto připravené vzorky byly zpracovány postupem uvedeným v kapitole qRT-PCR / Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí.

2.2.7.4 qRT-PCR / Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí

Pro detekci získané RNA a její kvantifikaci metodou qRT-PCR byla použita souprava AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit. Pro průběh reakce byl připraven mastermix dle Tab. 5 a to vždy s odpovídajícím Forward primerem, Reverse primerem a Taq sondou. Příprava mastermixu probíhala v chladícím stojánku dodávaném firmou Cepheid spolu s termocyklem.

Složka mixu	Objem / μl
2x RT-PCR pufr	12,5
Forward primer	0,5
Reverse primer	0,5
Taqman probe	0,5
25x RT-PCR enzyme mix	1,0
RNA / vzorek	1,0
Nuclease-free H ₂ O	9,0
Celkem	25,0

Tab. 5. Složení mastermixu pro provedení PCR.

Reakce s uvedeným mastermixem byla provedena dle níže uvedeného programu.

Proces	Pořadí	Počet cyklů	Teplota	Čas
Reverzní transkripce	1	1	45 °C	10 min
RT inaktivace / úvodní denaturace	2	1	95 °C	15 min
Amplifikace	3	40	95 °C 60 °C	15 s 60 s

Jako kontrola pro provedení qRT-PCR byl použit Forward primer, Reverse primer a Taq sonda 16S bakteriální podjednotky ribozomu. Všechny vzorky byly měřeny v triplicátu. Pro vyhodnocení qRT-PCR byl použit software REST 2009 (Verze 2.0.13) (PFAFFL *et al.* 2002).

2.2.8 Transformace plazmidů

2.2.8.1 Získání plazmidové DNA

Plazmidová DNA z kmenů *Klebsiella pneumoniae* S4, S12 a I371 byla získána s pomocí NucleoBond® Xtra Midi kitu dle níže uvedeného postupu.

1. Na pevné médium byly vyočkovány dotčené kmeny a byly inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C.
2. Kmeny byly přeočkovány v rozsahu 1 kolonie do tekutého LB média o objemu 3 ml a inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C za stálého míchání o frekvenci 300 rpm po dobu 8 hodin.
3. Takto narostlá bakteriální kultura byla přeočkována v poměru 1/1000 (kultura/ LB médium) a inkubována v termostatu při teplotě 37 °C za stálého míchání o frekvenci 300 rpm po dobu 16 hodin.
4. Dle vzorce $V = 400 / OD_{600}$, kde V je potřebný objem vzorku byl stanoven objem vzorku k centrifugaci. Vzorek byl centrifugován rychlostí 5000 x g po dobu 15 minut při teplotě 4 °C, získaný supernatant byl odstraněn.
5. Získaná peleta byla resuspendována 8 ml resuspendačního pufru obsahujícího RNasu A, vzorek byl homogenizován vortexováním.
6. K získané suspenzi bylo přidáno 8 ml lyzačního pufru a vzorek byl ručně promíchán. Po promíchání byl inkubován při laboratorní teplotě po dobu 5 minut.
7. Kolonky pro získání plazmidové DNA byly promyty ekvilibračním puftrem o objemu 12 ml.
8. K suspensi bylo přidáno 8 ml neutralizačního pufru a buněčný lyzát byl ručně promíchán (10 - 15 krát otočením zkumavky) tak, aby byl homogenní.
9. Homogenní vzorek byl postupně nanášen na kolonku až do úplného spotřebování lyzátu ze zásobní nádoby.
10. Po odtečení lyzátu byl filtr promyt 5 ml ekvilibračního pufru. Poté byl odstraněn filtr z kolonky a kolonka byla promyta 8 ml pufru.

11. Přidáním 5 ml elučního pufru byla kolonka promyta a eluát byl zachycen do přidané zkumavky.

12. Do eluátu byl přidán 3,5 ml izopropanolu za účelem precipitace eluované DNA a vzorek byl zvortexován. Poté byl vzorek centrifugován při 15000 x g po dobu 30 minut při teplotě 4 °C. Supernatant byl slit.

13. K peletě byly přidány 2 ml 70% ethanolu a vzorek byl centrifugován při 15000 x g po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Poté byl ethanol ze zkumavky odpipetován tak, aby peleta mohla dobře vyschnout.

14. Pro další práci byla peleta rozpuštěna v TE pufru pH 7,5 promícháním pipetovací špičkou.

2.2.8.2 Transformace kompetentních buněk *Klebsiella pneumoniae* elektroporací

Pro transformaci kompetentních buněk *Klebsiella pneumoniae* je nezbytné použít postup dle FOURNET-FAYARDA *et al.* (1995). Postup transformace je volen především s ohledem na polysacharidové pouzdro *Klebsiella pneumoniae*, které transformaci běžným postupem činí neúčinnou.

1. Bakteriální buňky kmenů I784, I785 a I877 byly kultivovány v BHI bujónu s 0,7 mM EDTA a po 4 hodinách byly odebrány vzorky z kultivačních médií a ochlazeny na 4 °C.

2. Vzorky byly centrifugovány 4000 x g po dobu 15 minut při teplotě 4 °C a promyty čtyřikrát v 10% glycerolu.

3. Buňky byly poté resuspendovány v 10% glycerolu s výtěžkem 10^9 CFU/ml a to přepočtem dle optické denzity dle McFarlanda.

4. Pro elektroporaci bylo smícháno 200 ng plazmidové DNA a 40 μ l bakteriální suspenze, směs byla promíchána ve sterilní kyvetě. Takto připravená směs byla inkubována na ledu po dobu 5 minut.

5. Po ukončení inkubace byla směs podrobena elektroporaci s využitím Gene PulserTM a to s nastavením 25 μ F, 200 Ω a 18 kV/cm.

6. Ihned po pulsu byly buňky vyjmuty z elektrod a smíchány s 1ml BHI bujónu a inkubovány po dobu 1 hodiny při 37 °C.

7. Po inkubaci byly kultivované buňky zaočkovány na LB médium s přidáním 64 μ g/ml cefoxitinu.

8. Takto připravené transformované buňky byly odebrány do zkumavek Eppendorf a zamraženy při -70 °C pro další analýzy.

2.2.9 Pulzní gelová elektroforéza

Pulzní gelová elektroforéza je modifikovaným postupem dle SEIFERT *et al.* (2005) v modifikaci R. Izdebského (HRABÁK, osobní sdělení).

2.2.9.1 Příprava vzorku

Výchozím materiálem je určený kmen *Klebsiella pneumoniae* kultivovaný na krevním agaru 24 hodin při teplotě 37 °C.

1. Ve fyziologickém roztoku byla připravena suspenze bakterií s hustotou 4,0 dle McFarlanda.
2. Do nádobky Eppendorf byla přepipetována suspenze o objemu 1 ml, centrifugována, odlit supernatant a sediment byl rozpuštěn ve 150 µl roztoku (0,1 M Tris, 0,1 M EDTA, pH 8,0).
3. Takto připravená suspenze byla inkubována při 55 °C po dobu 10 minut.
4. K suspenzi bylo přidáno 20 µl proteinázy K (20 mg/ml) a po přidání byla směs dobře promíchána pipetovací špičkou.
5. Byla připravena agaróza SeaKem Gold dle pokynů výrobce o koncentraci 1,5% v TE pufru o pH 8,0 s 1% SDS. Po důkladném rozpuštění byla agaróza uchovávána při teplotě 55 °C.
6. K suspenzi bylo přidáno 170 µl agarózy o teplotě 55 °C a vzorek byl dobře a rychle promícháván.
7. Získaná směs byla nanášena na skleněnou desku pokrytou parafilmem v kapkách o objemu 20 µl a s pomocí skel byly z nanášené směsi vytvořeny disky.
8. Disky na skle byly ponechány na 5 minut při teplotě 5 °C.
9. Po vyjmutí z 5 °C byly disky umístěny do zkumavek o objemu 15 ml a bylo přidáno 2,5 ml lyzačního pufru (50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8,0, 1% sarkozyl), dále 12 µl proteinázy K (20 mg/ml) a 20 µg/ml RNázy A (2 µl na 1 ml).
10. Takto připravený vzorek byl umístěn do temperované vodní lázně teplotě 55 °C za stálého míchání po dobu 2 hodin.
11. Po inkubaci v temperované lázni byl roztok slit a disky dvakrát promývány v 10 ml H₂O (ohřáté na 55 °C) po dobu 15 minut v temperované vodní lázni na teplotu 55 °C za stálého míchání.

12. Následně byly disky třikrát promývány v 10 ml TE pufru o pH 8,0 (ohřátém na 55 °C) po dobu 15 minut v temperované vodní lázni na teplotu 55 °C za stálého míchání.

13. Po promytí byly disky přeneseny do zkumavek Eppendorf, byl přidán TE pufr o pH 8,0 tak, aby byly disky zcela v pufru ponořeny a dále byly disky uchovány pro další analýzu při teplotě 4 °C.

14. Po vyjmutí z lednice byl disk obsahující DNA přenesen do nové zkumavky Eppendorf, bylo přidáno 100 µl pufru pro restriktázu *Xba*I a takto připravený vzorek byl inkubován při pokojové teplotě 30 min.

15. Po inkubaci byl pufr odstraněn a disk umístěn v 50 µl téhož pufru obsahujícího 10 U enzymu *Xba*I. Vzorek byl inkubován při teplotě 37 °C po dobu 3 hodin.

16. Po inkubaci s účinkem restriktázy byl pufr s restriktázou slit a vzorek byl zalit TE puftrem o pH 8,0. Takto připravené disky s naštěpenou chromozomální DNA byly umístěny do agarózového gelu.

2.2.9.2 Provedení pulzní gelové elektroforézy

Elektroforéza byla provedena na přístroji Gene Pulser™ (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Elektroforéza byla provedena v 0,5krát koncentrovaném pufru TBE za nastavení uvedeného v Tab. 6.

Parametr	Hodnota / nastavení
Teplota	12 °C
Napětí	6 V/cm
Počáteční impuls	1 s
Konečný impuls	30 s
Délka trvání	20 h

Tab. 6. Nastavení pulzní gelové elektroforézy

Po provedení elektroforetického dělení v pulzním poli byl gel s rozdělenými fragmenty DNA obarven po dobu 30 minut v roztoku ethidium bromidu a odbarven v destilované vodě po dobu 120 minut.

2.2.10 Multilokusová sekvenační typizace (MLST)

Analytická část multilokusové sekvenační typizace (MLST) byla prováděna v rámci jiné studie, kam byly zařazeny i kmeny I784, I785, I877 a zahrnovala izolaci DNA z poskytnutých kmenů, dále amplifikaci housekeeping genů metodou PCR s MLST primery a následnou sekvenací s použitím BigDye® barviv. Sekvence probíhala na analyzátoru ABI 3130 (Applied Biosystems, USA). Kromě přípravy kmenů pro izolaci DNA nebyla část MLST součástí diplomové práce.

Předmětem diplomové práce pak bylo vyhodnocení získaných sekvencí s pomocí programu BIOEDIT (Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, USA, <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Na základě získaných sekvencí a porovnáním s databází alel pro *Klebsiella pneumoniae* na www.pasteur.fr ve formátu FASTA byly určeny jednotlivé typy alel a typizován kmen ve formátu ST.

3 Výsledky

Výsledky diplomové práce jsou prezentovány v logickém sledu, ve kterém byly získány. S ohledem na údaje, týkající se především předchozí typizace kmenů a hodnot minimálních inhibičních koncentrací, které byly získány před realizací diplomové práce a v rámci jiných projektů, byly práce prováděny v následujícím sledu:

- 1) sledování efektu inokula u minimálních inhibičních koncentrací
- 2) sledování exprese β -laktamázy DHA-1, regulačního proteinu AmpR a porinů OmpK35 a OmpK36
- 3) ověření produkce DHA-1 ovlivněné cefoxitinem
- 4) transformace plazmidů
- 5) pulzní gelová elektroforéza
- 6) multilokusová sekvenační typizace

Získané výsledky a jejich případná logická návaznost je komentována v jednotlivých kapitolách výsledků a v diskuzi.

3.1 Sledování efektu inokula u minimálních inhibičních koncentrací

Cíl: Ověřit vliv efektu inokula při stanovení minimálních inhibičních koncentrací pro antibiotika cefotaxim, ceftazidim a cefepim.

Závislost minimální inhibiční koncentrace cefotaximu, ceftazidimu a cefepimu na velikosti inokula byla stanovena u všech tří testovaných kmenů S4, S12 a I371. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 7. Vůči cefepimu jsou všechny sledované kmeny rezistentní neohledě na velikost inokula a koncentraci antibiotika. Pro inokulum 3×10^8 jsou všechny kmeny vůči sledovaným antibiotikům rezistentní. Kmen S4 vykazuje v závislosti na velikosti inokula (10^5 - 10^7) citlivost pro ceftazidim v rozpětí 16-128 $\mu\text{g/ml}$, pro cefotaxim v rozpětí 4-128 $\mu\text{g/ml}$. Podobně kmen S12 pro ceftazidim v rozpětí 32-128 $\mu\text{g/ml}$, pro cefotaxim v rozpětí 4-16 $\mu\text{g/ml}$. Zcela odlišná je situace u kmene I371, který je ve všech objemech inokula vůči ceftazidimu rezistentní, vůči cefotaximu vykazuje citlivost v rozpětí 64-128 $\mu\text{g/ml}$.

Kmen	S4			S12			I371		
	MICs ($\mu\text{g/ml}$)								
Velikost inokula	FEP	CAZ	CTX	FEP	CAZ	CTX	FEP	CAZ	CTX
10^5	>512	>32	>8	>512	>128	>16	>512	>512	>128
10^6	>512	>16	>4	>512	>32	>4	>512	>512	>64
10^7	>512	>128	>128	>512	>64	>512	>512	>512	>512
3×10^8	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512

Tab. 7. Stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro kmeny S4, S12 a I371a pro uvedená antibiotika FEP – cefepim, CAZ – ceftazidim, CTX – cefotaxim.

3.2 Odběr vzorků pro sledování exprese β -laktamázy DHA-1, regulačního proteinu AmpR a porinů OmpK35 a OmpK36

Cíl: Připravit vzorky pro sledování exprese DHA-1, AmpR, OmpK 35, OmpK36 s přidavkem cefotaximu (CTX) jako induktoru v různých bodech růstové křivky.

Pro potřeby sledování exprese sledovaných genů *DHA-1*, *AmpR*, *OmpK35*, *OmpK36* byly během kultivace v BHI médiu s cefotaximem odebírány vzorky v intervalech 0; 2; 3; 3,5; 4 a 5 hodin po zaočkování. Z předchozích údajů byly známy minimální inhibiční koncentrace, s ohledem na které byla koncipována i koncentrační řada cefotaximu pro jednotlivé kmeny. Pro kmeny S4 a S12 byly zvoleny koncentrace 0,00; 0,25; 0,50 a 0,75 mg/l, pro kmen I371 byly zvoleny koncentrace 4,00; 8,00; 12,00 a 16,00 mg/l. Všechny vzorky byly měřeny a odebírány v triplicátech. Výsledky růstových křivek jsou uvedeny v Tab. 8,9,10 a přehled zpracován v Obr. 7,8,9. Z grafického zpracování je zřejmé, že všechny křivky postihují lag fázi a exponenciální fázi růstu. U kmene S4 je viditelně potlačený růst s narůstající koncentrací cefotaximu, rozdíly v růstu u koncentrací 0,50 a 0,75 mg/l cefotaximu nejsou již rozlišitelné a pohybují se v mezích standardní odchylky měření. U kmene S12 je růstová křivka téměř shodná pro všechny zvolené koncentrace antibiotika. Všechny viditelné odchylky jsou v rámci standardní odchylky měření. Kmen I371 se chová již jinak. S přidáním antibiotika se zvyšuje sklon křivky v exponenciální fázi mezi 3 a 4 hodinou, po 4 hodině dochází ke zpomalení růstu s tím, že se zvyšující se koncentrací antibiotika se růst po 4 hodině zpomaluje. Je pravděpodobné, že účinek antibiotika nastává v době kolem 4 hodiny, čemuž odpovídá i charakter křivky. U nízké koncentrace cefotaximu (4,00 mg/l) je průběh růstové křivky velmi podobný kmenům S4 a S12. Se zvyšující se koncentrací antibiotika dochází k rychlejšímu růstu do 4 hodiny, reciprocně po 4 hodině dochází se zvyšující se koncentrací k rychlejšímu zpomalování růstu. Vezmeme-li v úvahu, že koncentrace cefotaximu jsou vybrány ve vztahu k dříve naměřeným minimálním inhibičním koncentracím, chová se kmen I371 odlišně než kmeny S4 a S12.

Kmen S4	1. vzorek						2. vzorek						3. vzorek					
Čas odb (h)	0,0	2,0	3,0	3,5	4,0	5,0	0,0	2,0	3,0	3,5	4,0	5,0	0,0	2,0	3,0	3,5	4,0	5,0
c CTX (mg/l)	McFarland						McFarland						McFarland					
0,00	0,7	0,9	1,5	2,7	4,4	5,9	0,8	0,9	1,4	2,4	4,0	6,2	0,7	0,7	1,2	2,1	3,8	6,0
0,25	0,7	0,8	1,2	1,9	3,6	5,8	0,7	0,8	1,1	1,8	3,2	5,3	0,7	0,8	1,2	1,9	3,2	5,3
0,50	0,7	0,7	1,2	2,0	3,5	5,3	0,7	0,7	1,0	1,6	2,9	5,0	0,7	0,8	1,1	1,8	3,2	5,6
0,75	0,7	0,7	1,1	1,8	3,2	5,4	0,9	0,9	1,2	1,7	2,8	5,4	0,8	0,8	1,2	1,8	3,1	5,5

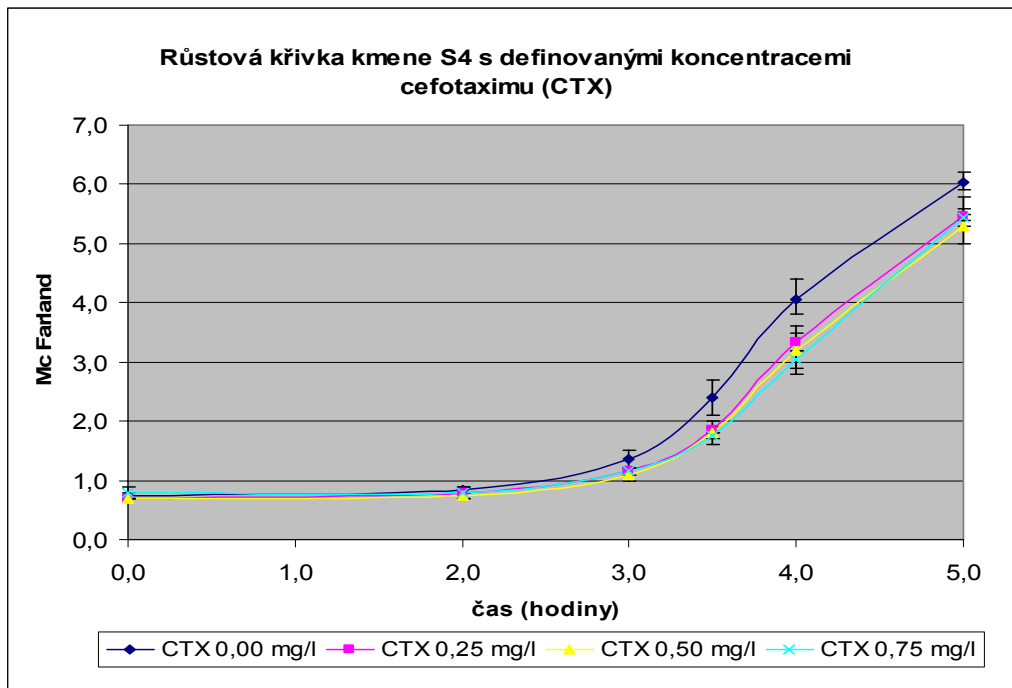
Tab. 8. Naměřené hodnoty růstové křivky dle McFarlanda pro kmen S4 za přidání cefotaximu v uvedených koncentracích.

Kmen S12	1. vzorek						2. vzorek						3. vzorek					
Čas odb (h)	0,0	2,0	3,0	3,5	4,0	5,0	0,0	2,0	3,0	3,5	4,0	5,0	0,0	2,0	3,0	3,5	4,0	5,0
c CTX (mg/l)	McFarland						McFarland						McFarland					
0,00	0,7	0,7	1,1	1,9	3,3	5,5	0,7	0,7	1,1	1,5	2,6	5,1	0,7	0,7	1,1	1,7	2,9	5,2
0,25	0,7	0,7	1,1	1,7	3,0	5,1	0,7	0,7	1,0	1,5	2,5	5,1	0,8	0,8	1,2	1,7	2,9	5,3
0,50	0,9	1,1	1,5	2,1	3,2	5,5	0,9	0,9	1,3	1,8	2,8	5,1	0,6	0,7	1,0	1,6	2,8	5,0
0,75	0,8	1,0	1,3	1,8	3,1	5,3	0,7	0,8	1,0	1,5	2,5	4,8	0,7	0,7	1,2	1,8	3,2	5,3

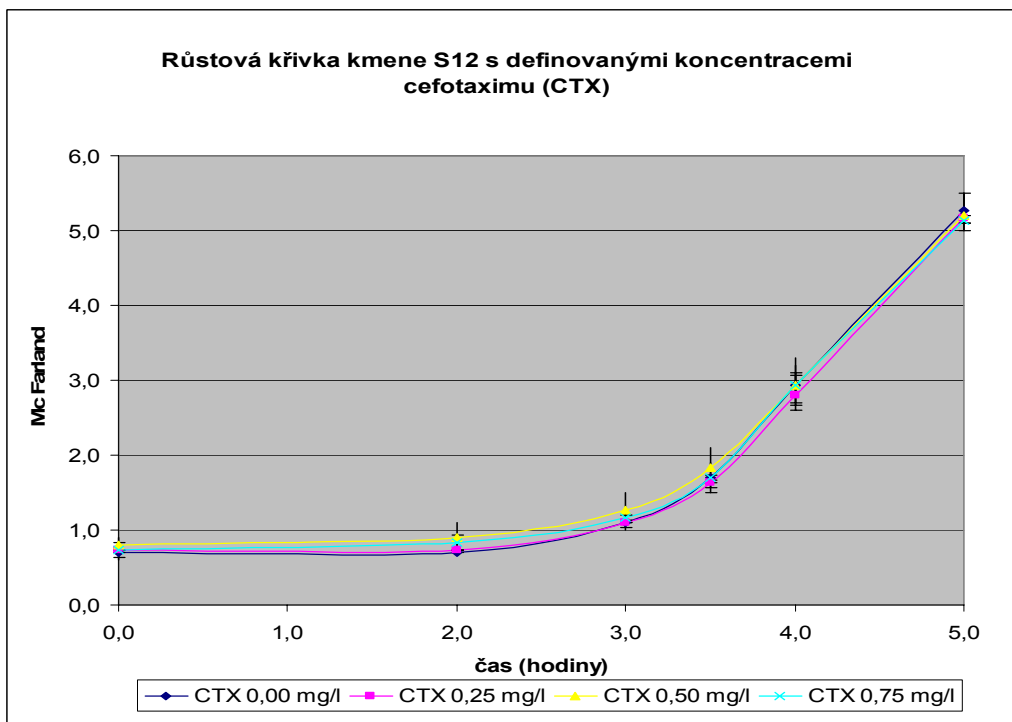
Tab. 9. Naměřené hodnoty růstové křivky dle McFarlanda pro kmen S12 za přidání cefotaximu v uvedených koncentracích.

Kmen I371	1. vzorek						2. vzorek						3. vzorek					
Čas odb (h)	0,0	2,0	3,0	3,5	4,0	5,0	0,0	2,0	3,0	3,5	4,0	5,0	0,0	2,0	3,0	3,5	4,0	5,0
c CTX (mg/l)	McFarland						McFarland						McFarland					
4,00	0,8	0,9	1,4	2,1	3,7	5,2	0,8	0,9	1,1	1,5	2,6	4,6	0,7	0,7	1,1	1,7	3,3	5,1
8,00	0,6	1,1	1,5	2,1	3,5	5,0	0,9	0,6	1,0	1,4	2,7	4,6	0,6	0,6	1,0	1,5	4,1	4,6
12,00	0,6	0,7	1,2	2,0	3,2	4,8	0,6	0,7	1,2	1,7	3,7	4,8	0,6	0,7	1,3	2,0	3,6	4,8
16,00	0,7	0,8	1,5	2,3	4,3	5,0	0,6	0,7	1,4	2,4	4,3	4,9	0,6	0,7	1,5	2,4	4,3	4,9

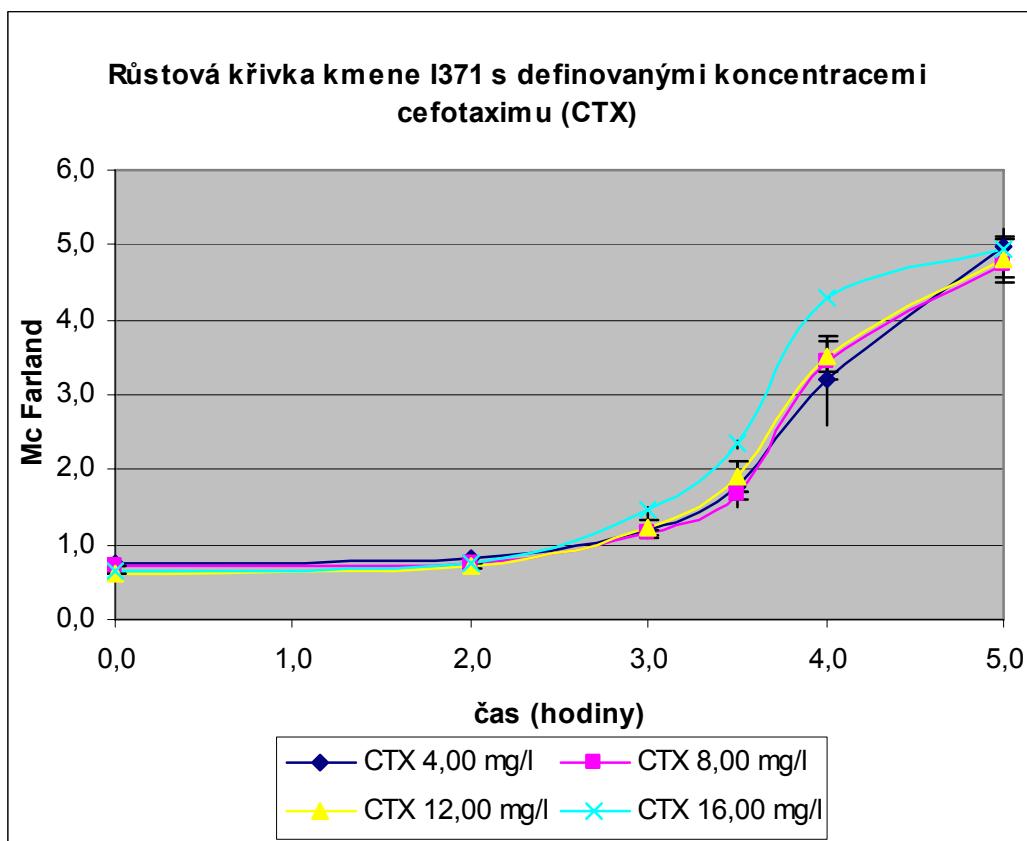
Tab. 10. Naměřené hodnoty růstové křivky dle McFarlanda pro kmen I371 za přidání cefotaximu v uvedených koncentracích.



Obr. 7. Graf růstové křivky dle McFarlanda pro kmen S4 za přidání cefotaximu v uvedených koncentracích.



Obr. 8. Graf růstové křivky dle McFarlanda pro kmen S12 za přidání cefotaximu v uvedených koncentracích.



Obr. 9. Graf růstové křivky dle McFarlanda pro kmen I371 za přidání cefotaximu v uvedených koncentracích.

3.3 Sledování exprese genů DHA-1, AmpR, OmpK35, OmpK36

Cíl: Zjistit expresi jednotlivých genů zúčastněných v odpovědi K.pneumoniae na přítomnost antibiotika v definované koncentraci.

Protože souběžné sledování exprese genů DHA-1, AmpR, OmpK35 a OmpK36 není v literatuře zmíněno a detailní charakterizace uvedených kmenů nebyla metodou qRT-PCR v minulosti prováděna, byly po dohodě s vedoucím diplomové práce vybrány vzorky postihující především oblast exponenciální fáze, kde lze odpovídající transkripty očekávat. Výsledky získané metodou qRT-PCR byly zpracovány v programu REST a práci jsou uváděny jako relativní exprese z triplicátů vztažených ke kontrole v podobě primerů pro 16S ribozomální podjednotku.

Výsledky qRT-PCR sledovaných genů u kmene S12 potvrdily omezenou expresi *OmpK36* a žádnou expresi *OmpK35*. Transkript pro *OmpK36* se objevuje až ve čtvrté hodině růstové křivky a s nárůstem

koncentrace cefotaximu je jeho exprese postupně potlačována. Expresa *bla*_{DHA-1} narůstá až v pozdějších hodinách (3-4) a u vyšších koncentrací antibiotika (0,50-0,75 mg/l). Expresa *AmpR* je konstantní po celou dobu kultivace a je potlačována až ve čtvrté hodině a to pro všechny koncentrace antibiotika, včetně nulové.

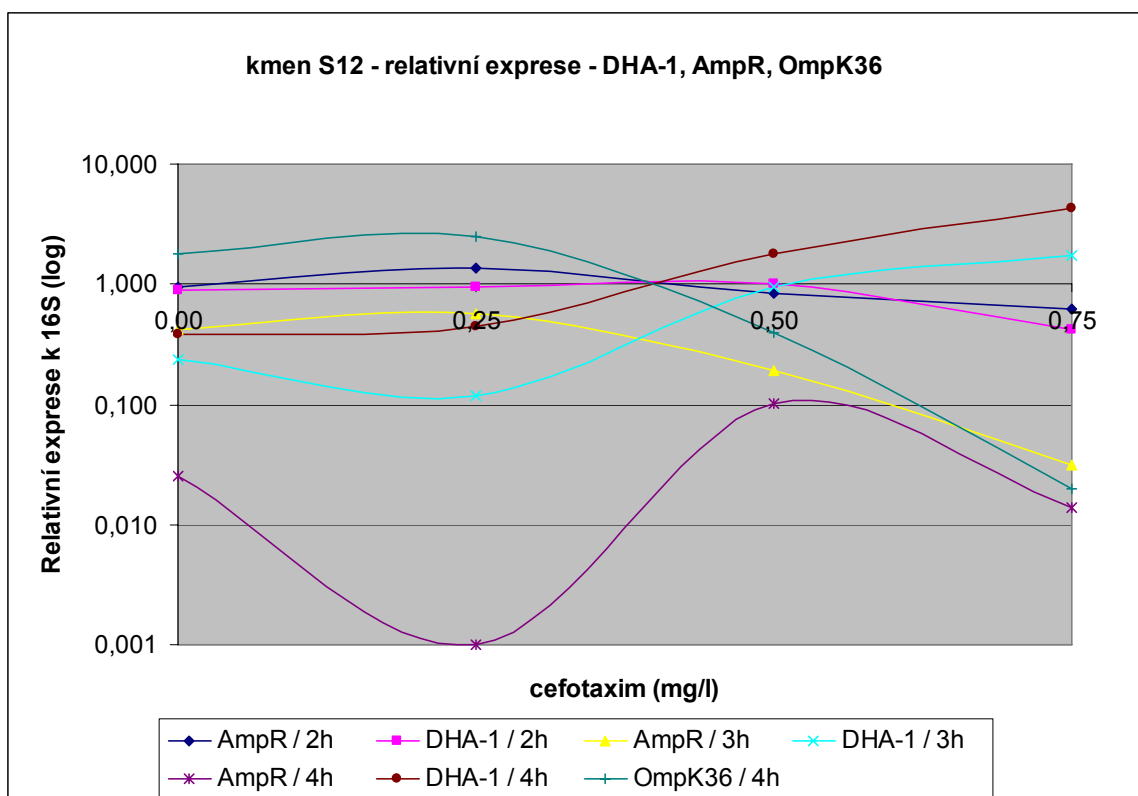
Podobná situace je viditelná u kmene S4. Ani jeden z porinových genů není exprimován po celý sledovaný časový interval a ani pro žádnou koncentraci antibiotika. Expresa *AmpR* je ve druhé hodině potlačována ve všech koncentracích antibiotika, postupně však s přibývajícím časem u nízkých koncentrací cefotaximu suprese zaniká a gen je konstantně exprimován. Ve čtvrté hodině je potlačení viditelné až u nejvyšší koncentrace (0,75 mg/l). Expresa *bla*_{DHA-1} je ve druhé a třetí hodině zvýšena až při větší koncentraci cefotaximu (0,75 mg/l). Ve čtvrté hodině začíná být v nízkých koncentracích antibiotika exprese potlačována, v nejvyšší koncentraci cefotaximu stále přetrvává zvýšená exprese.

Kmen I371 se chová odlišně od kmenů S4 a S12. Na první pohled se liší absencí exprese *AmpR*, která chybí v celém sledovaném spektru kultivace. Expresa *bla*_{DHA-1} je od druhé hodiny zvýšená, pouze pro vyšší koncentrace antibiotika není zvýšena. Vůbec nejvyšší exprese jsou pozorovány pro nejnižší koncentrace. S nárůstem času se zvyšuje i exprese a ve čtvrté hodině je exprese zvýšená pro všechny koncentrace cefotaximu. *OmpK35* je v prvních hodinách zvýšená u nízkých koncentrací, s nárůstem koncentrací cefotaximu přechází do normální exprese. Ve čtvrté hodině v nízkých koncentracích je taktéž normální exprese, se zvyšující se koncentrací dochází ke zvýšené expresi. Naopak exprese *OmpK36* je ve druhé hodině v nižších koncentracích potlačována, postupně s časem kultivace potlačení vymizí a zůstává pouze pro nejvyšší koncentraci cefotaximu.

Expresa kmenů S4 a S12 jsou si podobné i s ohledem na očekávané chování genů za přítomnosti antibiotika (JACOBY 2009), kmen I371 se chová naprosto odlišně. Získané výsledky jsou uvedeny v Tab. 11-14 a na Obr. 10-12.

sledovaný gen	2 hodina				3 hodina				4 hodina			
	koncentrace cefotaximu (mg/l)				koncentrace cefotaximu (mg/l)				koncentrace cefotaximu (mg/l)			
	0,00	0,25	0,50	0,75	0,00	0,25	0,50	0,75	0,00	0,25	0,50	0,75
16S	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
AmpR	0,956	1,350	0,851	0,630	0,423	0,574	0,194	0,031	0,025	0,001	0,101	0,014
DHA-1	0,892	0,955	1,000	0,416	0,236	0,119	0,955	1,741	0,387	0,445	1,782	4,287
OmpK35	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OmpK36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,765	2,520	0,397	0,020

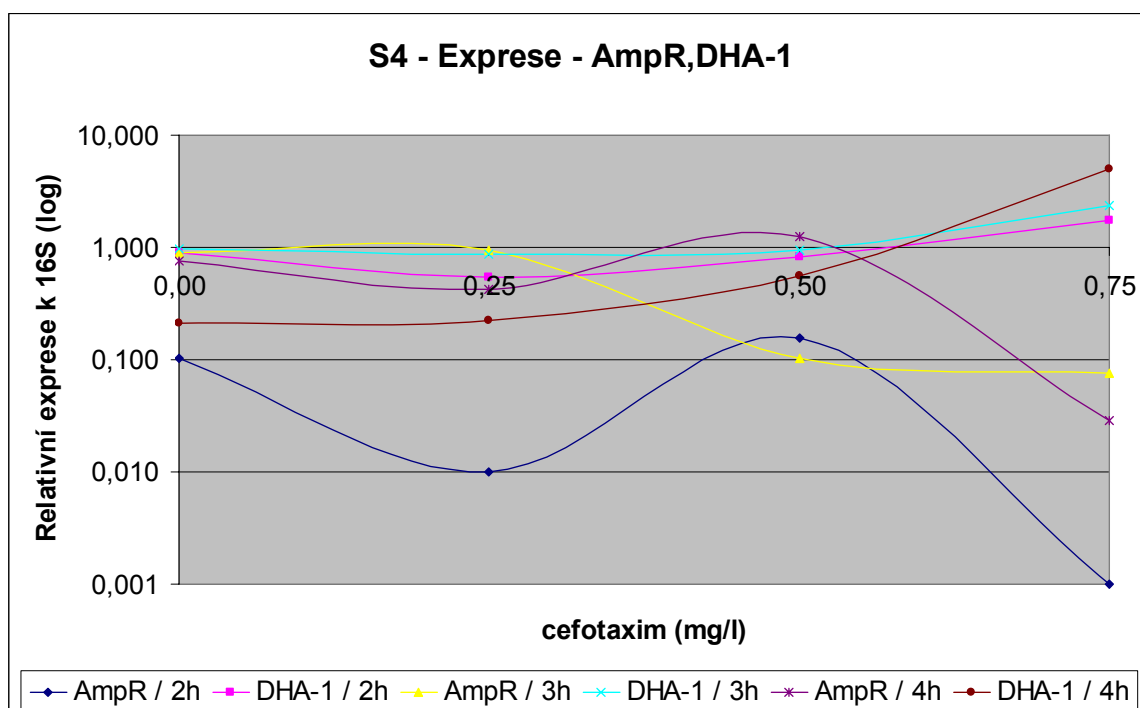
Tab. 11. Relativní exprese genů AmpR, DHA-1, OmpK35, OmpK36 u vzorků kmene S12 odebraných ve 2, 3 a 4 hodině růstové křivky. Hodnoty v řádcích u jednotlivých genů jsou hodnoty relativní exprese vztahované k 16S genu. ND – nedekovatelný signál.



Obr.10. Grafické znázornění relativní exprese exprimovaných genů kmene S12 ze vzorků odebraných ve 2,3 a 4 hodině růstové křivky. Relativní exprese je v logaritmickém měřítku.

sledovaný gen	2 hodina				3 hodina				4 hodina			
	koncentrace cefotaximu (mg/l)				koncentrace cefotaximu (mg/l)				koncentrace cefotaximu (mg/l)			
	0,00	0,25	0,50	0,75	0,00	0,25	0,50	0,75	0,00	0,25	0,50	0,75
16S	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
AmpR	0,102	0,010	0,157	0,000	0,897	0,956	0,102	0,076	0,756	0,425	1,235	0,029
DHA-1	0,892	0,536	0,831	1,726	0,972	0,877	0,941	2,352	0,212	0,223	0,561	5,040
OmpK35	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OmpK36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

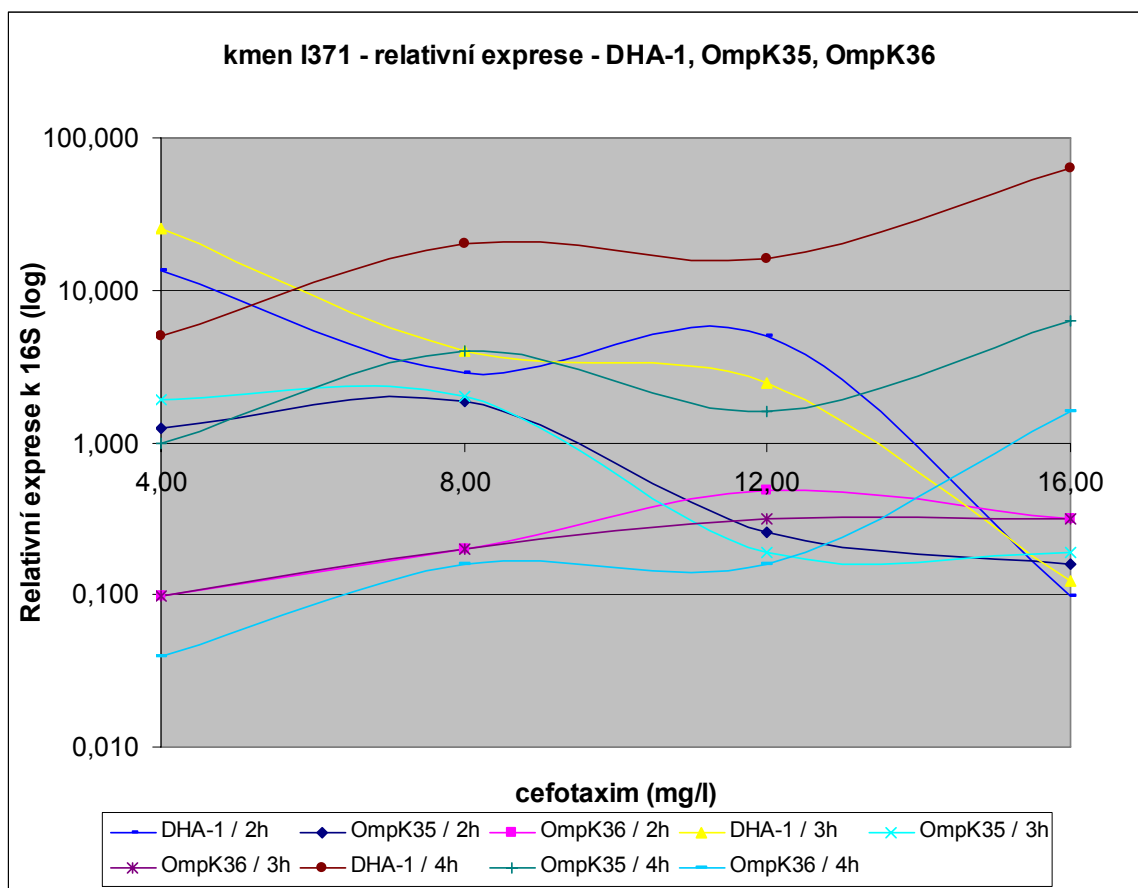
Tab. 12. Relativní exprese genů AmpR, DHA-1, OmpK35, OmpK36 u vzorků kmene S4 odebraných ve 2, 3.5 a 4 hodině růstové křivky. Hodnoty v řádcích u jednotlivých genů jsou hodnoty relativní exprese vztahované k 16S genu. ND – nedekovatelný signál.



Obr. 11. Grafické znázornění relativní exprese exprimovaných genů kmene S4 ze vzorků odebraných ve 2,3 a 4 hodině růstové křivky. Relativní exprese je v logaritmickém měřítku.

sledovaný gen	2 hodina				3 hodina				4 hodina			
	koncentrace cefotaximu (mg/l)				koncentrace cefotaximu (mg/l)				koncentrace cefotaximu (mg/l)			
	4,00	8,00	12,00	16,00	4,00	8,00	12,00	16,00	4,00	8,00	12,00	16,00
16S	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
AmpR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DHA-1	13,620	2,860	5,040	0,099	25,398	4,000	2,470	0,123	5,040	20,159	16,000	64,000
OmpK35	1,254	1,876	0,257	0,158	1,897	1,994	0,189	0,189	1,000	4,000	1,587	6,350
OmpK36	0,099	0,198	0,489	0,315	0,099	0,198	0,315	0,315	0,039	0,157	0,157	1,587

Tab. 13. Relativní exprese genů AmpR, DHA-1, OmpK35, OmpK36 u vzorků kmene I371 odebraných ve 2, 3 a 4 hodině růstové křivky. Hodnoty v řádcích u jednotlivých genů jsou hodnoty relativní exprese vztážené k 16S genu. ND – nedekovatelný signál.



Obr. 12. Grafické znázornění relativní exprese exprimovaných genů kmene I371 ze vzorků odebraných ve 2,3 a 4 hodině růstové křivky. Relativní exprese je v logaritmickém měřítku.

Genová exprese	Kmen	I371				
		Čas (h)	Koncentrace CTX (µg/ml)			
			4,00	8,00	12,00	16,00
AmpR	2	ND	ND	ND	ND	
	3	ND	ND	ND	ND	
	4	ND	ND	ND	ND	
DHA-1	2	↑	↑	0	0	
	3	↑	↑	↑	0	
	4	↑	↑	↑	↑	
OmpK35	2	↑	↑	0	0	
	3	↑	↑	0	0	
	4	0	↑	↑	↑	
OmpK36	2	↓	↓	↓	0	
	3	0	0	0	↓	
	4	0	0	0	↓	
		S12				
		Koncentrace CTX (µg/ml)				
		0,00	0,25	0,50	0,75	
AmpR	2	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	
	4	↓	↓	↓	↓	
DHA-1	2	0	0	0	0	
	3	0	0	0	↑	
	4	0	0	↑	↑	
OmpK35	2	ND	ND	ND	ND	
	3	ND	ND	ND	ND	
	4	ND	ND	ND	ND	
OmpK36	2	ND	ND	ND	ND	
	3	ND	ND	ND	ND	
	4	0	0	↓	↓	
		S4				
		Koncentrace CTX (µg/ml)				
		0,00	0,25	0,50	0,75	
AmpR	2	↓	↓	↓	↓	
	3	0	0	↓	↓	
	4	0	0	0	↓	
DHA-1	2	0	0	0	↑	
	3	0	0	0	↑	
	4	↓	↓	0	↑	
OmpK35	2	ND	ND	ND	ND	
	3	ND	ND	ND	ND	
	4	ND	ND	ND	ND	
OmpK36	2	ND	ND	ND	ND	
	3	ND	ND	ND	ND	
	4	ND	ND	ND	ND	

Tab. 14. Tabulka exprimovaných genů s vyhodnocením dle interpretačních kritérií dle REST 2009. Symboly: “↓” – potlačená exprese, “↑” – zvýšená exprese, “0” – exprese beze změny, “ND” – nedekovatelný signál, CTX - cefotaxim

3.4 Produkce DHA-1 ovlivněná cefoxitinem

Cíl: Ověřit produkci DHA-1 u všech kmenů při přidání cefoxitinu jako induktoru DHA-1

S ohledem na rozdílné a neočekávané výsledky exprese genů *AmpR* a *bla_{DHA-1}* byl proveden pokus, ve kterém jsme se snažili ověřit chování uvedených genů za přidání cefoxitinu. Z Tab. 15 je zjevné, že po přidání cefoxitinu jsou produkovány oba genové produkty v podobě *AmpR* a *DHA-1*. Exprese *AmpR* je konstantní, ale exprese *bla_{DHA-1}* zjevně po přidání cefoxitinu narůstá. U kmene I371 je po přidání cefoxitinu podstatně vyšší nárůst exprese *bla_{DHA-1}* oproti kmenům S4 a S12. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 15.

Čas (h)	I371		I371 + FOX	
	DHA-1	AmpR	DHA-1	AmpR
1	2,95	3,28	3,85	3,60
2	3,03	3,21	2,19	3,53
3	2,91	3,22	2,49	3,45
Čas (h)	S12		S12 + FOX	
	DHA-1	AmpR	DHA-1	AmpR
1	4,42	3,74	4,28	3,40
2	3,76	3,46	2,23	2,87
3	4,46	3,30	1,94	2,93
Čas (h)	S4		S4 + FOX	
	DHA-1	AmpR	DHA-1	AmpR
1	3,82	2,56	3,65	3,07
2	3,31	2,63	1,90	3,07
3	3,19	2,53	2,82	3,35

Tab. 15. Exprese DHA-1 a AmpR sledovaná s přidáním cefoxitinu jako induktoru exprese (cefoxitin byl přidán po 1 hodině kultivace do konečné koncentrace 100 mg/l). Uvedené exprese jsou relativní exprese vůči 16S a čas je uveden od počátku kultivace.

3.5 Transformace plazmidů

Cíl: Ověřit lokalizaci genu DHA-1 a souvisejících regulačních elementů na plazmidech a jejich expresi

Pro transformaci plazmidů byly použity klinické izoláty z FN Plzeň s označením I784, I785 a I877. Výsledky exprese u transformovaných kmenů jsou uvedeny v Tab. 16. Kmeny S4 a S12 potvrzují sníženou expresi DHA-1 po přidání cefoxitinu, u kmene I371 je produkce naopak mírně zvýšená. Kmen se v návaznosti na předchozí měření s přidáním cefoxitinem chová poněkud rozdílně, než je tomu u S4 a S12. Získaná data u transformantů I784/S4 a I785/I371 (č. recipienta/č. kmene od něhož byly získány plazmidy) ukazují na zvýšenou expresi DHA-1, u transformovaných kmenů I785/S4, I877/S12 je naopak znatelný pokles produkce DHA-1. Plazmidy transformované z kmene I371 ukazují na atypické chování, proto lze předpokládat zapojení dalších faktorů v regulačním mechanismu exprese bla_{DHA-1} a odlišné chování v různých klonech.

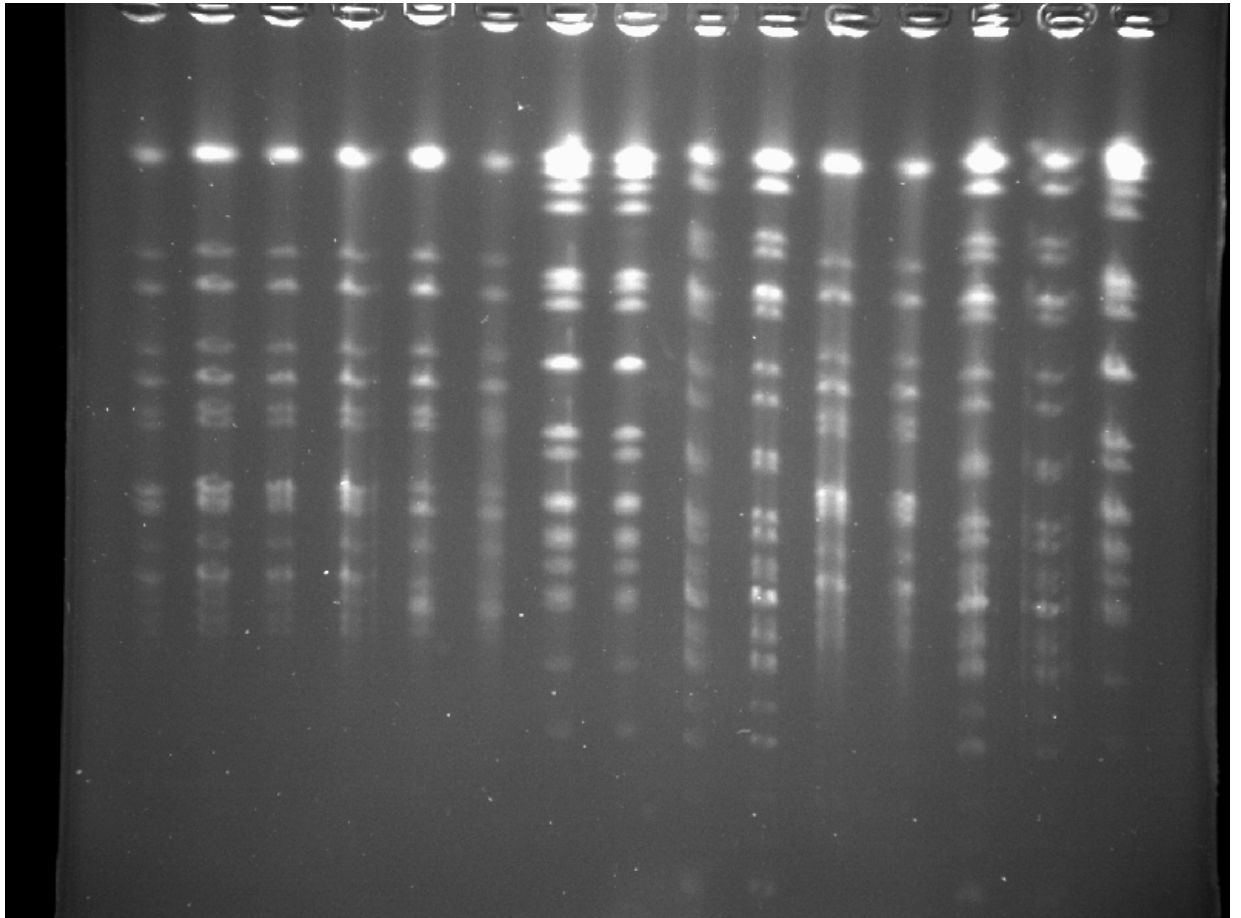
Čas (h)	1	3
Kmen/Transformant	bla_{DHA-1}	bla_{DHA-1}
S4	6,38	3,51
S12	5,65	3,43
I371	4,01	5,53
I784/S4	5,60	7,89
I785/I371	ND	7,02
I785/S4	4,93	3,86
I877/S12	6,98	3,58
S4 kontrola *	6,45	8,12

*Tab. 16. Transformace plazmidů. Exprese je relativní k 16S and * představuje kontrolu bez cefoxitinu (FOX). Transformant – kmen od něhož byly získány plazmidy.*

3.6 Pulzní gelová elektroforéza

Cíl: Typizace kmenů, použitých v experimentech

Typizace pulzní gelovou elektroforézou byla provedena s transformanty I785/S12, I877/S12, I785/S4, I877/S4, I784/S4, I785/I371, I784/I371, I877/I371. Získané výsledky jsou uvedeny na Obr. 13. Vyhodnocení bylo provedeno na základě kritérií dle TENOVERA *et al.*(1995).



Obr. 13. Pulzní gelová elektroforéza provedená s transformanty (pořadí uvedeno zleva) I785/S12, I785/S12/A, I785/I371/A, I785/S4/A, I785/I371, I785/S4, I877/S12, I877/S12/A, I877/S4, I877/S4/A, I784/S4, I784/S4/A, I784/I371, I784/I371/A, I877/I371.

3.7 Typizace kmenů metodou multilokusové sekvenační typizace

Cíl: Typizace izolátů použitých v experimentech

Typizace metodou multilokusové sekvenační typizace (MLST) byla provedena na základě získaných sekvencí. Sekvenovány byla izoláty I784, I785, I877. Získané sekvence byly analyzovány v programu BIOEDIT a porovnány s profilovou databází na www.pasteur.fr. Na základě získaných alelických profilů byl určen kmen. V Tab. 17 jsou uvedeny jednotlivé alely, na základě kterých byl kmen typizován.

Izolát	I785	I784	I877
Alela	Typ	Typ	Typ
<i>gapA</i>	3	3	4
<i>infB</i>	3	1	1
<i>mdh</i>	1	13	1
<i>pgi</i>	1	34	1
<i>phoE</i>	1	63	1
<i>rpoB</i>	1	1	5
<i>tonB</i>	4	64	6
Kmen	ST11	ST461	ST8

Tab. 17. Přehled alel a určených kmenů pro jednotlivé izoláty I785, I784, I877.

4 Diskuze

Diplomová práce navazuje na práci výzkumné skupiny Ing. Jaroslava Hrabáka, Ph.D. a na již publikované práce týkající se izolátů *Klebsiella pneumoniae* z klinických vzorků (CHUDÁČKOVÁ *et al.* 2010, HRABÁK *et al.* 2009). Rozšíření rezistentních kmenů *Klebsiella pneumoniae* je vážný problém pro současnou medicínu, který je často zmiňován v mnoha publikacích týkajících se této problematiky. Vysoký stupeň rezistence vůči antibiotikům u těchto kmenů, včetně rezistence ke karbapenemům, byl již popsán i v České republice (CHUDÁČKOVÁ *et al.*, 2010). Tato práce charakterizuje vybrané klinické izoláty v detailech a se zaměřením na vztah efektu velikosti inokula a exprimovaných genů, které se podílejí na rezistenci. Zároveň jsme se pokusili ověřit již dříve popsáný mechanismus regulace (HANSON *et al.* 1999) v expresi *bla*_{DHA-1} v různých izolátech *Klebsiella pneumoniae*. Důvodem byla především zvýšená rezistence jednotlivých kmenů a vzájemně rozdílné fenotypové chování vůči jednotlivým antibiotikům.

V České republice je rozšíření kmenů *Klebsiella pneumoniae* produkujících DHA-1 β -laktamázy AmpC velmi významné a je téměř srovnatelné s výskytem β -laktamáz s rozšířeným spektrem účinku (ESBL) (EMPEL *et al.* 2010, HRABÁK, ŽEMLIČKOVÁ nepublikovaná data). Všechny tyto izoláty však náležely k jedinému sekvenčnímu typu ST11, který náleží k epidemicky úspěšnému, mezinárodně rozšířenému klonálnímu komplexu CC11 (DAMJANOVÁ *et al.* 2008). Dosud publikovaná data ukazují značnou rozdílnost v rezistenci k β -laktamům i v rámci tohoto klonu. Přestože se v těchto izolátech nepodařilo identifikovat inkompatibilní skupiny plazmidů kódujících *bla*_{DHA-1} s pomocí PCR metod dle CARATOLLI *et al.* (2005), u všech izolátů se jednalo o plazmidy shodné velikosti. Proto bylo naším cílem zjistit chování těchto kmenů u různých klonů *K. pneumoniae* náležející k divoké populaci určených jako ST461, ST11 (s jiným PFGE profilem než mají testovaní DHA-1producenti) a ST8. Zde se ukázal náš předpoklad, že exprese genu *bla*_{DHA-1} v různých klonech je odlišná. Z toho vyplývá velmi obtížná unifikace interpretačních kritérií pro kmeny produkující získanou

AmpC s ohledem na odlišné chování. Tyto výsledky rovněž naznačují podíl dalších faktorů na expresi *bla*_{DHA-1}.

Jak již bylo uvedeno, v České republice pocházejí producenti DHA-1 β -laktamáz u *Klebsiella pneumoniae* z jednoho mezinárodně rozšířeného kmene ST11 (EMPEL *et al.* 2010). Proto jsme se zaměřili na testování rezistence vzorků, u nichž byla provedena transformace plazmidů do různých divokých (wild-type) kmenů s typickými profily rezistence (produkce enzymu SHV-1). Výsledky ukazují, že transformanty, které získaly plazmid z izolátu I371, se chovají jinak, než transformanty s plazmidy z izolátů S4, S12. Podobně rozdílné je chování i v expresi *OmpK35* a *OmpK36*. Exprese uvedených genů je u izolátů S4 a S12 nedetekovatelná, případně je významně potlačena a projevuje se velmi málo, navíc až po delší časové odezvě při působení antibiotika. Kmen I371 vykazuje i interně odlišné chování indukce mezi *OmpK35* a *OmpK36*, kdy *OmpK35* je pozitivně regulován s délkou účinku a zvyšující se koncentrací antibiotika, *OmpK36* je v prvních hodinách regulován negativně a tento účinek se projevuje i při vyšší koncentraci antibiotika. Tato skutečnost je zajímavá s ohledem na to, že se předpokládá významný podíl *OmpK35* a *OmpK36* na transportu β -laktamů do periplasmového prostoru buňky. Kmeny S4 a S12 však vykazovaly vyšší citlivost k cefalosporinům III. a IV. generace než klon I371.

Klíčovým zjištěním je pak naprosto odlišná a nečekaná nedetekovatelná produkce AmpR v přítomnosti cefotaximu a pozitivně regulovaná produkce DHA-1 rostoucí s časem i koncentrací antibiotika. Toto zjištění ukazuje, že doposud popisovaný regulační mechanismus negativní regulace AmpR vůči DHA-1 (HANSON *et al.* 1999, LINDBERG *et al.* 1985) není zcela jednoznačný a regulační dráha má pravděpodobně více regulačních míst. Je možné, že se na expresi podílí jiné uspořádání genů *AmpC*, zodpovědných za produkci DHA-1 a AmpR.

Není bez zajímavosti, že průběh růstové křivky s cefotaximem je pro sledované kmeny odlišný. Růstová křivka kmene I371 má mezi 3. a 5. hodinou jiný průběh než kmen S4 a S12. Hledat přímou souvislost mezi růstovou křivkou s cefotaximem a expresí genů podílejících se na rezistenci samozřejmě bez dalších experimentálních prací nelze.

Účinek jiného antibiotika, cefoxitinu, vykazuje u tohoto kmene již dříve popsanou regulaci exprese, kdy přidání cefoxitinu zvyšuje expresi DHA-1 a nemá žádný efekt na produkci AmpR. Naměřená data, související s cefoxitinem, ale u kmene I371 ukazují na nižší negativní regulaci exprese, než je tomu u kmenů S4 a S12. Je samozřejmě otázkou, do jaké míry se na odpovědi k cefotaximu a srovnávaná antibiotika cefepimu, ceftazidimu, případně cefoxitinu podílejí u kmene I371 syntetizované poriny a do jaké míry produkce β -laktamázy. Je však velmi pravděpodobné, že regulační mechanismus *AmpC* genu, produkující dle HANSON *et al.* (1999) AmpG, AmpR a AmpD jako komponenty regulační dráhy pro expresi cefalosporináz, bude ovlivněn více faktory nebo se na produkci β -laktamáz podílejí i jiné regulační faktory, které mohou být ovlivněny účinkem vybraného antibiotika.

O získaných datech nás přesvědčuje i výsledek transformace plazmidů do jiných klonů diskutovaný výše, kdy, jak již bylo zmíněno, samotná exprese DHA-1 po přidání cefoxitinu je u kmene I371 vyšší na rozdíl od kmenů S4 a S12. Nedetekovatelná DHA-1 v transformantu I785/I371 vykazuje po přidání cefoxitinu a po dalších dvou hodinách inkubace poměrně vysokou expresi.

Námi získané výsledky popisují různorodé chování některých kmenů *Klebsiella pneumoniae* s různou odpovědí na různé typy a koncentrace antibiotik. Překvapivě i u dobře charakterizovaného kmene I371 se liší exprese produktů podílejících se na odpovědi na různá antibiotika. Otázkou zůstává, jaký systém regulace se zúčastňuje odpovědi na konkrétní antibiotikum a jak hodně se tyto odpovědi v závislosti na typu antibiotika liší. Znalost systému regulace odpovědi na různá antibiotika konkrétního kmene může být cestou ke správné volbě a správnému dávkování antibiotika a nastavení správných interpretačních kritérií.

5 Souhrn

Cílem diplomové práce bylo charakterizovat klinické izoláty *Klebsiella pneumoniae* molekulárně-genetickými metodami, stanovit pro definovaná antibiotika minimálních inhibiční koncentrace, zjistit závislosti minimálních inhibičních koncentrací a velikosti inokula u vybraných β -laktamů a zabývat se expresí hlavních porinů a β -laktamáz během různých fází letálního účinku.

Z výše uvedených cílů se podařilo všechny splnit, s tím že:

7) Molekulárně-genetické metody v podobě multilokusové sekvenční typizace (MLST) a pulzní gelové elektroforézy (PFGE) nám poskytly dobré výsledky, se kterými bylo možné pracovat při rozlišení jednotlivých kmenů a jejich zařazení. Obě metody jsou pracovně i finančně poměrně náročné, nicméně z pohledu možností typizace *Klebsiella pneumoniae* se jedná o standard, který umožňuje kmeny velmi spolehlivě určit.

8) Stanovení minimálních inhibičních koncentrací bylo provedeno doporučeným postupem (EUCAST, 2009) a jeho výsledky korelují s ostatními výsledky, získanými v jiných metodách. U interpretace výsledků a pro sledování exprese porinů a β -laktamáz jsou minimální inhibiční koncentrace klíčovou informací pro definici podmínek, za kterých se metody provádí.

9) Velikost inokula se ukázala jako velmi důležitá informace, přičemž samotné provedení metody není náročné a pro získání výsledků je metoda velmi dobře použitelná a má dobrou reprodukovatelnost. Z výsledků je zřejmé, že velikost inokula hraje významnou roli při stanovení minimálních inhibičních koncentrací a že dávkování antibiotika má na *Klebsiella pneumoniae* významný vliv.

10) Stanovení exprese porinů a β -laktamáz se oproti původnímu záměru stalo stěžejní metodou v rámci celé diplomové práce. Díky velmi zajímavým výsledkům, které otevřely několik hypotéz, byla metoda rozšířena na sledování exprese β -laktamázy DHA-1 ovlivněné cefoxitinem a na sledování exprese β -laktamázy DHA-1 po transformaci plazmidů. Při sledování expresních profilů bylo získáno velké množství dat, které bude možné využít v dalším studiu klinických izolátů *Klebsiella pneumoniae*.

Diplomová práce díky velmi zajímavým výsledkům nejenom splnila definované cíle, ale také otevřela další otázky a témata, která nejsou doposud v publikacích zmiňována a která do jisté míry popírají doposud publikované poznatky. Získané výsledky otvírají další možnosti studia této problematiky.

6 Literatura

1. Abraham, E. P., Chain, E. (1940): An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146:837.
2. Albertí, S., Marqués, G., Camprubi, S., Merino, S., Tomás, J. M., Vivanco, F., Benedí, V. J. (1993): C1q binding and activation of the complement classical pathway by *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins. *Infect Immun.* 61:852–860
3. Ambler, R.P. (1980): The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 289(1036):321-31.
4. Baron, E.J., Baron, S. (1996): Classification. Source *Medical Microbiology*. 4th edition. Chapter 3. Galveston University of Texas Medical Branch at Galveston.
5. Bauernfeind, A., Rosenthal, E., Eberlein, E., Holley, M., Schweighart, S. (1993): Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta-lactamase among hospitalized patients. *Infection* 21: 18-22.
6. Bennett, C. J., Young, M. N., Darrington, H. (1995): Differences in urinary tract infection in male and female spinal cord injury patients on intermittent catheterization. *Paraplegia* 33: 69-72.
7. Bidet, P., Burghoffer, B., Gautier, V., Brahimi, N., *et al.* (2005): In vivo transfer of plasmid-encoded ACC-1 AmpC from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in an infant and selection of impermeability to imipenem in *K. pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3562-3565.
8. Bolla, J.M., Alibert-Franco, S., Handzlik, J., Chevalier, J., Mahamoud, A., Boyer, G., *et al.* (2011): Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. *FEBS Lett.* 585(11):1682-90.
9. Bou, G., Martínez-Beltrán, J. (2000): Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:428-32.
10. Bradford, P.A., Urban, C., Mariano, N., Projan, S.J., Rahal, J.J., Bush, K. (1997): Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the

- foss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(3):563-9.
11. Burwen, D.R., Banerjee, S.N., Gaynes, R.P. (1994): Ceftazidime resistance among selected nosocomial gram-negative bacilli in the United States. *J. Infect. Dis.* 170: 1622-1625.
 12. Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A. (1995): A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(6):1211-33.
 13. Bush, K., Macalintal, C., Rasmussen, B.A., Lee, V.J., Yang, Y. (1993): Kinetic interactions of tazobactam with beta-lactamases from all major structural classes. *Antimicrob Agents Chemother.* 37(4):851-8.
 14. Carattoli, A., Tosini, F., Giles, W.P., Rupp, M.E., Hinrichs, S.H., *et al.* (2002): Characterization of plasmids carrying CMY-2 from expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strains isolated in the United States between 1996 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(5):1269-72.
 15. Carattoli, A. (2001): Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res.* 2001 32(3-4):243-59.
 16. Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L., Threlfall, E.J. (2005): Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 63(3):219-28.
 17. Clark, N.C., Weigel, L.M., Patel, J.B., Tenover, F.C. (2005): Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Michigan and Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(1): 470-2.
 18. Coovadia, Y. M., Johnson, A. P., Bhana, R. H., Hutchinson, G. R., George, R. C., Hafferjee I. E. (1992): Multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal nursery: the importance of maintenance of infection control policies and procedures in the prevention of outbreaks. *J. Hosp. Infect.* 22: 197-205.
 19. Coque, T.M., Novais, A., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., *et al.* (2008): Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. Nordmann P. *Emerg Infect Dis.* 14(2):195-200.

20. da Fonseca, É.L., dos Santos Freitas, F., Vicente, A.C. (2011): Pc promoter from class 2 integrons and the cassette transcription pattern it evokes. *J Antimicrob Chemother.* 66(4):797-801
21. Damjanova I, Tóth A, Pászti J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, Berta J, Milch H, Füzi M. (2008): Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSA's'? *J Antimicrob Chemother.* 62(5):978-85.
22. Davin-Regli, A., Bolla, J.M., James, C.E., Lavigne, J.P., Chevalier, J., Garnotel, E., *et al.* (2008): Membrane Permeability and Regulation of Drug "Influx and Efflux" in Enterobacterial Pathogens. *Current Drug Targets* 9: 750-759.
23. De Stasio, E.A., Moazed, D., Noller, H.F., Dahlberg, A.E. (2004): Mutations in 16S ribosomal RNA disrupt antibiotic-RNA interactions. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(4): 1347–1349.
24. Delcour, A.H. (1997): Function and modulation of bacterial porins: insights from electrophysiology. *FEMS Microbiol Lett.* 151(2):115-23.
25. Delcour, A.H. (2009): Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta.* 1794(5):808-16
26. Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P.A., Brisse S. (2005): Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol.* 43(8):4178-82.
27. Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Hernández-Allés, S., del Carmen Conejo, M., Pascual, A., Tomás, J.M., *et al.* (2003): Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(10):3332-5.
28. Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., Jarlier, V. (2008): Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clin. Microbiol. Infect.* 14(1): 90-103.
29. Empel, J., Hrabák, J., Kozińska, A., Bergerová, T., Urbášková, P., Kern-Zdanowicz, I., Gniadkowski, M. (2010): DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in the Czech Republic. *Microb Drug Resist.* 16:291-5.

30. Eriksson-Grennberg, K.G., Boman, H.G., Jansson, J.A., Thorén, S. (1965): Resistance of *Escherichia coli* to Penicillins I. Genetic Study of Some Ampicillin-Resistant Mutants. *J Bacteriol.* 90(1):54-62.
31. Espin, G., Alvarez-Morales, A., Merrick, M. (1981): Complementation analysis of *glnA*-linked mutations which affect nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*. *Mol Gen Genet.* 184(2): 213-7.
32. Fader, R. C., Davis, C.P. (1980): Effect of piliation on *Klebsiella pneumoniae* infection in rat bladders. *Infect. Immun.* 30: 554-561.
33. Feller, G., Zekhnini, Z., Lamotte-Brasseur, J., Gerday, C. (1997): Enzymes from cold-adapted microorganisms. The class C beta-lactamase from the antarctic psychrophile *Psychrobacter immobilis* A5. *Eur J Biochem.* 15;244(1):186-91.
34. Fluit, A.C., Schmitz, F.J. (2004): Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect.* 10:272-88.
35. Fournet-Fayard, S., Joly, B., Forestier, C. (1995): Transformation of wild type *Klebsiella pneumoniae* with plasmid DNA by electroporation. *Journal of Microbiological Methods* 24: 49-54.
36. Friedlander, C. (1882): Uber die scizomyceten bei der acuten fibrosen pneumonie. *Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 87: 319-24.
37. Garcillán-Barcia, M.P., Francia, M.V., de la Cruz, F. (2009): The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev.* 33(3):657-87.
38. Garza-Ramos, U., Davila, G., Gonzalez, V., Alpuche-Aranda, C., López-Collada, V.R., Alcantar-Curiel, D., *et al.* (2009): The *bla_{SHV-5}* gene is encoded in a compound transposon duplicated in tandem in *Enterobacter cloacae*. *Clin Microbiol Infect.* 15(9): 878-80.
39. Gavini, F., Izard, D., Grimont, P. A. D., Beji, A., Ageron, E., Leclerc, H. (1986): Priority of *Klebsiella planticola* Bagley, Seidler, and Brenner 1982 over *Klebsiella trevisanii* Ferragut, Izard, Gavini, Kersters, DeLey, and Leclerc 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 486-488.
40. Girlich, D., Naas, T., Bellais, S., Poirel, L., Karim, A., Nordmann, P. (2000): Biochemical-genetic characterization and regulation of expression of an ACC-1-like chromosome-borne cephalosporinase from *Hafnia alvei*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(6):1470-8.

41. Gotoff, S. P., Krugman, S., Katz, S. L., Gershon, A. A., Wilfert, C. M. (1992): Sepsis in the newborn. *Infectious diseases of children*, Year Book, 402-418.
42. Halling, S.M., Jensen, A.E. (2006): Intrinsic and selected resistance to antibiotics binding the ribosome: analyses of *Brucella* 23S rrn, L4, L22, EF-Tu1, EF-Tu2, efflux and phylogenetic implications. *BMC Microbiol.* 2(6): 84.
43. Hanson, N.D., Sanders, C.C. (1999): Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among *Enterobacteriaceae*. *Curr Pharm Des*, 5(11), 881-94.
44. Hart, C. A. (1993): *Klebsiellae* and neonates. *J. Hosp. Infect.* 23: 83-86.
45. Henderson, T.A., Young, K.D., Denome, S.A., Elf, P.K. (1997): AmpC and AmpH, proteins related to the class C beta-lactamases, bind penicillin and contribute to the normal morphology of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 179(19):6112-21.
46. Henrichfreise, B., Wiegand, I., Pfister, W., Wiedemann, B. (2007): Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(11): 4062-70.
47. Hernández-Allés, S., Albertí, S., Alvarez, D., Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Gil, J. ,*et al.* (1999): Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*.
48. Hibbertrogers, L.C.F., Heritage, J., Gascoynebinzi, D. M., Hawkey, P. M., Todd, N., Lewis I. J., Bailey, C. (1995): Molecular epidemiology of ceftazidime resistant *Enterobacteriaceae* from patients on a paediatric oncology ward. *J. Antimicrob. Chemother.* 36: 65-82.
49. Holst O., Seltmann G. (2005): *The Bacterial Cell Wall*. Berlin : Springer. ISBN 3-540-42608-6.
50. Honoré, N., Nicolas, M.H., Cole, S.T. (1986): Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. *EMBO J.* 20:3709-14.
51. Hrabák, J. (2007): Clinically important beta-lactamases of gram-negative bacteria: AmpC. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 56(4):155-65.

52. Hrabák, J. (2007): Clinically important beta-lactamases of gram-negative bacteria: extended-spectrum beta-lactamases (ESBL). *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 56(3):103-11.
53. Hrabák, J., Empel, J., Bergerová, T., Fajfrlík, K., Urbášková, P., Kern-Zdanowicz, I., *et al.* (2009): International clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases in a Czech hospital. *J Clin Microbiol.* 47(10):3353-7.
54. Hrabák, J., Chudáčková, E. (2008): Carbapenem resistance in enterobacteria. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 57(4):125-36.
55. Hrabák, J., Zemanová, A., Chudáčková, E. (2010): Mobile genetic elements in the epidemiology of bacterial resistance to antibiotics. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 59(2):55-66.
56. Hrabák, J., Žemličková, H., Bergerová, T., Urbášková, P. (2011): Interpretation of the susceptibility test results in enterobacteria producing 3rd- and 4th-generation cephalosporin- or carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 60(1):4-9.
57. Hsueh, C.T., Chin, J.C., Yu, Y.Y., Chen, H.C., Li, W.C., Shen, M.C., *et al.* (1977): Genetic analysis of the nitrogen fixation system in *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Sin.* 20(6): 807-17.
58. Huang, H., Gong, C.S., Tsao, G.T. (2002): Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Biochem Biotechnol.* 98-100: 687-98.
59. Chen, Y., Minasov, G., Roth, T.A., Prati, F., Shoichet, B.K. (2006): The deacylation mechanism of AmpC beta-lactamase at ultrahigh resolution. *J Am Chem Soc.* 128(9):2970-6.
60. Christensen, S. C., Korner, B. (1972): An endemic caused by multiresistant *Klebsiella* in an urological unit. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 6: 232-238
61. Chudáčková, E., Bergerová, T., Fajfrlík, K., Cervená, D., Urbášková, P., Empel, J., Gniadkowski, M., Hrabák, J. (2010): Carbapenem-nonsusceptible strains of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 and/or DHA-1 beta-lactamases in a Czech hospital. *FEMS Microbiol Lett.* 1;309(1):62-70.
62. Jacoby, G. A. (1996): Antimicrobial-resistant pathogens in the 1990s. *Annu. Rev. Med.* 47: 169-179.
63. Jacoby, G.A. (2009): AmpC β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 22(1): 161–182.

64. Jacoby, G.A., Mills, D.M., Chow, N. (2004): Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(8):3203-6.
65. Jaurin, B., Grundström, T. (1981): ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci.* 78(8):4897-901.
66. Kabha, K., Schmegner, J., Keisari, Y., Parolis, H., Schlepper-Schaefer, J., Ofek, I. (1997): SP-A enhances phagocytosis of *Klebsiella* by interaction with capsular polysaccharides and alveolar macrophages. *Am. J. Physiol.* 272: 344-352.
67. Kaneko, K., Okamoto, R., Nakano, R., Kawakami, S., Inoue, M. (2005): Gene mutations responsible for overexpression of AmpC beta-lactamase in some clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *J Clin Microbiol.* 43(6):2955-8.
68. Kang, Ch.-I., Pai, H., Kim, S.-H., Kim, H.-B., *et al.* (2004): Cefepime and the inoculum effect in tests with *Klebsiella pneumoniae* producing plasmid-mediated AmpC-type β -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.*, 54, 1130-1133.
69. Kaye, K.S., Gold, H.S., Schwaber, M.J., Venkataraman, L., Qi, Y., De Girolami, P.C. *et al.* (2004): Variety of beta-lactamases produced by amoxicillin-clavulanate-resistant *Escherichia coli* isolated in the northeastern United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(5):1520-5.
70. Kazmierczak, A., Cordin, X., Duez, J. M., Siebor, E. , Pechinot, A., Sirot., J. (1990): Differences between clavulanic acid and sulbactam in induction and inhibition of cephalosporinases in enterobacteria. *J. Int. Med. Res.* 18:67D-77D.
71. Klein, D. W., Prescott, L.M., Harley, J. (2005): *Microbiology*. Boston: McGraw-Hill Higher Education. ISBN 0-07-295175-3.
72. Koebnik, R., Locher, K.P., Van Gelder, P. (2000): Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol.* 37(2):239-53.
73. Kovalevskaia, N.P. (2002): Mobile gene cassettes and DNA integration elements. *Mol Biol (Mosk).* 36(2):261-7.

74. Lartigue, M.F., Poirel, L., Aubert, D., Nordmann, P. (2006): In vitro analysis of /SEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring beta-lactamase gene *bla*_{CTX-M} of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(4): 1282-6.
75. Liebert, C.A., Hall, R.M., Summers, A.O. (1999): Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63(3): 507-22.
76. Lindberg, F., Westman, L., Normark, S. (1985): Regulatory components in *Citrobacter freundii* ampC beta-lactamase induction. *Proc Natl Acad Sci* 82(14): 4620-4.
77. Lindquist, S., Weston-Hafer, K., Schmidt, H., Pul, C., Korfmann, G., Erickson, J., *et al.* (1993): AmpG, a signal transducer in chromosomal beta-lactamase induction. *Mol Microbiol.* 9(4):703-15.
78. Linström, E.B., Boman, H.G., Steele, B.B. (1970): Resistance of *Escherichia coli* to penicillins. VI. Purification and characterization of the chromosomally mediated penicillinase present in ampA-containing strains. *J Bacteriol.* 101(1):218-31.
79. Lister, P.D., Gardner, V.M., Sanders CC. (1999): Clavulanate induces expression of the *Pseudomonas aeruginosa* AmpC cephalosporinase at physiologically relevant concentrations and antagonizes the antibacterial activity of ticarcillin. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(4):882-9.
80. Livermore, D.M., (1987): Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. *Eur J Clin Microbiol.*6(4):439-45.
81. Luzzaro, F. (2008): Fluoroquinolones and Gram-negative bacteria: antimicrobial activity and mechanisms of resistance. *Infez Med.*16 Suppl2:5-11.
82. Maayan, M. C., Ofek, I., Medalia, O., Aronson, M. (1985): Population shift in mannose-specific fimbriated phase of *Klebsiella pneumoniae* during experimental urinary tract infection in mice. *Infect. Immun.* 49: 785-789.
83. Mahillon, J., Chandler, M. (1998): Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(3): 725-74.
84. Mahlen, S.D., Morrow, S.S., Abdalhamid, B., Hanson, N.D. (2003): Analyses of ampC gene expression in *Serratia marcescens* reveal new regulatory properties. *J Antimicrob Chemother.* 51:791-802.
85. Mammeri, H., Poirel, L., Bemer, P., Drugeon, H., *et al.* (2004): Resistance to cefepime and ceftipime due to a 4-amino-acid deletion in the chromosome-

- encoded AmpC β -lactamase of a *Serratia marcescens* clinical isolate. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 716-720.
86. Mazel D. (2006): Integrons: agents of bacterial evolution. Nat Rev Microbiol. 4(8):608-20. Microbiology. 145:673-9.
87. Misyurina, O. Y., Chipitsyna, E.V., Finashutina, E.P., Lazarev, V.N., Akopian, T.A., Savicheva, A. M., Govorun, V.M. (2004): Mutations in a 23S rRNA Gene of *Chlamydia trachomatis* associated with resistance to macrolides. Antimicrob Agents Chemother. 48(4):1347-9.
88. Monnaie, D., Frere, J.M. (1993): Interaction of clavulanate with class C beta-lactamases. FEBS Lett. 334(3):269-71.
89. Naas, T., Mikami, Y., Imai, T., Poirel, L., Nordmann, P. (2001): Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. J Bacteriol. 183(1):235-49.
90. Nakae, T. (1976): Identification of the outer membrane protein of E. coli that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. Biochem Biophys Res Commun. 71(3):877-84.
91. Nakano, R., Okamoto, R., Nakano, Y., Kaneko, K., Okitsu, N., Hosaka, Y., Inoue, M. (2004): CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC beta-lactamase with an ampR gene originating from *Citrobacter freundii*. Antimicrob Agents Chemother. 48(4):1151-8.
92. Novais, A., Cantón, R., Valverde, A., Machado, E., Galán, J.C., Peixe, L., et al. (2006): Dissemination and persistence of *bla*_{CTX-M-9} are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1-alpha, and IncFI groups. Antimicrob Agents Chemother. 50(8): 2741-50.
93. Novick, R.P. (1987): Plasmid incompatibility. Microbiol Rev. 51(4): 381–395.
94. Ofek, I., Doyle, R. J. (1994): Bacterial adhesion to cells and tissues. Chapman & Hall, Ltd., London, United Kingdom.
95. Ofek, I., Kabha, K., Athamna, A., Frankel, G., Wozniak, D. J., Hasty, D. L., Ohman, D. E. (1993): Genetic exchange of determinants for capsular polysaccharide biosynthesis between *Klebsiella pneumoniae* strains expressing serotypes K2 and K21a. Infect. Immun. 61: 4208-4216.

96. Orskov, I., Orskov, F. (1984): Serotyping of *Klebsiella*. *Methods Microbiol.* 14: 143-164.
97. Pages, J.M., James, C.E., Winterhalter, M. (2008): The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 6(12):893-903.
98. Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L. (2002): Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 9: e36.
99. Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G.A. (2000): Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(1):1-11.
100. Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G.A. (2002): Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(1):1-11.
101. Podschun, R., Ullmann, U. (1992): *Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. *J. Med. Microbiol.* 36: 250-254.
102. Podschun, R., Ullmann, U. (1994): Incidence of *Klebsiella planticola* among clinical *Klebsiella* isolates. *Med. Microbiol. Lett.* 3:90-95.
103. Podschun, R., Ullmann, U. (1998): *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews* 11(4): 589-603.
104. Poirel, L., Lartigue, M.F., Decousser, J.W., Nordmann, P. (2005): ISEcp1B-mediated transposition of *bla*_{CTX-M} in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(1): 447-50.
105. Pollack, M., Niemann, R. E., Reinhardt, J. A., Charache, P., Jett, M. P., Hardy Jr., P. H. (1972): Factors influencing colonisation and antibiotic-resistance patterns of gram-negative bacteria in hospital patients. *Lancet II*: 668-671.
106. Power, P., Galleni, M., Ayala, J.A., Gutkind, G. (2006): Biochemical and molecular characterization of three new variants of AmpC beta-lactamases from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(3):962-7.
107. Powers, R.A., Caselli, E., Focia, P.J., Prati, F., Shoichet, B.K. (2001): Structures of ceftazidime and its transition-state analogue in complex with AmpC beta-lactamase: implications for resistance mutations and inhibitor design. *Biochemistry.* 40(31):9207-14.

108. Pratt, L.A., Hsing, W., Gibson, K.E., Silhavy, T.J. (1996): From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 20(5):911-7.
109. Ramdani-Bouguessa, N., Manageiro, V., Jones-Dias, D., Ferreira, E., Tazir, M., Caniça, M.J. (2011): Role of SHV beta-lactamase variants in resistance of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains to beta-lactams in an Algerian hospital. *Med Microbiol.* 60(7): 983-7.
110. Rayamajhi, N., Joo, J.C., Cha, S.B., Pokherl, S., Shin, M.K., Yoo, Y.J., Yoo, H.S. (2011): Enzymatic analysis of the effect of naturally occurring Leu138Pro mutation identified in SHV β -lactamase on hydrolysis of penicillin and ampicillin. *BMC Microbiol.* 11: 29.
111. Reisbig, M. D., Hossain, A., Hanson, N.D. (2003): Factors influencing gene expression and resistance for Gram-negative organisms expressing plasmid-encoded ampC genes of *Enterobacter*. *J Antimicrob Chemother.* 51(5): 1141-1151.
112. Reish, O., Ashkenazi, S., Naor, N., Samra, Z., Merlob, P. (1993): An outbreak of multiresistant *Klebsiella* in a neonatal intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 25: 287-291.
113. Roberts, A.P., Chandler, M., Courvalin, P., Guédon, G., Mullany, P., Pembroke, T., *et al.* (2008): Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid.* 60(3): 167-73.
114. Sallmann, F.R., Baveye-Descamps, S., Pattus, F., Salmon, V., Branza, N., Spik, G., Legrand, D. (1999): Porins OmpC and PhoE of *Escherichia coli* as specific cell-surface targets of human lactoferrin. Binding characteristics and biological effects. *J Biol Chem.* 274(23):16107-14.
115. Sander, P., Prammananan, T., Meier, A., Frischkorn, K., Böttger, E.C. (1997): The role of ribosomal RNAs in macrolide resistance. *Mol Microbiol.* 26(3): 469-80.
116. Sanders, C.C., Sanders, W.E. Jr. (1986): Type I beta-lactamases of gram-negative bacteria: interactions with beta-lactam antibiotics. *J Infect Dis.* 154(5):792-800.
117. Seifert, H., Wisplinghoff, H., Ewertz, B., Wisplinghoff, S., Stefanik, D., Plum, G., Perdreau-Remington, F. (2005): Molecular evolution of

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the metropolitan area of Cologne, Germany, from 1984 to 1998. *J Clin Microbiol.* 43:5445-51.
118. Schmidtke, A.J., Hanson, N.D. (2006): Model system to evaluate the effect of ampD mutations on AmpC-mediated beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(6):2030-7.
119. Schwartz, D.C., Cantor, C.R. (1984): Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 37(1): 67–75.
120. Simoons-Smit, A.M., Verweij-van Vught, J.J., MacLaren, D.M. (1984): Virulence of *Klebsiella* strains in experimentally induced skin lesions in the mouse. *J. Med. Microbiol.* 17: 67-77.
121. Singer, R.S., Finch, R., Wegener, H.C., Bywater, R., Walters, J., Lipsitch, M. (2003): Antibiotic resistance - the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infect Dis.* 3(1): 47-51.
122. Sirot, D. (1995): Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 36:19-34.
123. Smith, J.L., Fratamico, P.M. (2010): Fluoroquinolone resistance in campylobacter. *J Food Prot.* 73(6):1141-52.
124. Sohn, S.G., Lee, J.J., Song, J.S., Lee, J.H., Sun, H.I., Park, K.S., *et al.* (2009): Nomenclature of ISCRI elements capable of mobilizing antibiotic resistance genes present in complex class 1 integrons. *J Microbiol.* 47:514-6.
125. Takatsuka, Y., Chen, C., Nikaido, H. (2010): Mechanism of recognition of compounds of diverse structures by the multidrug efflux pump AcrB of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107(15): 6559-65.
126. Thomson, J.G., Cook, M., Guttman, M., Smith, J., Thilmony, R. (2011): Novel null binary vectors enable an inexpensive foliar selection method in *Arabidopsis*. *BMC Res Notes.* 4:44.
127. Toleman, M.A., Bennett, P.M., Walsh, T.R. (2006): *ISCR* elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev.* 70(2): 296-316.
128. Urbášková, P. (1998): Rezistence bakterií k antibiotikům. Vybrané metody. Praha, Trios.
129. Urwin, R., Maiden, M.C. (2003): Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* 11(10): 479–87.

130. Van de Sande-Bruinsma, N., Grundmann, H., Verloo, D., Tiemersma, E., Monen, J., Goossens, H., *et al.* (2008): Antimicrobial drug use and resistance in Europe. European Antimicrobial Resistance Surveillance System Group; European Surveillance of Antimicrobial Consumption Project Group. *Emerg Infect Dis.* 14(11): 1722-30.
131. Weber, D.A., Sanders, C.C. (1990): Diverse potential of beta-lactamase inhibitors to induce class I enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 34(1):156-8.
132. Weiss, M.S., Schulz, G.E. (1992): Structure of porin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol.* 227(2):493-509.
133. Williams, P., Smith, M. A., Stevenson, P., Griffiths, E., Tomas, J.M. (1989): Novel aerobactin receptor in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* 135: 3173-3181.
134. Williams, P., Tomas, J.M. (1990): The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. *Rev. Med. Microbiol.* 1: 196-204.
135. Yokochi, T., Nakashima, I., Kato, N. (1977): Effect of capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* on the differentiation and functional capacity of macrophages cultured in vitro. *Microbiol. Immunol.* 21: 601-610.