

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE**  
**KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE**



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

## **Jev rezistence bakterií na antibiotika**

Tomáš Bakal

Školitel: Doc. RNDr. Jaroslava Svobodová, CSc.

2008/2009

## Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat své školitelce, Doc. RNDr. Jaroslavě Svobodové, CSc., za pomoc při zpracování tématu bakalářské práce.

## Klíčová slova:

antibiotika, rezistence, MRSA, multirezistentní kmeny

## Keywords:

antibiotics, resistance, MRSA, multiresistant strains

## Abstrakt:

Antibiotika jsou chemické látky produkované různými druhy mikroorganismů (bakteriemi a houbami), které potlačují růst jiných mikroorganismů a zabíjejí je. Tyto sloučeniny jsou produkovány bakteriemi ve stacionární fázi růstu biosyntetickými dráhami sekundárního metabolismu. Dráhy sekundárního metabolismu jsou na rozdíl od metabolismu primárního mnohem rozmanitější, dokonce i v rámci téhož druhu; jsou příčinou variability chemických struktur i hmotností molekul antibiotik. Rychle vzrůstající rezistence mikrobů proti široké paletě antibiotik se stává závažným celosvětovým problémem. Reakcí na tento jev je rozvíjející se vývoj nových typů antibiotik metodou cílené nebo náhodné inaktivace genů, vedoucí k využití alternativních biochemických drah. Jinou strategií je vyhledávání antibiotik s novými buněčnými cíly.

## Abstract:

Antibiotics are chemical substances produced by various species of microorganisms (bacteria, fungi) that suppress the growth of other microorganisms and may eventually destroy them. These compounds are produced in bacteria during the stationary phase of growth via secondary metabolic pathways that are more specialised than primary metabolism and varies widely even among members of the same genera. The rapidly increasing resistance of selected microbes against a large number of antibiotics has become a very serious issue worldwide. In response to this problem, progress is being made towards the semi-rational design of antibiotics by targeted or random inactivation of particular genes leading to

utilization of alternate biochemical pathways. Another strategy searches for new cellular targets of antibiotics.

## 1 Obsah

1	Obsah.....	3
2	Úvod.....	3
3	Bakteriální Rezistence k antibiotikům .....	4
4	Genetická podstata rezistence .....	6
4.1	Původ genů rezistence .....	10
4.2	Šíření genů rezistence.....	11
5	Zdroje genů rezistence k antibiotikům .....	11
5.1	Půda.....	12
5.2	Voda .....	14
5.3	Živočišná výroba.....	15
6	Vznik multi-rezistentních kmenů patogenních bakterií .....	16
6.1	Methicilin rezistentní <i>S. aureus</i> (MRSA).....	17
6.2	Vankomycin rezistentní enterokok (VRE).....	21
6.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	22
7	Perspektivy.....	23
8	Závěr.....	26
9	Přehled literatury.....	27

## 2 Úvod

Antibiotika jsou chemické látky organického původu a rozmanitých struktur, mající bakteriostatický, baktericidní, cytostatický, antiprotozoární, antimykotický nebo antivirotický účinek. Patří tedy mezi chemoterapeutika. Jsou využívána v humánní i veterinární medicíně, potravinářském průmyslu, v základním výzkumu, jako inhibitory metabolických pro přípravu selekčních médií pro molekulárně-genetické experimenty a genové inženýrství či v zemědělství.

Většina všech antibioticky účinných látek je přirozeně produkována bakteriemi, mikromycetami a rostlinami. Tyto látky mohou být poté následně chemicky modifikovány, čímž je zvyšován jejich účinek a dá se tak i obejít rezistence bakterie k antibiotiku původnímu. Antibiotika jsou bakteriální buňkou syntetizována během stacionární fáze růstu jako sekundární metabolity. Tyto látky neslouží ke konstrukci nové biomasy a jsou tvořeny z metabolitů primárních, když jsou tyto v přebytku nebo je nelze využít nejsou již potřeba.

V dnešní době je známo přibližně 10000 antibiotik izolovaných z prokaryotních

a eukaryotických organismů (Spížek, 1999). V klinické praxi se pak využívá kolem sta různých antibiotik (Hejzlar, 1995; Davies, 2007). Antibiotika byla uvedena do léčebné praxe ve čtyřicátých letech dvacátého století. Prvým takto užívaným antibiotikem byl penicilin, což je  $\beta$ -laktamové antibiotikum objevené A. Flemmingem izolované z eukaryotního organismu, mikromycety, houby rodu *Penicillium*. Historicky druhým objeveným antibiotikem byl bacitracin, izolovaný I. M. Lockhartem v roce 1943 z *Bacillus subtilis*. L.A. Waksman roku 1944 izoluje další významnou látku, streptomycin ze *Streptomyces griseus*. V roce 1947 je A. C. Finlayem objeven chlortetracyklin a o rok později jej izoluje ze *S. aureofaciens*. Tehdy je také objeven J. Ehrlichem chloramfenikol ze *S. venezuelae* (Spížek 1999). Roku 1952 byl objeven erytromycin, který je produkován bakteriemi *S. erythraeus* (Havlík, 2003).

Celosvětově rozšířeným problémem jsou bakterie rezistentní, tedy vůči účinku antibiotika odolné, zejména pak multirezistentní patogenní bakterie. Tyto bakterie vyvolávají často závažné a obtížně léčitelné infekce.

Výzkum příčin a způsobu šíření rezistence u bakterií je proto velmi důležitým úkolem mikrobiologů a dalších odborníků. Já jsem se ve své práci zaměřil zejména na genetickou podstatu rezistence, způsob přenosu genů rezistence, původ genů rezistence, mechanismy rezistence, zdroje rezistence a na nástin řešení vniklých problémů.

### **3 Bakteriální Rezistence k antibiotikům**

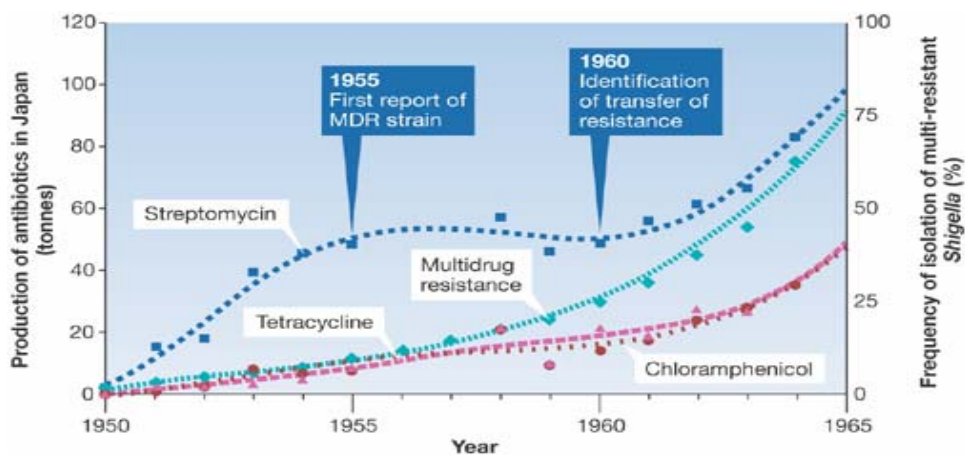
Schopnost čelit nástrahám prostředí a přizpůsobit se jim, je jednou ze základních schopností živých organismů, a tedy i bakterií. Bakterie jako první obyvatelé naší planety díky dlouhé evoluci, ale také velké plasticitě svého genomu, dokázaly osídlit rozličná stanoviště a přizpůsobit se i tak extrémním podmínkám, jaké panují například v okolí podmořských termálních vývěrů. Jev rezistence k antibiotikům je také jednou z evolučních odpovědí na nepříznivé podmínky. Je to mechanismus, díky kterému bakterie překonávají bakteriostatické a baktericidní účinky antibiotik. Být rezistentní v prostředí s vysokou dávkou antibiotik je vlastnost užitečná nejen z hlediska bezprostředního přežití, ale také dovoluje využití živin v nepřítomnosti kompetitorů, kteří antibiotikům podlehlí (Fajardo *et al.*, 2009).

Již před více než šedesáti lety se k léčbě onemocnění bakteriálního původu začala používat první antibiotika penicilin a streptomycin (Havlík, 2003). V té době byla antibiotika považována za léky, kterým si lidé podmaní patogenní mikroby a infekční choroby se stanou

minulostí. Tehdy jev rezistence nebyl brán širokou vědeckou společností příliš v úvahu, ačkoli byly již pozorovány rezistentní kmeny komenzálních i patogenních druhů bakterií v laboratoři. V roce 1940 byla objevena *E. coli* produkující enzym penicilinázu (Abraham a Chain, 1940) a krátce poté byla podobná penicilináza objevena i u *Staphylococcus aureus* (Kirby 1944).

Začátkem padesátých let se v Japonsku objevila epidemie průjmových onemocnění, kterou způsobily kmeny druhu *Shigella* (obr. 1) u kterých se rychle vyvinula rezistence k podávaným antibiotikům. Později se také ukázalo, že se rezistence u těchto bakterií vyvinula nejen rychle a současně, ale také byl pozorován přenos z rezistentních kmenů na kmeny senzitivní. V šedesátých letech byly multirezistentní kmeny bakterií identifikovány, po celém světě, ale význam těchto objevů byl v té době nepochopen (Davies 2007).

**Obrázek 1. Vztah mezi rozvojem rezistence k antibiotikům u dysenterii působících izolátů rodu *Shigella* v Japonsku a zavedením antimikrobiální léčby mezi lety 1950 a 1965.**



V roce 1955 byl charakterizován první případ plazmidem řízené rezistence. MDR (multidrug resistance) – rezistence k více typům antibiotik. (převzato z Davies, 2007)

Následovalo období rozsáhlého využití antibiotik nejen v humánní a veterinární medicíně, ale i pro zemědělské účely. To vedlo k hromadění antibiotik v prostředí, vývoji a rychlému šíření rezistentních kmenů nejrůznějších druhů bakterií (Aminov a Mackie 2007).

Kmeny bakterií označované jako rezistentní, získaly schopnost bránit se proti účinkům těchto látek a činí tak širokou škálou biochemických principů:

- 1) Produkce enzymů, které pozměňují nebo destrukují příslušné antibiotikum, čímž ho inaktivují.

- 2) Bakterie se mohou obejít bez inhibované cílové molekuly.
- 3) Produkce nadměrného množství cílové molekuly, díky chromozomální mutaci v regulační oblasti jejího genu a zvýšení minimální inhibiční koncentrace antibiotika.
- 4) Produkce enzymů modifikujících cílovou strukturu.
- 5) Produkce látek, které se váží na cílovou strukturu a brání tak navázání antibiotika.
- 6) Produkce buněčných komponent, které omezují možnost vniknutí antibiotika do buňky.
- 7) Snížení koncentrace antibiotik v buňce pomocí aktivního transportu těchto látek do vnějšího prostředí.
- 8) Rychlá oprava poškozené cílové struktury.
- 9) Izolace antibiotika od cílové struktury.
- 10) Ochrana vůči účinkům některých antibiotik zajištěná umístěním cílové struktury uvnitř Gram-pozitivní buňky.
- 11) Tvorba biofilmů, která napomáhá odolávat účinku antibiotik.

(Davies, 2007)

Dnes jsou hlavním problémem stále se šířící rezistentní původci bakteriálních onemocnění, zejména multirezistentní patogenní organizmy, a nepřeberné množství rezistentních komenzálních bakterií, které se vyskytují v prostředí i na povrchu těla či v trávicím traktu lidí a zvířat. Tyto bakterie znesnadňují nebo zcela vylučují účinnou léčbu mnoha používanými antibiotiky.

V současné době jsou studovány především příčiny vzniku a přenosu rezistentních genů. Dále je pak studován původ rezistence u jednotlivých druhů bakterií a jsou hledána nová antibiotika skýtající účinný nástroj v boji proti rychle se šířícím rezistentním patogenům člověka.

## 4 Genetická podstata rezistence

Rezistence u bakterií může být buď přirozená, nebo získaná. Přirozená rezistence je původní vlastnost, vyplývající z fyziologie organismu. O získanou rezistenci se jedná v případě, kdy se z kmene citlivého k antibiotiku stane kmen rezistentní vlivem mutace nebo zisku nové DNA (Hawkey, 1998).

Mutační události vznikají bez ohledu na přítomnost antibiotika a postihují chromozom i mimochromozomální DNA. Takováto mutace genomu může přinést svému nositeli ohromnou výhodu oproti bakterii citlivé k antibiotiku přítomnému v prostředí. Díky mobilizaci takovéto mutace může dojít k jejímu rozšíření na různé bakteriální druhy.

Další možností získané rezistence je tedy přenos části DNA obsahující geny rezistence. Geny zodpovědné za rezistenci k antibiotikům jsou uloženy buď na chromozomu, nebo mimochromozomálně. Mezi mimochromozomální elementy DNA schopné nést geny pro rezistenci patří plazmidy, integrony, transpozony, genomové ostrovy a bakteriofágy.

Přenos genetické informace, a tedy i genů rezistence mezi bakteriemi je umožněn řadou genetických mechanismů. Získávání genů rezistence z prostředí a jejich přenos na komenzální i patogenní druhy bakterií se uskutečňuje následujícími způsoby:

- Transformace holé DNA, která zahrnuje přirozeně kompetentní stav některých bakterií a stejně tak kompetenci vyvolanou prostředím.
- Konjugativní přenos pomocí mobilních genetických elementů (konjugativních plazmidů, konjugativních transpozonů a mobilizovaných plazmidů).
- Transdukce.

(Aminov a Mackie, 2007)

V přírodě však může docházet ještě k dalšímu typu přenosu a sice k fúzi celých buněk (Davies 2007)

Přenos genů rezistence pomocí těchto obecných genetických mechanismů je možný u příbuzných i nepříbuzných druhů bakterií. To vede k šíření genů jednotlivých typů rezistence, možnosti vzniku nové, pozměněné varianty rezistence.

**Konjugativní plazmidy** Evoluční odpověď Gram-pozitivních i Gram-negativních bakterií vystavených účinkům antibiotik je zajištěna především konjugativními plazmidy. Konjugativní plazmidy nesoucí geny rezistence jsou označovány jako R-plazmidy nebo R-faktory (Meynell a Datta 1967). Geny způsobující rezistenci bakterie k antibiotiku, které jsou součástí R plazmidu, jsou nesený buď včleněnými transpozony (Foster, 1983) nebo integrony (obr.2). Plazmidově řízená multi-rezistence objevená v Japonsku v padesátých letech vznikla právě díky integronům (Davies 2007) a byla prvním případem horizontálního přenosu antibiotické rezistence. Konjugativní plazmidy hrají významnou roli v přenosu genetické informace u stafylokoků (McDonnell *et al.*, 1983), což je významné hlavně z hlediska šíření multirezistence u tohoto patogena. Konjugativní plazmidy jsou také schopné mobilizace malých nekonjugativních plazmidů.

**Transpozony** Transpozony jsou mobilní genetické elementy kódující místně specifickou transpozázu dovolující místně specifickou inzerci a excizi. Bakteriální genom obsahuje velké množství těchto elementů, které se dělí do čtyř skupin (Brown a Evans, 1991; Goryshin *et al.* 1998):

- 1) Inzerční sekvence (IS) a kompozitní transpozony, které jsou ohraničeny IS (př.: Tn10) a kódují pouze jeden gen pro transpozici.
- 2) Komplexní transpozony s krátkými inverzními repeticemi na koncích (př.: Tn3), které pro transpozici vyžadují dva genové produkty.
- 3) Transponovatelný bakteriofág (př.: Mu)
- 4) Ostatní transponovatelné elementy, které nespádají do předchozích skupin (př.: Tn7)

**Konjugativní transpozony** Konjugativního přenosu genetické informace je kromě plazmidů schopen ještě zvláštní typ transpozonů. Tyto mobilní široce rozšířené genetické elementy se nazývají konjugativní transpozony a mezi zástupce patří např. Tn916 (Burrus a Waldor, 2004). Tyto genetické elementy pro svůj přenos nevyžadují přítomnost konjugativního plazmidu, a poté co jsou přeneseny do buňky recipienta, tak jsou inzertovány do jeho chromozomu.

**Integrony** Integrony objevené v roce 1989 (Stokes a Hall, 1989) se v současnosti dělí do tříd podle své struktury a sekvence místně specifické rekombinázy (integrázy IntI) (Recchia a Hall, 1995; Hall a Collis, 1998; Hall *et al.*, 1999; Rowe-Magnus a Mazel 2002). Integrony jsou tradičním mechanismem, jímž získávají Gram-negativní bakterie geny pro rezistenci (Hall a Collis, 1998). Nicméně integrony se současně objevují i u Gram-pozitivních bakterií, díky horizontálnímu přenosu genetické informace. Integrony nejsou schopny horizontálního přenosu samostatně, ale pouze jako součást vektoru, kterým může být plazmid, bakteriofág či transponovatelný element (Davies, 2007). Nejvíce prostudovanou třídou integronů, je třída 1 (do které patří např.: In16, In5 a In4), jejíž zástupci se nejčastěji vyskytují u rezistentních bakterií. Podle umístění dělíme integrony na mobilní integrony (MI), které jsou součástí transpononu a nesou obvykle dvě až osm integrovaných genových kazet, a chromozomální integrony (CI), které jsou původní a nepohyblivé elementy nesoucí až stovky genových kazet s často neznámou funkcí (Guerin, 2009).

Geny rezistence jsou nesené na genových kazetách (každá nese obvykle jen jeden gen), které se včleňují do integronů působením místně specifické rekombinázy (integrázy IntI) katalyzující rekombinaci mezi *attI* místem na integronu a součástí genové kazety, která

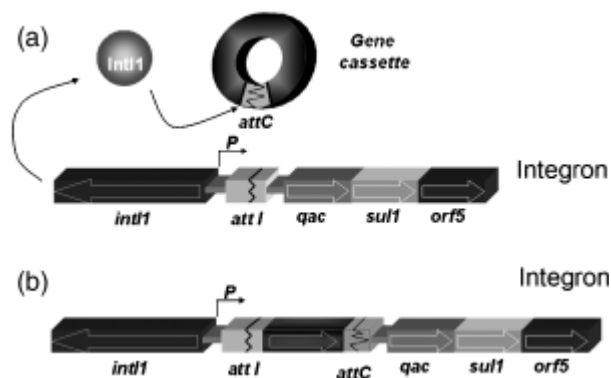


se označuje jako 59-base element (*attC*) (obr.2) (Hall a Collis, 1998.; Bennet, 1999). Důležité také je, že vložením genové kazety nezaniká *attI*. To umožňuje vkládání dalších genových kazet, které jsou na integronu tandemově uspořádány (obr.2). Díky tomu mohou vznikat multirezistentní integrony. Na základě homologie integrázových genů, které se liší ze 45-58% v sekvenci aminokyselin bylo definováno pět tříd multirezistentních integronů (Rowe-Magnus a Mazel, 2002).

Genových kazet bylo dodnes získáno pomocí metody PCR (Polymerase chain reaction) 164 (Holmes *et al.*, 2003), nicméně mnohé nesou geny s neznámou funkcí. Odhalení tohoto množství genových kazet bylo umožněno konstrukcí PCR primerů pro konzervativní oblasti 59-be (Stokes *et al.*, 2001) Velké množství těchto kazet nese geny zodpovídající za rezistenci na většinu dnes používaných antibiotik (Hall a Collis, 1998; Mazel a Davies, 1999; Rowe-Magnus a Mazel, 2002).

Navzdory významu integronů v získávání a šíření rezistentních determinant, je málo probádána dynamika a regulace získávání genových kazet. Guerin *et al.* (2009) uvádí, že porovnáním sekvencí DNA několika oblastí předcházejících genům pro integrázy objevili LexA vazebný motiv překrývající možný promotor. LexA protein slouží jako transkripční represor řídící tzv. SOS odpověď, což je systém zodpovědný za určení a opravu poškozené DNA. LexA represorový protein je odstraněn pomocí autosestříhu, který je indukován přítomností ssDNA (jednořetězcová DNA) a řízen proteinem RecA. Prokázalo se také, že regulace integrázových genů je striktně závislá na SOS odpovědi a že SOS indukce kontroluje míru kazetové rekombinace. Proces, kterým se gen stane pohyblivou kazetou není doposud znám, ale předpokládá se, že 59-be je přidán jako terminátor transkripce k RNA transkriptu příslušného genu, a poté přepsán na DNA sekvenci pomocí hypotetické reverzní transkriptázy (Recchia a Hall, 1995)

Obrázek 2: Struktura integronu a mechanismus získávání genových kazet (Martinez *et al.* 2009).



Gen *intI1* kóduje integrázu, která je zodpovědná za integraci kruhové genové kazety nesoucí gen pro rezistenci. Ta je včleněna díky místně specifické rekombinaci katalyzované integrázou mezi *att* místy na integronu a genové kazetě. Takto mohou na integronu vznikat shluky genových kazet, které jsou sestaveny v lineárním uspořádání. *P*- promotor pro expresi genové kazety; *qac* - gen pro rezistenci ke kvartérním amonným sloučeninám; *sulI*- gen pro rezistenci k sulfonamidům; *orf5*-otevřený čtecí rámec s neznámou funkcí.

## 4.1 Původ genů rezistence

Zdroj všech genů rezistence v prostředí je označován jako rezistom. Tento rezervoár velkého množství rezistentních bakteriálních kmenů slouží jako genetická banka, ze které mohou bakterie čerpat informace ve formě DNA, díky různým druhům přenosu genů rezistence mezi buňkami. Tyto geny mohou z prostředí získávat i nejrůznější bakteriální původci onemocnění. Proto je výzkum rezistentních bakterií v prostředí stejně důležitý jako výzkum rezistentních patogenů samotných

Většina případů rezistence u bakterií vzniká horizontálním přenosem genetické informace, která kóduje nástroje pro rezistenci, z kmene rezistentního na kmen senzitivní. Původ genů rezistence a příbuzenské vztahy mezi nimi se snaží podhalovat různé fylogenetické analýzy. Tyto retrospektivní studie pomohly identifikovat bakterie neprodukující antibiotika, jako zdroj širokého a různorodého fondu genů pro rezistenci k antibiotikům, ze kterého mohou být tyto geny přeneseny do bakterií v lidských i zvířecích ekologických kompartmentech (Aminov a Mackie, 2007). Tento přenos genetické informace je navíc posílen selekčním tlakem, který vzniká při podávání antibiotik. Používání antibiotik totiž ovlivňuje nejen cílové buňky patogena, ale všechny členy místní mikroflory, kultivovatelné i nekultivovatelné bakterie (Mazel a Davies, 1999; Riesenfeld *et al.*, 2004). Dalším důležitým zdrojem genů rezistence jsou producenti antibiotik, kteří jsou přirozenými nositeli těchto genů v půdním společenstvu, a také někteří mutanti v tzv. „housekeeping genes“, tedy v chromozomálních

genech kodujících cílové struktury antibiotik (Mazel a Davies, 1999) a kmeny bakterií, které zřejmě antibiotika metabolizují a zároveň tak jsou rezistentní vůči jejich účinkům (D'Costa *et al.*, 2006). Bakterie metabolizují antibiotika si nejsou vzájemně příbuzné, ale mají často velmi blízko k patogenním druhům a to napovídá, že by tento zdroj rezistence mohl stát za rozmachem multirezistence u patogenních bakterií (Dantas *et al.*, 2008).

## 4.2 Šíření genů rezistence

Obecně se předpokládá, že v nepřítomnosti antibiotika budou mobilní geny rezistence ztraceny a bakterie se stane opět citlivá k jeho účinkům, protože tyto geny představují metabolickou zátěž pro svého hostitele. Koselekce je nejvýznamnějším mechanismem, pomocí něhož jiné geny rezistence nesené na stejném genetickém elementu způsobují selekci pro kompletní mobilní genetický element a zabrání tak vymizení genů rezistence na tomto elementu (Gaze *et al.*, 2008).

Lidstvo produkuje velké množství rozličných odpadních látek, jako jsou čtyřmocné amonné soli (QAC- quaternary ammonium compounds), které jsou pro bakterie stresorem. Rezistence k těmto látkám je kódována geny *qac*, které jsou součástí integronů první třídy. V důsledku výskytu těchto látek v prostředí dochází k selekčnímu tlaku ve prospěch šíření integronů první třídy, čímž dochází ke koselekci genů, které se nachází na těchto integronech (Gaze *et al.*, 2005) *Qac* geny se dělí do dvou tříd. Jedna se vyskytuje pouze u stafylokoků na jejich multirezistentních plazmidech a je označována jako Major Facilitator Superfamily.

Do této skupiny patří *qac A/B*. Do druhé skupiny pojmenované Small Multidrug Resistance Family patří všechny ostatní *qac* geny, které se vyskytují na integronech nebo multirezistentních plazmidech u stafylokoků.

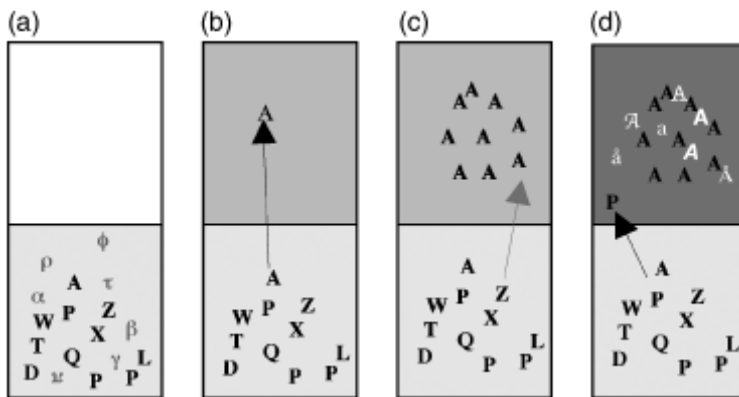
Dalším důkazem koselekce je šíření genů rezistence vlivem používání látek obsahujících ionty těžkých kovů. Příkladem takovýchto látek jsou růstové doplňky pro chov prasat, které obsahují měď. Jejich používání selektovalo ve prospěch šíření plazmidu nesoucího gen pro rezistenci vůči mědi (*tcrB*) a geny rezistence k makrolidům a glykopeptidům mezi enterokoky (Hasman *et al.*, 2006).

## 5 Zdroje genů rezistence k antibiotikům

Množství genů kódujících rezistenci a jejich typů je v neklinickém prostředí obrovské, naproti tomu variabilita genů rezistence získaných horizontálním genovým

přenosem je u lidských patogenů nízká (Martinez *et al.*, 2009) To je způsobeno „efektem zakladatele“ (obr.3). Tento evolučně-biologický princip vysvětluje, proč se u patogenů vyskytují jen určité typy rezistence a jiné ne.

**Obrázek 3: Efekt zakladatele a diverzita genů u patogenních bakterií (Martinez *et al.*, 2009)**



Přírodní prostředí (světle šedá políčka) obsahuje množství genů rezistence (písmena). Některé geny (řecká písmena) nemohou být přeneseny do patogena (bílé políčko), protože se nevyskytují ve stejném prostředí nebo nemohou být inkorporovány do vektoru kompatibilního s patogenem (a). Ačkoliv několik genů rezistence (latinská písmena) může být přeneseno, jen některé z nich se současně vyskytují u infekčních bakterií (tmavší šedé políčko v případě b) Jestliže se selekční tlak nemění, jsou tyto geny udržovány a mohou se šířit v populaci(c) a brání vstupu ostatních genů, které mohou hrát podobnou roli (efekt objevitele). Když se selekční síly změni (např. výskyt nového antibiotika náležejícího do stejné skupiny, tmavé políčko v d), tak se původní geny rezistence vyvinou ve více účinné varianty (bílá „a“ v (d) s různými specifiky.

Mezi nejvýznamnější ekosystémy, ve kterých se hromadí genetická informace pro rezistenci k antibiotikům patří ekosystém půdní, odpadní vody a ekosystémy spojené s živočišnou výrobou. Rezistentní bakterie žijící přirozeně v těchto ekosystémech pak mohou buď samy způsobovat infekce nebo předat geny pro rezistenci patogenním druhům. Na tyto aspekty rezistence k antibiotikům se zaměřují další ekologicky orientované studie.

## 5.1 Půda

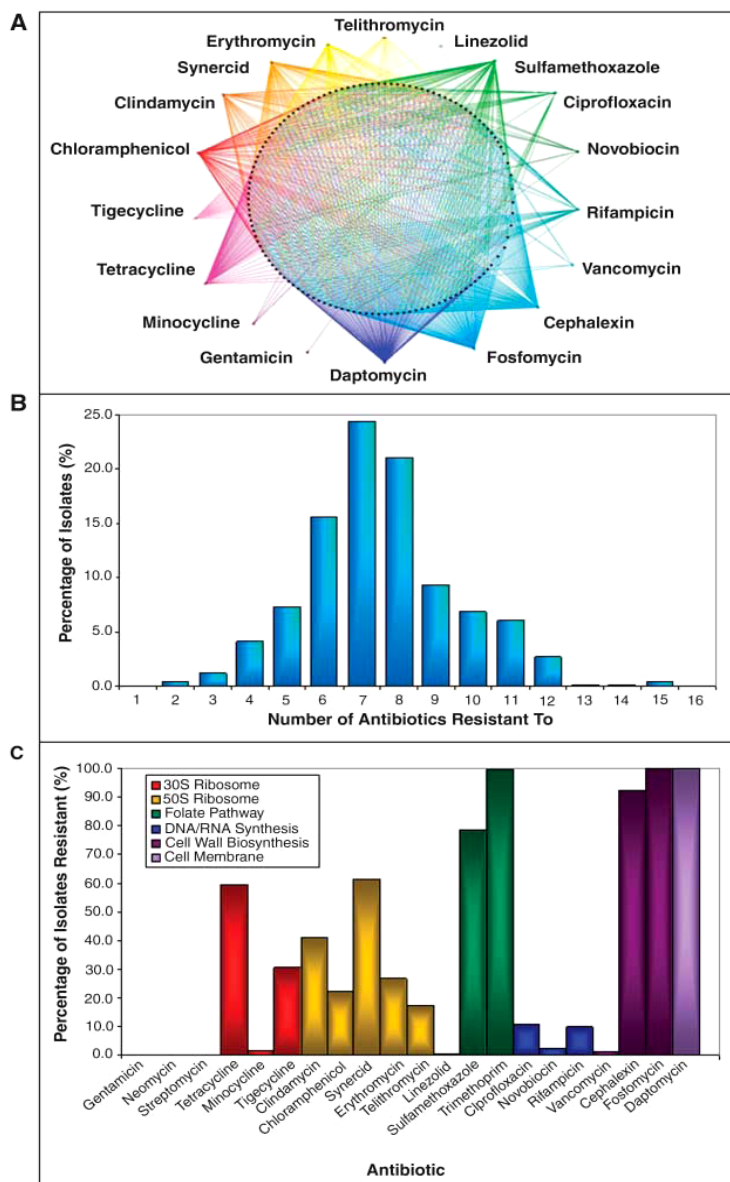
Půdní druhy bakterií jsou nepostradatelnou součástí půdního ekosystému, která je zodpovědná především za rozklad odumřelé živé hmoty. V půdě se přirozeně vyskytují bakteriální producenti antibiotik, především z rodu *Streptomyces*, kteří jsou zdrojem rezistence proti účinkům vlastních antibiotik. V.M. d'Costa a kolektiv (2006) provedli studii sporulujících bakterií náležících do rodu *Streptomyces*. Všechny nalezené kmeny, bez výjimky, byly multirezistentní v průměru k 7-8 použitým antibiotikům (obr.4 B,C)

(přírodního, semisyntetického i syntetického původu) . Mezi 480 izoláty objevili 2 kmeny rezistentní k 15 z 21 použitých antibiotik (obr.4 B). Prokázali tak, že přítomnost antibiotik v prostředí podporuje získávání nebo nezávislý vývoj vysoce specifických rezistentních nástrojů u půdních sporulujících bakterií. V poslední době se, ale také ukazuje, že hlavním zdrojem rezistence jsou zřejmě bakterie, které nejsou producenty antibiotik (Aminov a Mackie, 2007). Příkladem takovýchto bakterií jsou bakterie druhu *Kluyvera*, se kterými je spojována rezistence k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům zajištěná širokospektrými  $\beta$ -laktamázi CTX-M kódovanými geny *bla*<sub>CTX-M</sub> (Cantón 2009). Fylogenetická analýza založená na příbuznosti genů rezistence k různým antibiotikům, kterou provedl Aminov a Mackie (2007) odhaluje, že právě kmeny bakterií, které nejsou producenty antibiotik, jsou snadno dostupným, různorodým zdrojem, ze kterého jsou geny pro rezistenci přenášeny do bakterií žijících v lidských a zvířecích ekologických kompartmentech.

Kromě bakterií kultivovatelných v laboratorních podmínkách mohou nést geny pro rezistenci k antibiotikům i bakterie nekultivovatelné, jichž se v přírodě vyskytuje většina.. Právě tyto bakterie jsou významným zdrojem nových genů rezistence k antibiotikům (Riesenfeld *et al.*, 2004). Studium těchto genů je podmíněno vytvořením několika genetických knihoven klonováním DNA, izolované přímo z půdních vzorků a výběrem klonů, které vykazují rezistenci k antibiotikům v *E. coli*. Riesenfeld *et al.* (2004) takto získali z knihovny BAC (**B**acterial **a**rtificial **c**hromosome) 10 unikátních klonů rezistentních k aminoglykosidovým antibiotikům nebo tetracyklinům.

Vzájemná příbuznost mezi mnoha geny pro rezistenci u půdních a klinicky izolovaných patogenních bakterií dokumentuje, jako snadno a často dochází k přenosu genetické informace mezi oběma skupinami. Systematické studium půdního rezistómu, obsahujícího obrovské množství typů a variant různých genů pro rezistenci, je tak základem pro předpověď možného objevení klinicky významných rezistentních bakterií (D'Costa, 2006).

Obrázek 4. Analýza rezistence k antibiotikům u 480 izolátů půdních bakterií (D'Costa *et al.*, 2006).



## 5.2 Voda

Vodní ekosystémy mohou být také zdrojem genů kódujících různé mechanismy rezistence. To je způsobeno jejich úzkou vazbou na ostatní ekosystémy (např. půdní). Antibiotika působící selekční tlak se do vodních ekosystémů dostávají spolu s odpadní vodou z lidských sídel (Mispagel a Gray, 2005; Segura *et al.*, 2007) a kontaminací povrchové i spodní vody v důsledku zemědělské produkce požívající antibiotika, jako růstový prostředek (Chee-Sanford *et al.*, 2001).

V odpadních vodách se vyskytují rezistentní kmeny komenzálních a patogenních druhů bakterií. Tyto bakterie mohou přežít během procesu čištění odpadních vod, což dokládá studie zkoumající stabilizační nádrže (Mispagel a Gray, 2005). Stabilizační nádrže jsou

nástrojem pro biologické čištění odpadních vod. Principem čištění je autotrofní a heterotrofní aktivita organismů. Významné postavení při odbourávání organických látek mají autotrofní organismy, produkující kyslík potřebný pro rozkladné procesy. Rozklad organických látek v těchto nádržích provádějí bakterie. Řasy uvolňují kyslík a zpětně využívají oxid uhličitý poskytovaný heterotrofními organismy čímž dochází k cirkulaci látek.

Autoři této studie zkoumali na laboratorním modelu účinnost kompetitivní inhibice patogenních bakterií. Selhání tohoto procesu při eliminaci rezistentního kmene *S.typhimurium* 3/97, naznačuje, že by tento patogen mohl přežít i v přírodě. Rezistentní patogenní i komenzální bakterie, které se vyskytují v odpadních vodách tak mohou být nejen zdrojem infekcí ale mohou předat i geny pro rezistenci jiným bakteriím v prostředí. Díky přítomnosti antibiotik v tomto prostředí narůstá také možnost vzniku rezistence vlivem mutace a její fixace, jako selekční výhody pro bakteriální populaci.

Stejně jako v půdních ekosystémech se i ve vodách mohou vyskytovat bakterie nesoucí nové geny pro rezistenci k různým antibiotikům. Jedním z těchto organismů je i *Shewanella algae*, která se vyskytuje ve sladké i mořské vodě. Tento druh bakterie byl identifikován jako rezervoár fluorochinolonové rezistence způsobené genem *qnrA* Dalším rodem vodních bakterií, které nesou původní geny pro rezistenci k fluorochinolonům, je rod *Vibrio*, u něhož se vyskytují geny *qnrS* (Cantón, 2009).

### 5.3 Živočišná výroba

Dalším zdrojem rezistentních kmenů bakterií je prostředí spojené s živočišnou výrobou. Antibiotika jsou používána v zemědělství pro léčbu onemocnění, profylaxi a v některých zemích i pro podporu růstu hospodářských zvířat. Tato antibiotika vytvářejí selekční tlak na střevní mikroflóru chovaných zvířat a mohou se také dostat do prostředí spolu s odpadní vodou nebo jako součást exkrementů, které jsou použity při hnojení. Stejnou cestou se do prostředí dostávají i rezistentní bakterie (Chee-Sanford *et al.*, 2001) Tito autoři prokázali rozšíření osmi tříd genů kódujících rezistenci k tetracyklinům v odpadních nádržích a podzemní vodě v okolí zařízení pro chov prasat. Našli tyto geny i více než 250 metrů od odpadních nádrží ve směru toku podzemních vod. Nálezy těchto genů u typicky půdních bakterií ukazují, že vektor šířící geny rezistence k tetracyklinům není omezen jen na rezistentní kmeny gastrointestinálního původu (např. *Enterococcus* spp.), ale může být mobilizován i do původní půdní mikrobioty. Ze studie vyplývá, že *tet* geny prokázané

v okolním prostředí jsou důsledkem zemědělské výroby a jejich výskyt ve spodní vodě může být potenciálním zdrojem rezistence v potravním řetězci.

Komenzální bakterie, které osidlují trávicí trakt chovaných zvířat bývají opakovaně vystavovány účinku antibiotik a vzniká u nich rezistence jako nutná odpověď na selekční tlak. Tyto bakterie jsou zdrojem genů pro rezistenci jsou kontinuálně vylučovány do prostředí a mohou se šířit do ostatních ekosystémů. Mohou se na člověka přenést přímo či nepřímo a infikovat ho nebo kolonizovat. Mnohé tyto organizmy samy jsou oportunními patogeny člověka, ale mohou také posloužit jako zdroj rezistentních genů, které jsou přenášeny na ostatní bakterie včetně patogenních druhů, během horizontálního genového přenosu. Knezevic a Petrovic, (2007) zkoumali výskyt rezistentních kmenů *E. coli*, původem z trávicího traktu zvířat z farem (pro chov vepřů, hovězího dobytka nebo brojlerů) v oblasti s hojným používáním různých antibiotik k veterinárním účelům. Identifikovali 115 případů *E. coli* a testovali jejich citlivost na používaná antibiotika. Zjistili, že 81,7% ze všech izolovaných bakterií *E. coli* je rezistentních k tetracyklinům, 43,5% k ampicilinu a streptomycinu. Současně 66,1% všech vzorků *E. coli* bylo rezistentních ke dvěma a více antibiotikům, přičemž bakterie pocházející z prasat byly všechny multirezistentní.

## 6 Vznik multi-rezistentních kmenů patogenních bakterií

Multirezistence je způsobena:

- 1) Plasmidem nebo konjugativním transpozonom, kódujícím rezistenci k několika různým antibiotikům.
  - 2) Samostatným genem kódujícím biochemický mechanismus působící rezistenci vůči skupině příbuzných antibiotik (např. *aac, aph, ant* spouštějící rezistenci k aminoglykosidům).
  - 3) Samostatným genem kódujícím rezistenci ke skupině strukturně nepříbuzných látek (např. různé geny kódující nescifické efluxní pumpy).
  - 4) Působením neantibiotických látek, jako jsou těžké kovy nebo desinficiens. Rezistence bakterií k těmto látkám je často kódována geny, které se vyskytují na stejných genetických elementech jako geny rezistence a může tak docházet ke ko-selekci.
  - 5) Mutacemi vznikajícími na několika nezávislých cílových genech (jako u *M. tuberculosis*).
- (Mazel a Davies, 1999)



Geny rezistence, které se vyskytují u patogenních bakterií pocházejí z komenzálních bakterií nebo bakteriálních producentů antibiotik, kteří se běžně vyskytují v prostředí. K mobilizaci těchto genů dochází využitím obdobných genetických strategií, s konečnou inzercí do genetické platformy (vektoru), která umožňuje účinný přenos do druhého organismu. Tyto vektory, umožňují získat i více genů rezistence najednou a rozsáhlé použití různých druhů antibiotik mohlo determinovat ko-selekční procesy, které umožňují perzistenci těchto genů v bakteriálních společenstvech (Cantón 2009). Příkladem klinicky významné multirezistentní bakterie, působící tzv. nemocniční infekce, je MRSA (Methicilin Rezistentní *S. aureus*), VRE (Vankomycin Rezistentní *Enterococcus*) a multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*. Proto je jim věnována pozornost v následujících odstavcích.

## 6.1 Methicilin rezistentní *S. aureus* (MRSA)

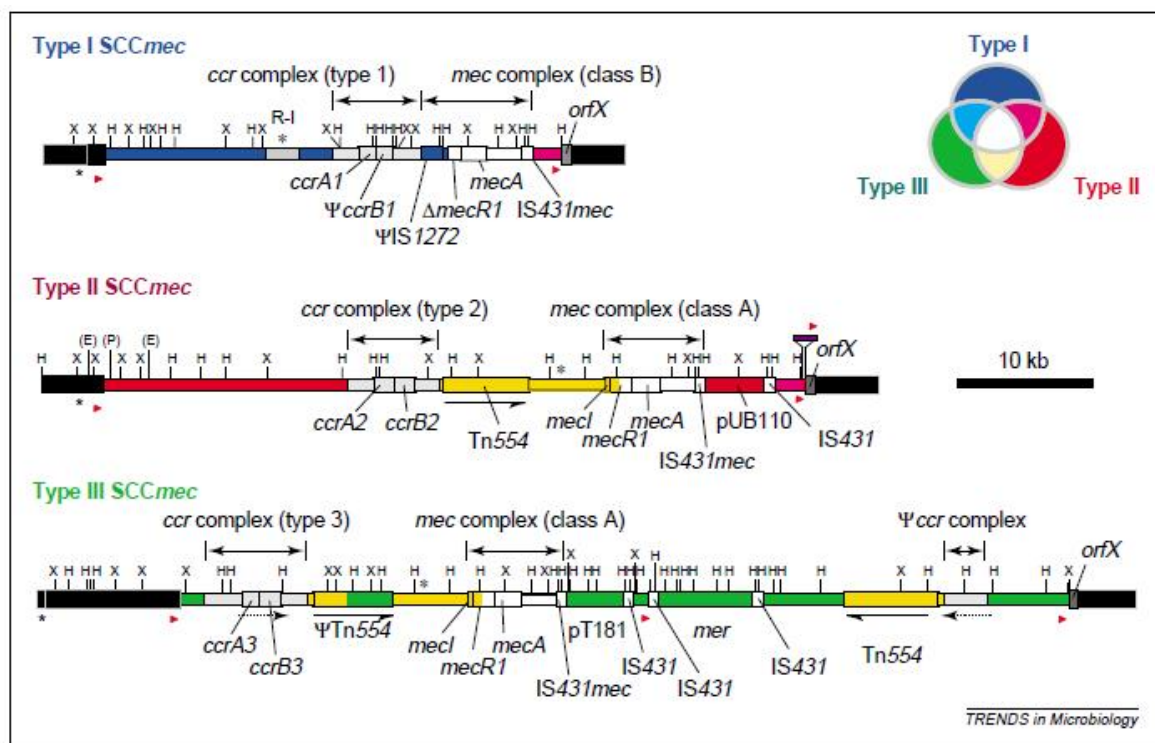
*S. aureus* je součástí normální lidské mikroflóry, která se vyskytuje na sliznicích a povrchu kůže. Tato bakterie je také původcem mnoha infekcí měkkých tkání a kůže u oslabených jedinců a bývá také častým vetřelcem v chirurgických a jiných poraněních, což může vést k sepsi (Livermoore, 2001). *S. aureus* je také znám pro svou schopnost získat rezistenci (Gaze *et al.*, 2008), byl vždy překážkou pro antimikrobiální chemoterapii a dokázal přemoci všechny terapeutické látky objevené za posledních 60 let (Hiramatsu *et al.*, 2001) Nejvýznamnějšími rezistentními kmeny *S. aureus* jsou kmeny označované MRSA (Methicilin Rezistentní *S. aureus*) a v současné době se objevující kmeny VRSA (Vankomycin Rezistentní *S. aureus*).

MRSA se poprvé objevil roku 1961 v Anglii (Erigh *et al.*, 2002) a již v sedmdesátých letech začal opakovaně způsobovat nemocniční infekce po celém světě (Hiramatsu *et al.*, 2001). Původní MRSA vznikl z kmene citlivého vůči methicilinu (Erigh *et al.*, 2002) inzercí mobilního genetického elementu SCC *mec* (Staphylococcal cassette chromosome *mec*), který nese geny pro rezistenci k methicilinu a jiným  $\beta$ -laktamovým antibiotikům, do *attB<sub>scc</sub>* místa na chromozomu poblíž replikačního počátku (Hiramatsu *et al.*, 2001).

SCC *mec* (Staphylococcal cassette chromosome *mec*)(obr.5) je genetický element, který je zodpovědný za rezistenci k methicilinu a ostatním  $\beta$ -laktamovým antibiotikům, ale i ostatním antibiotikům (typ II a III). U *S. aureus* se vyskytují tři základní SCC *mec*, které se liší svou délkou, strukturou, typem *ccr* genů (cassette chromosome recombinase) (*ccrA* a *ccrB*), které kódují dvě rekombinázy (A a B) zodpovědné za včlenění SCC *mec*

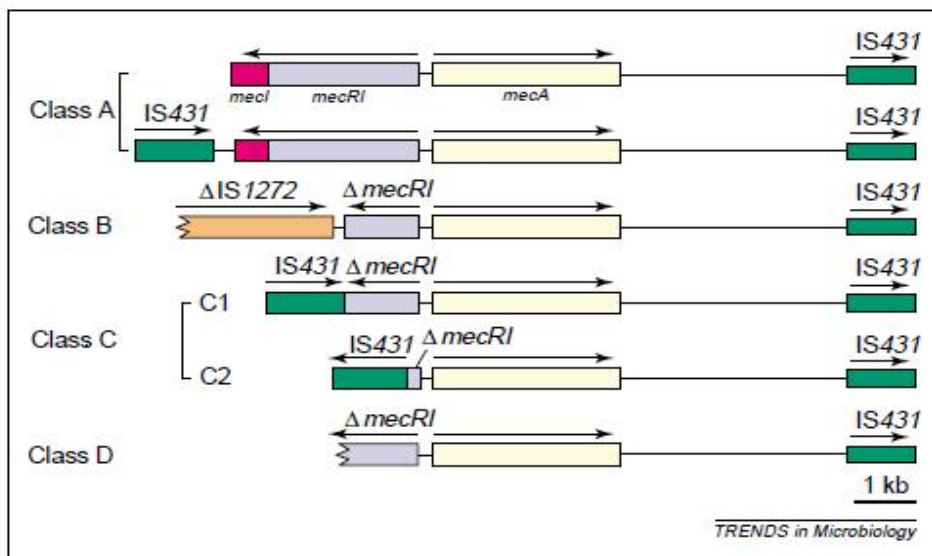
do chromozomu a třídou *mec* kazety, která je jejich součástí (Hiramatsu *et al.*, 2001; Novick *et al.*, 2001; Eright *et al.*, 2002). Genový komplex *mec* kóduje  $\beta$ -laktamovou rezistenci, kromě něj jsou součástí SCC *mec* často (typ IIa III) i integrované kopie plazmidů a transpozony, nesoucí geny pro rezistenci k ostatním antibiotikům (Hiramatsu *et al.*, 2001). Ukázalo se také, že SCC *mec* byl importován do *S. aureus* z jiných stafylokoků, a to hned v několika případech, což naznačuje, že je, respektive byl, jednou mobilní. U *S. epidermis* SCC *mec* obsahuje inzertované rezistentní elementy podobné těm u *S. aureus*, je tedy možné, že byl importován celý kompozitní SCC *mec* nebo byly inserce rezistentních genů získány odděleně a následovaly horizontální rozšíření předchůdce SCC *mec*. SCC *mec* jako nekonjugativní elementy by mohly být přenášeny fágově řízenou transdukcí. Ačkoli transdukce byla objevena, zpravidla s velmi malou frekvencí, tak byla vždy u *rec*<sup>+</sup> recipienta, což nemohlo být považováno za důkaz pohyblivosti. Počátkem šedesátých let se u methicilin rezistentních izolátů vyskytovaly mnohem menší SCC *mec* než dnes. Možným vysvětlením je, že tyto původní SCC *mec* jsou jediné, které mohli vyhovovat fágovým hlavám, a tak mohly být horizontálně přenášeny; současné získávání SCC *mec* insercemi plazmidů a transpozonů ukazuje, že byly imobilizovány, díky vlastní schopnosti střádat další geny (Novick *et al.*, 2001).

Obrázek 5: Struktura tří typů SCC *mec* (Hiramatsu *et al.*, 2001)



U stafylokoků se vyskytují čtyři třídy *mec* kazet (obr.6), ale u *S. aureus* byly identifikovány pouze dvě (třída A a B) (Hiramatsu *et al.*, 2001). *mec* kazeta se skládá z regulačních genů (*mecI*, kóduje transkripční represorový protein MecI, a *mecRI*, kódující protein MecR1 pro přenos signálu), zodpovědných za indukovanou transkripci, a gen *mecA*, který kóduje PBP2' (penicilin binding protein) způsobující rezistenci k methicilinu a ostatním β- laktamovým antibiotikům (Hiramatsu *et al.*, 2001).

**Obrázek 6:** Čtyři třídy *mec* genových komplexů, které se vyskytují u *Staphylococcus* spp. (Hiramatsu *et al.*, 2001)



Typ SCC *mec* označovaný jako typ IV SCC *mec* je mnohem kratší než ostatní typy a stejně jako typ I obsahuje pouze *mec* kazetu (třída B) pro rezistenci k β- laktamovým antibiotikům. Tento typ SCC *mec* se vyskytuje u CA-MRSA (community-acquired MRSA). CA-MRSA jsou celosvětově rozšířené geneticky odlišné kmeny, což ukazuje, že se nešířily klony CA-MRSA, ale úspěšný SCC *mec*, který mohou nést ve svém genomu i jiní stafylokokové. Příkladem může být *S. epidermis*, u něhož bývá často nalezen typ IV SCC *mec*. SCC *mec* tak může být široce rozšiřován mezi zdravými jedinci a může docházet k přeměně z komenzálního *S. aureus* na MRSA (Hiramatsu *et al.*, 2001). Není známo, které druhy stafylokoků byly donory čtyř typů SCC *mec* nalezených u MRSA. Přítomnost těchto čtyř typů naznačuje jejich několikanásobné zavedení do MRSA a jejich přítomnost ve stejných kmenech ukazuje, že horizontální přenos *mec* genů je u *S. aureus* poměrně častý (Erigh *et al.*, 2002).

V roce 2003 se v Nizozemí objevil nový typ MRSA, který nemohl být popsán/charakterizován pomocí *SmaI* pulzní elektroforézy (PFGE) a byl označen NT-MRSA (nontypable MRSA)(van Loo *et al.*, 2007). Bylo jednoznačně prokázáno, že infekce způsobené tímto typem MRSA jsou spojeny s kontaktem chovanými zemědělskými zvířaty, zejména prasaty a hovězím dobyt看em. Na rozdíl od ostatních MRSA, kmenů přenášených mezi lidmi a zvířaty, je však tento nový kmen původem zvířecí . NT-MRSA může vyvolat těžká infekční onemocnění, a to hlavně u lidí, kteří pracují na farmách, chovajících prasata či skot, nebo žijí v těsném kontaktu s těmito zvířaty (van Loo *et al.*, 2007).

Při léčbě infekcí způsobených multirezistentními kmeny MRSA je mnohdy nutno použít širokou škálu antibiotik mezi nimiž je i vankomycin, velice účinné glykopeptidové antibiotikum, používané jako poslední možnost při potlačení infekce. V roce 1996 však v Japonsku Hiramatsu *et al.* izolovali dva MRSA kmeny se sníženou citlivostí k vankomycinu. Vankomycin se v této zemi začal klinicky využívat teprve od roku 1991 zatímco v jiných zemích byl dostupný již od roku 1956.) Tyto kmeny označené Mu3 a Mu50 reprezentovaly dva různé evoluční stupně rezistence k vankomycinu: VRSA (Vankomycin Rezistentní *S. aureus*) a heterogenní vankomycin-rezistentní *S. aureus* (hetero VRSA). Populace Mu50 byla zcela rezistentní k vankomycinu v koncentraci 4 mg l<sup>-1</sup>. Populace kmene Mu3 byla z 99% citlivá, ale rezistentní „heterogenní“ subpopulace vykazovala různý stupeň odolnosti vůči koncentraci vankomycinu 4-9 mg l<sup>-1</sup>. Rezistentní buňky Mu3 odolné ke koncentraci vankomycinu 4 mg l<sup>-1</sup> byly téměř totožné s buňkami Mu50, a proto lze předpokládat, že heteroVRSA Mu3 je předchůdcem VRSA Mu50 (Hiramatsu *et al.*, 2001). VRSA kmeny se v současnosti vyskytují i v jiných státech. Například v USA bylo od roku 1997 do června 2002 popsáno osm případů infekcí způsobených VRSA s MIC 8-16 mg l<sup>-1</sup> (Chang *et al.*, 2003) V červnu 2002 pak byl identifikován kmen VRSA s MIC 32 mg l<sup>-1</sup> u ženy z Michiganu. Tento plně rezistentní VRSA nesoul gen *vanA* pro vankomycinovou rezistenci. Geny *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, a *vanG* byly popsány u vankomycin rezistentních enterokoků, ale nikdy u klinicky izolovaného *S. aureus*. Gen *vanA* nalezený u VRSA pocházel pravděpodobně od vankomycin-rezistentním *Enterococcus faecalis* (MIC 32 mg l<sup>-1</sup>), který byl izolován spolu s VRSA neboť oba geny (z VRSA i VRE) měli identickou DNA strukturu. VRSA kmen u této pacientky byl pak příbuzný s vankomycin-citlivým kmenem MRSA, izolovým z blízkého přítele pacientky, který byl nerozeznatelný od VRSA pomocí PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) (Chang *et al.*, 2003). Do roku 2006 se objevily ještě další dva VRSA kmeny s geny *vanA* získanými od enterokoka (Courvalin, 2006)

## 6.2 Vankomycin rezistentní enterokok (VRE)

Enterokokové jsou zajímavou skupinou Gramm-pozitivních bakterií, do které patří např. *E. faecalis* a *E. faecium*, působících tzv. nemocniční infekce. Vankomycinová rezistence u enterokoků byla poprvé popsána roku 1986 v Evropě. Evropský VRE pocházel ze zvířat u nichž se používala glykopeptidová antibiotika k podpoře růstu (Gholizadeh a Courvalin, 2000; Rice, 2001). To následně vedlo k zákazu avoparcinu, antibiotika vykazujícího zkříženou rezistenci s vankomycinem, pro zemědělské účely. Ve stejném roce se VRE objevil i v USA, kde se z 95% jednalo o vankomycin-rezistentního *E. faecium* a primárním iniciačním faktorem pro vznik rezistence bylo pravděpodobně perorální podávání vankomycinu při léčbě průjmových onemocnění, asociovaných s podáváním antibiotik, v nemocničních zařízeních. Ukázalo se také, že neglykopeptidová antibiotika, především širokospektré cefalosporiny a antibiotika s možnou aktivitou proti anaerobním bakteriím, jsou spojena s narůstajícím nebezpečím kolonizace a infekce spojené s VRE (Rice, 2001).

Geny zodpovědné za rezistenci k vankomycinu byly součástí jednoho ze dvou funkčně podobných operonů označených *vanA* a *vanB* (Rice, 2001). Na základě fenotypu a genotypu bylo u enterokoků popsáno šest variant rezistence k vankomycinu (Courvalin 2006) z nichž pět (typy VanA, VanB, VanD, VanE a VanG) bylo získáno od jiných druhů bakterií a jeden, typ VanC, je původem od přirozeně vankomycin-rezistentních enterokoků (*E. gallinarium*, *E. flavescens*, *E. casseliflavus*) (Gholizadeh a Courvalin, 2000; Reynolds a Courvalin, 2005, Courvalin 2006). Získané geny pro rezistenci k vankomycinu typu VanA a VanB, které se vyskytují u klinických izolátů, jsou součástí plazmidů, což vede k jejich celkem snadnému a rychlému šíření mezi enterokoky a umožňuje to i jejich přenos na jiné bakteriální druhy, např. *S. aureus* (Courvalin, 2006; Moritz a Hergenrother, 2007)

Rezistence k vankomycinu je u enterokoků způsobena přítomností alternativní cesty syntézy peptidoglykanu, která vede:

- a) k syntéze nízko-afinitních prekurzorů, ve kterých je C-koncový D-Ala zbytek nahrazen D-laktátem (D-Lac), u typů VanA, VanB, VanD nebo D-serinem (D-Ser), u typů VanC, VanE a VanG
- b) k eliminaci prekurzorů normálně produkovaných hostitelem

Procentuelní zastoupení G-C párů v genech tvořících operony *vanA* a *vanB* (43% a 48%) je mnohem vyšší než jejich zastoupení v celkové DNA *E. faecalis* (38%) nebo *E. faecium* (39%). Značný rozdíl v zastoupení G-C párů je také mezi jednotlivými operony

(29-45% u *vanA* a 41-51% u *vanB*). Tato data naznačují, že geny pro glykopeptidovou rezistenci pocházejí z jiných rodů bakterií, a že jednotlivé genové shluky mohou být sestaveny z genů pocházejících z různých zdrojů. Za potenciální zdroj genů pro rezistenci jsou tak označovány bakteriální producenti glykopeptidových antibiotik (*Streptomyces toyocaensis*

a *Amycolaptosis orientalis*), kteří produkují příbuzné D-Ala:D-Lac ligázy (Gholizadeh a Courvalin, 2000; Rice, 2001). Nicméně procento G-C párů ve strukturních genech D-Ala:D-Lac ligáz pocházejících z těchto producentů je vyšší (60%) než u VanA, VanB a VanD, což naznačuje, že získání těchto genů enterokoky není recentní záležitostí. Stupeň podobnosti mezi *vanE* a *vanC* geny ukazuje, že získaná rezistence typu VanE u *E. faecalis* mohla vzniknout získáním chromozomálního *vanC* operonu z jiných druhů přirozeně rezistentních enterokoků (Gholizadeh a Courvalin, 2000; Rice, 2001). Operon *vanG* se skládá z osmi genů, které pravděpodobně pocházejí ze tří různých *van* operonů (*vanD*, *vanC* a *vanE*) (Reynolds a Courvalin, 2005).

### 6.3 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* je druh Gramm-negativní bakterie schopné vyvolat nejrůznější infekce, zejména u pacientů s potlačenou imunitou. Multirezistence k nejrůznějším druhům antibiotik, která se vyskytuje *Pseudomonas aeruginosa*, pak snižuje schopnost léčit pacienty infikované těmito bakteriemi. Tyto bakterie jsou jednak přirozeně rezistentní, díky neprostupnosti vnější membrány pro některá antibiotika, multisubstrátovým efluxním pumpám či produkci chromozomálně kódované AmpC cephalosporináze (Bonomo a Szabo, 2006), ale mohou získat geny pro rezistenci, pomocí horizontálního přenosu genetické informace nebo mutace (Panzig *et al.*, 1999; Henrichfreise *et al.*, 2007). V současnosti je tak největší hrozbou vznik a šíření panrezistentních kmenů, které jsou odolné ke všem používaným antibiotikům včetně polymyxinů. Panrezistence je u těchto kmenů výsledkem konvergence mechanismů mnohonásobné rezistence (Bonomo a Szabo, 2006).

Henrichfreise *et al.* (2007) zkoumali 22 klinicky izolovaných, klonálně odlišných multirezistentních kmenů, které ve čtrnácti případech vykazovali dvacetkrát vyšší četnost mutací než u divokého typu PA01. Takovýto fenotyp je spojován především s kmeny *P. aeruginosa* způsobujícími chronická plicní onemocnění, ale poprvé v historii se podařilo získat kmen, který nebyl izolován v souvislosti s chronickým plicním onemocněním.

Bakterie *P. aeruginosa* pocházeli z pacientů s cystickou fibrózou (CF) i bez CF, kteří byli hospitalizováni na jednotkách intenzivní péče. U deseti kmenů objevily nadměrnou produkci čtyř různých multisubstrátových efluxních mechanismů označených: MexAB-OprM, MexEF-OprN, MexCD-OprJ a MexXY-OprM. Nепrostupnost vnější membrány vlivem ztráty OprD kanálu bylo zaznamenáno u 18 z 22 multirezistentních kmenů. Nadměrná produkce AmpC  $\beta$ -laktamázy byla identifikována u 17 izolátů a modifikace ve struktuře genů pro topoizomerázu IV, která je cílovou strukturou chinolonových antibiotik, se vyskytly u 20 izolovaných kmenů. Zjistili také 25 determinantů různých získaných genů pro rezistenci u pěti kmenů izolovaných z non-CF pacientů. Jednalo se zejména o geny pro rezistenci k aminoglykosidům (tři geny pro adenylyltransferázy (*aadA1*, *aadA2*, and *aadB*), tři acetyltransferázové geny [*aac(6′)-Ib*, *aac(6′)-Ib′*, *aacA7*, a *aacA8*], a jeden fosfotransferázový gen (*aphA1-IAB*)) a ve dvou případech o geny kódující  $\beta$ -laktamázy (*bla<sub>OXA-2</sub>* a *bla<sub>PSE-1</sub>*). Všechny tyto získané geny byly součástí integronů první třídy. Přítomnost integronů umožňuje těmto kmenům možnost inserce dalších genových kazet, což by mohlo vést k ještě většímu stupni multirezistence.

Možným vysvětlením zisku vysoce efektivních determinantů genů pro rezistenci u *Pseudomonas aeruginosa* je její úzký vztah k vodnímu i půdnímu prostředí, ze kterého může tyto geny získat (Bonomo a Szabo, 2006). Příkladem genu, přeneseného z půdního prostředí by mohl být gen *rmtA* pro 16S rRNA methylázu, způsobující v současnosti vysoký stupeň panaminoglykosidové rezistence u *P. aeruginosa*. Takovýto enzym byl totiž již dříve popsán u aktinomycet produkujících aminoglykosidy (Poole, 2005).

## 7 Perspektivy

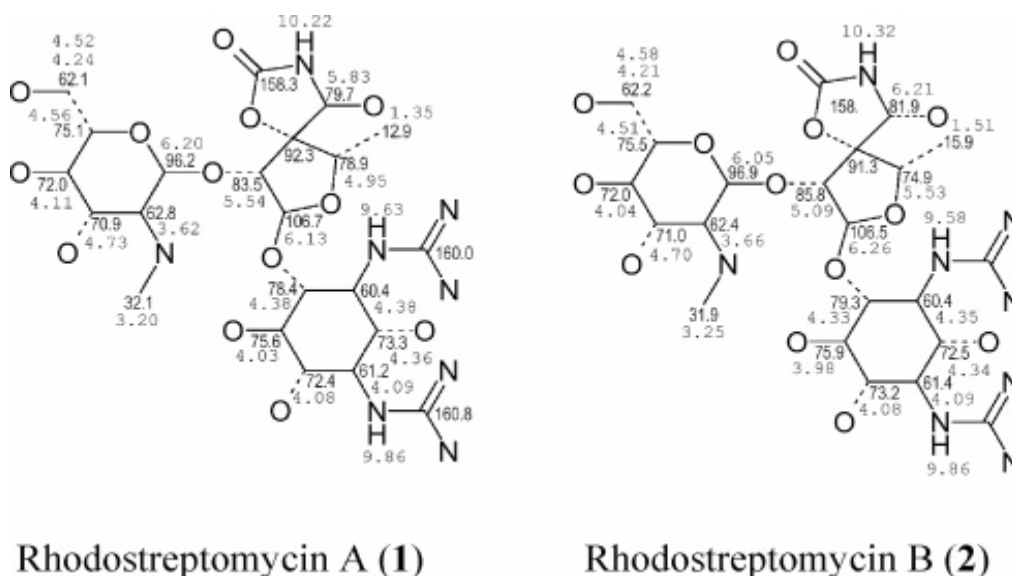
Jak se vypořádat s rezistentními bakteriemi a infekcemi, které tyto bakterie působí? To je v současné době otázka globálního významu, kterou se snaží řešit mnoho vědců a lékařů po celém světě. Vznik nových mechanismů rezistence, přenos genů pro rezistenci, a jejich případná akumulace v celkovém genomu bakterie, umožňuje rezistentním kmenům patogenních bakterií odolávat současným metodám léčby. Je proto nezbytné drastické přehodnocení antimikrobiální léčby, které by vedlo k překonání hrozby, kterou představují bakterie rezistentní k používaným antibiotikům. Nabízí se několik možných způsobů řešení nastalé situace, jejichž souběžné zavedení by mohlo přinést zadoucí posun.

Jedním z nich je nalezení nových účinných antibiotik překonávajících nejrozličnějším způsobem mechanismy rezistence, které bakterie pro svou ochranu využívají, případně

vytvoření polysyntetická antibiotika odvozená od nových či již objevených antibiotik. Příkladem nově nalezeného antibiotika, účinného proti mnoha druhům bakterií je Rhodostreptomycin, jehož dvě formy (A a B obr. 7) byly objeveny a izolovány v roce 2008. Toto antibiotikum bylo nalezeno u multirezistentní bakterie *Rhodococcus fascians*, která za normálních podmínek neprodukuje žádné antibiotikum. Rhodostreptomycin je aminoglykosidové antibiotikum účinné proti  $G^+$  i  $G^-$  bakteriím a díky schopnosti snášet vysokou aciditu prostředí je účinné i proti *H. pylori*, zároveň nebyly zaznamenány negativní účinky na eukaryotické buňky (Kurosawa *et al.*, 2008) Produkce tohoto antibiotika byla vyvolána uměle, přidáním bakteriální kultury *S. padanus*, producenta aktinomycinu. Kompetice mezi oběma druhy způsobila u rhodokoka stresovou odpověď v podobě produkce antibiotika (Kurosawa *et al.*, 2008). Záhadou však zůstává proč *Rhodococcus* začal produkovat antibiotikum. Jednou z teorií je, že přítomnost kompetitora způsobila u rhodokoka „spuštění výstrahy“ a zapnutí nových genů.

*Rhodococcus*, který produkuje antibiotikum má „megaplazmid“ nebo velký segment DNA, který obdržel od streptomycety. Logicky tak lze vyvodit, že geny pro produkci rhodostreptomycinu jsou nesené na plazmidu. Nicméně zatím nebyly u rhodokoka nalezeny plazmidy, s odpovídajícími geny. Další teorií tedy je, že plazmid sám slouží jako „pobídka“, která vyprovokuje rhodokoka k produkci antibiotika a předpokládá se tak určitý druh interakce mezi oběma bakteriálními geomy při produkci nového antibiotika. Jestliže vědci odhalí způsob, kterým došlo k produkci tohoto antibiotika, tak by mohli pomocí manipulací bakteriálního genomu mnohem metodičtějším způsobem navrhovat nová antibiotika (Trafton, 2008)

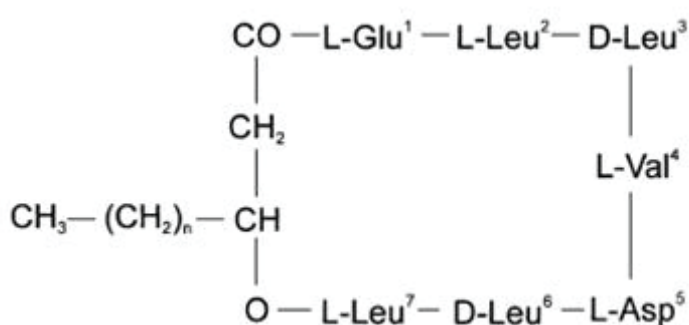
**Obrázek 7: Chemická struktura Rhodostreptomycinů (Kurosawa *et al.*, 2008)**





Mimo nově objevených antibiotik skýtají možnost klinického využití proti rezistentním bakteriím i antibiotika dříve objevená, která však dosud nebyla používána pro lékařské účely. Příkladem může být antibiotikum surfaktin (obr. 8). Toto peptidové antibiotikum, které vyvolává dezorganizaci lipidové dvojvrstvy membrány, patří do skupiny antibiotik produkovaných druhu rodu *Bacillus*. Dosud nebyla k této skupině antibiotik účinných především proti bakteriím a houbám popsána rezistence. Jen u druhu *Bacillus subtilis* bylo izolováno několik set divokých kmenů, které měly potenciál k produkci více než dvou tuctů různých antibiotik (Stein, 2005).

Obrázek 8: Surfaktin (Stein, 2005)



Surfaktin je nejprozkoumanějším, non-ribozomálně produkovaným, cyklickým lipopeptidem amfipatické povahy. Tato látka je produkována několika druhy rodu *Bacillus*. Mezi možné interakce surfaktinu s membránovými strukturami patří inzerce do lipidové dvojvrstvy, vycytávání jedno- a dvojmocných kationů, modifikace prostupnosti membrány, díky tvorbě kanálů a solubilizace membrány. Překážkou pro lékařské využití surfaktinu je však jeho toxicita (má např. hemolytické účinky), i když ta lze snížit podáváním nižších dávek, které jsou však dostačující k potlačení růstu bakterií, či drobnými změnami struktury, které kromě redukce toxicity mohou vést i ke zvýšení účinnosti antibiotika (Seidlová a Svobodová, 2008).

Vzdor faktu, že infekční nemoci představují celosvětově hlavní příčinu mortality, mnohé velké farmaceutické firmy přenechaly hledání nových antibiotik malým biofarmaceutickým společnostem a výzkumným centřům, především z finančního hlediska (Davies 2007).

Kromě hledání nových účinných látek je důležitá také prevence vzniku a šíření rezistentních bakterií. Dodržování nejrůznějších hygienických podmínek je jednou

z nejjednodušších cest, jak se vyvarovat šíření rezistentních bakterií v nemocničních zařízeních, ale i mimo ně.

Další možností prevence je správné využívání antibiotik a určení pravděpodobnosti výskytu a přenosu genů pro rezistenci mezi jednotlivými bakteriemi, lze tak předpovídat vznik rezistence k danému antibiotiku a nebezpečí s tím spojené (Martinez *et al.*, 2007).

Je proto nutné určit původ genů rezistence a příbuzenské vztahy mezi jednotlivými variantami těchto genů. Neméně důležité je také pochopení ekologických vztahů mezi bakteriemi

Paralelní cestou k hledání nových antibiotik je konstrukce účinných vakcín, které by byly preventivním nástrojem pro potlačení nemocí bakteriálního původu. Imunizace je velmi účinným preventivním nástrojem pro kontrolu některých infekčních chorob, který se v minulosti již několikrát osvědčil a přispěl ke zlepšení zdravotní situace po celém světě. Imunizace může být pasivní nebo aktivní. V prvním případě se jedná o pasivní ochranu příjemce díky podání séra obsahujícího protilátky nebo senzibilizované buňky imunitního systému. V případě aktivní imunizace dochází k podání vakcíny, která u příjemce vyvolá imunitní odpověď. Existují tři základní typy vakcín:

- a) vakcíny obsahující inaktivované produkty bakteriální buňky
- b) vakcíny tvořené usmrcenými buňkami bakterií
- c) vakcíny z živých oslabených bakterií

Mnohá onemocnění způsobená rezistentními bakteriemi (např.: TBC, cholera, střevní infekce) mají díky nadměrnému používání antibiotik pandemický charakter, a proto by praktickým řešením této situace byla produkce účinných vakcín. Konstrukce nových vakcín proti extracelulárním i intracelulárním patogenům vyžaduje hodně výzkumu, a až na výjimky (jako např.: hepatitis-B vakcína) představuje obtížný a zdlouhavý úkol (Davies 2007). Vakcinace představuje velkou naději do budoucna neboť může přinést úplnou eliminaci některých bakteriálních onemocnění a také náklady na prevenci jsou mnohem nižší než na léčbu nemoci.

## 8 Závěr

Záhy po objevu prvních antibiotik bylo jasné, že nejsou tyto látky trvalým účinným řešením v boji proti onemocnění bakteriálního původu. Příkladem může být vznik rezistence u *S. aureus*, kdy již v roce 1950 byla plná polovina kmenů tohoto druhu rezistentní k penicilinům (Livermore, 2000). Rezistence k antibiotikům je pro lidstvo důležitá, zejména

jako příčina ztráty vnímavosti k dávkám léků proti bakteriálním původcům nemocí. Většina rezistentních kmenů může být inhibována nebo zabita úměrně vysokou dávkou antibiotika, toto množství, ale není schopen tolerovat pacient (Hawkey, 1998).

Hledání nových antibiotik bakteriálního původu a jejich izolace z přírodních kmenů je jedním ze způsobů boje proti rezistentním patogenům člověka dodnes. Každé další objevené antibiotikum navíc skýtá možnosti dalších syntetických úprav původní molekuly a umožňuje tak zvýšení odolnosti vůči buněčným ochranným mechanismům. Nejnovější objev antibiotika cukerné povahy, rhodostreptomycinu, izolovaného z *Rhodococcus fascians* (Kurosawa *et al.* 2008), bude možná prvním krokem k tvorbě dalších z něj odvozených účinných látek. Další možnosti řešení ožehavého problému rezistence je studium metabolické drah syntézy již používaných přírodních antibiotik a testování účinnosti jednotlivých intermediátů. Tímto způsobem lze objevit nová semisynthetická antibiotika s odlišnými cíli nebo citlivostí

Tématu antibiotik a rezistence k nim bych se rád věnoval i nadále. Do budoucna mám zájem o práci ve vědecké skupině zabývající se charakterizací enzymových aktivit jednotlivých stupňů biosyntézy linkomycinových antibiotik kódovaných v rámci linkomycinového operonu.

## 9 Přehled literatury

Abraham, E. P., and Chain, E. (1940): **An enzyme from bacteria able to destroy penicillin.** *Nature* 146: 837 (1940)

Aminov, R. I. a Mackie R. I. (2007) : **Evolution and ecology of antibiotic resistance genes.** *FEMS Microbiol Lett* 271: 147–161 (2007)

Bennett, P. M. (1999): **Integrans and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43: 1–4(1999)

Bonomo, R. A. a Szabo, D. **Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Species and *Pseudomonas aeruginosa*.** *Clinical Infectious Diseases* 43: S49–S56(2006)

Brown, N. L., Evans, L. R. (1991): **Transposition in prokaryotes: transposon Tn501.** *Res. Microbiol.* 142: 689–700 (1991)

Cantón, J. (2009): **Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting.** *Clin. Microbiol. Infect.* 2009; 15 (Suppl. 1): 20–25

Chang, S., Sievert, D. M., Hageman, J. C., Boulton, M. L., Tenover, F. C., Pouch Downes, F., Shah, S., Rudrik, J. T., Pupp, G. R., Brown, W. J., Cardo, D. a Fridkin, S. K. (2003): **Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the *vanA* Resistance Gene.** *N. Engl. J. Med.* 348: 14 [www.nejm.org](http://www.nejm.org) april 3, 2003

Chee-Sanford, J. C., Aminov, R. I., Krapac, I. J., Garrigues-Jeanjean, N., a Mackie, R. I. (2001): **Occurrence and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Lagoons and Groundwater Underlying Two Swine Production Facilities.** *Applied and environmental microbiology* 67(4): 1494–1502 (2001)

Courvalin, P. (2006): **Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci.** *Clinical Infectious Diseases* 42:S25–34 (2006)

Dantas, G., Sommer, M. O. A. , Oluwasegun, R. D. a Church D.M. (2008): **Reports Bacteria Subsisting on Antibiotics.** *Science* 320(5872): 100-103 (2008)

Davies, J. (2007): **Microbes have the last word.** *EMBO reports* 8(7): 2007 ©2007 EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION

D’Costa, V. M., McGrann, K., Hughes, D. W. a Wright, G. D. (2006) **Sampling the Antibiotic Resistome.** *Science* 311: 374 (2006)

Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H. a Spratt B. G. (2002) **The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).** *PNAS* May 28, 2002 99( 11): 7687–7692 [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.122108599](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.122108599)

Gaze, W., O’Neil, C., Wellington, E. a Hawkey, P. **Antibiotic Resistance in the Environment, with Particular Reference to MRSA.** *ADVANCES IN APPLIED MICROBIOLOGY* 63: 249-280 (2008)

Gaze, W. H., Abdousslam, N., Hawkey, P. M., a Wellington, E. M. (2005): **Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 1802–1807 (2005)

Goryshin, I. Y., Miller, J.A., Kil, Y. V., Lanzov, V. A., Reznikoff, W. S. (1998): **Tn5/IS50 target recognition.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10716–21 (1998)

Guerin, E., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S., Gonzalez-Zorn, B., Barbé, J., Ploy, M.-C. a Mazel D. (2009): **The SOS Response Controls Integron Recombination.** *SCIENCE* 324: 1034 (2009)

Gholizadeh, Y., Courvalin P.(2000): **Acquired and intrinsic glycopeptide resistance in enterococci.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 16: S11–S17 (2000)

Fajardo, A., Linares, J. F. a Martínek, J. L. (2009): **Towards an ecological approach to antibiotics and antibiotic resistance genes.** *Clin. Microbiol. Infect.* 15 (Suppl. 1): 14–16 (2009)

Foster, T. J. (1983): **Plasmid-Determined Resistance to Antimicrobial Drugs and Toxic Metal Ions in Bacteria.** *Microbiol. Rev.* 47(3): 361-409 (1983)

Hall, R.M., Brookes, D.E. and Stokes, H.W. (1991): **Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point.** *Mol. Microbiol.* 5: 1941-1959 (1991)

Hall, R. M., a C. M. Collis (1995): **Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination.** *Mol. Microbiol.* 15: 593–600.(1995)

Hall, R. M., a C. M. Collis (1998): **Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons.** *Drug Resist. Updates* 1: 109–119 (1998)

Hall, R. M., C. M. Collis, M. J. Kim, S. R. Partridge, G. D. Recchia, a H. W. Stokes (1999): **Mobile gene cassettes in evolution.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 870: 68-80 (1999)

Hasman, H., Kempf, I., Chidaine, B., Cariolet, R., Ersboll, A. K., Houe, H., Bruun Hansen, H. C., and Aarestrup, F. M. (2006): **Copper resistance in *Enterococcus faecium*, mediated by the *tcrb* gene, is selected by supplementation of pig feed with copper sulfate.** *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5784–5789 (2006)

Hawkey, P. M. (1998): **The origins and molecular basis of antibiotic resistance.** *British Medical journal.* 317: 657–660 (1998)

Henrichfreise, B., Wiegand, I., Pfister, W. a Wiedemann B. (2007): **Resistance Mechanisms of Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Germany and Correlation with Hypermutation.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(11): 4062–4070 (2007)

Hejzlar, M. (1995) – **Antibiotika v praxi** (2. vydání), Makropulos, Praha, 499str., ISBN80-901776-4-6

Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M. and Ito, T. (2001): **The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Trends. Microbiol.* 9: 486-493 (2001)

Holmes, A. J., Gillings, M. R., Nield, B. S., Mabbutt, B. C., Nevalainen, K. M., a Stokes, H. W. (2003): **The gene cassette metagenome is a basic resource for bacterial genome evolution.** *Environ. Microbiol.* 5: 383–394 (2003)

Knezevic, P., Petrovic, O. (2008): **Antibiotic resistance of commensal Escherichia coli of food-producing animals from three Vojvodinian farms, Serbia.** *Int. J. Antimicrob. Agents.*31(4): 360-3. (2008)

Kirby, W. M. M. (1944): **Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci.** *Science* 452–453( 1944)

Kurosawa, K., Ghiviriga, I., Sambandan, T. G. , Lessard, P.A., Barbara, J.E.,

Rha, Ch. a Sinsky, A.J. (2008): **Rhodostreptomycins, Antibiotics Biosynthesized Following Horizontal Gene Transfer from Streptomyces padanus to Rhodococcus fascians.** *J. Am. Chem. Soc.* 130: 1126-1127 (2008)

Livermore, D. M.(2000): **Antibiotic resistance in staphylococci.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 16: S3–S10 (2000)

van Loo, I., Huijsdens, X., Tiemersma, E., de Neeling, A., van de Sande-Bruinsma, N., Beaujean, D., Voss, A. a Kluytmans, J. (2007): **Emergence of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus of Animal Origin in Humans.** *Emerging Infectious Diseases* • [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid) • 13/12, December 2007

Martinez, J. L. , Baquero, F. a Anderson, D. I. (2007): **Predicting antibiotic resistance.** *Nature reviews microbiology* 5: 958-965 (2007)

Martinez, J. L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J. F., Martinez-Solano, L. a Sanchez, M. B.(2009): **Aglobal view of antibiotic resistance.** *FEMS Microbiol. Rev.* 33 (2009) 44–65

Mazel, D. a Davies, J. (1999): **Antibiotic resistance in microbes.** *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 56: 742–754 (1999)

McDonnell, R.W., Sweeney, H. M., and Cohen, S. (1983): **Conjugational transfer of gentamicin resistance plasmids intra- and interspecifically in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 23: 151–160 (1983)

Meynell, E. a Datta, N. (1967): **Mutant drug resistant factors of high transmissibility.** *Nature* 214: 885–887 (1967)

Mispagel, H. a Gray, J. T. (2005) **Antibiotic Resistance from Wastewater Oxidation Ponds.** *Water Environment Research*, 77(7): 2996-3002 (2005)

Moritz, E. M. a Hergenrother, P. J. (2007): **Toxin–antitoxin systems are ubiquitous and plasmid-encoded in vancomycin-resistant enterococci.** *PNAS* 104 (1): 311-316

Normark, B. a Normark, S. (2002): **Evolution and spread of antibiotic resistance.** *Journal of Internal Medicine* 252: 91–106 (2002)

Novick, R.P., Schlievert, P. and Ruzin, A. (2001): **Pathogenicity and resistance islands of staphylococci.** *Microbes Infect.* 3: 585-594(2001)

Panzig, B., Schröder, G., Pitten, F.-A. a Gründling, M. (1999): **A large outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in north-eastern Germany.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43: 415–418 (1999)

Poole, K. (2005): **Aminoglykoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(2): 479-487 (2005)



Recchia, G.D. a Hall, R.M. (1995): **Gene cassettes: a new class of mobile element.** *Microbiology* 141: 3015-3027 (1995)

Reynolds, P.E. a Courvaline, P. (2005): **Vancomycin Resistance in Enterococci Due to Synthesis of Precursors Terminating in D-Alanyl-D-Serine.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(1): 21-25 (2005)

Riesenfeld, C. S., Goodman, R. M. a Handelsmann, J. (2004): **Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotik resistance genes.** *Environmental Microbiology* (2004) 6(9): 981–989

Rice, L. B. **Emergence of Vancomycin-Resistant Enterococci.** *Emerging Infectious Diseases* 7(2) March–April 2001

Rowe-Magnus, D. A. a Mazel, D.(2002): **The role of integrons in antibiotics resistance gene capture.** *Int. J. Med. Microbiol.* 292: 115 - 125 (2002)

Segura, P.A., García-Ac, A., Lajeunesse, A., Ghosh, D., Gagnon, Ch. a Saule, S. (2007) **Determination of six anti-infectives in wastewater using tandem solidphase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry.** *J. Environ. Monit.,* 9: 307–313(2007)

Seydlová, G. a Svobodová, J.(2008): **Review of Surfactin Chemical Properties and the Potential Biomedical Applications.** *Cent. Eur. J. Med.*

Spížek, J. (1999): **Rezistence na antibiotika.** *Vesmír* 78(1), 27-32 (1999)

Stein, T. (2005): **Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions** *Molecular Microbiology* 56 (4), 845–857(2005)

Stokes, H. W., a Hall, R. M. (1989): **A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons.** *Molecular Microbiology* 3(12): 1669-1683 (1989)

Trafton, A. (2008): **Bacterial 'Battle For Survival' Leads To New Antibiotik.**

*PHYSorg.com. 26 Feb 2008. [www.physorg.com/news123243939.html](http://www.physorg.com/news123243939.html)*