MASARYKOVA UNIVERZITA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Detekce, molekulární typizace a celogenomové sekvenování patogenních kmenů enterobakterií ve vodním prostředí

Diplomová práce

DÁVID FEJCZO

Vedoucí práce: doc. RNDr. Monika Dolejská, PhD.

Ústav experimentální biologie
Program Molekulární biologie a genetika

Brno 2025

MUNI
SCI

Bibliografický záznam

Autor: Dávid Fejczo
Přírodovědecká fakulta
Masarykova univerzita
Ústav experimentální biologie

Název práce: Detekce, molekulární typizace a celogenomové sekvenování patogenních kmenů enterobakterií ve vodním prostředí

Studijní program: Molekulární biologie a genetika

Vedoucí práce: doc. RNDr. Monika Dolejská, PhD.

Rok: 2025

Počet stran: 113

Klíčová slova: antibiotika, antibiotická rezistence, Enterobacteriaceae, vodní prostředí

Bibliografický záznam

Autor: Dávid Fejczo
Prírodovedecká fakulta
Masarykova univerzita
Ústav experimentální biologie

Názov práce: Detekcia, molekulárna typizácia a celogenómová sekvenácia patogénnych kmeňov enterobaktérií vo vodnom prostredí

Študijný program: Molekulárna biológia a genetika

Vedúci práce: doc. RNDr. Monika Dolejská, PhD.

Rok: 2025

Počet strán: 113

Kľúčové slová: antibiotiká, antibiotická rezistencia, Enterobacteriaceae, vodné prostredie

Bibliographic record

Author: Dávid Fejczo
Faculty of Science
Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: Detection, molecular typing and whole-genome sequencing of pathogenic strains of enterobacteria from water environment

Degree Programme: Molecular Biology and Genetics

Supervisor: doc. RNDr. Monika Dolejská, PhD.

Year: 2025

Number of Pages: 113

Keywords: antibiotics, antibiotic resistance, Enterobacteriaceae, water environment, aquatic environment

Abstrakt

Rezistence vůči antibiotikům je jedním z nejzávažnějších problémů veřejného zdraví. Infekce způsobené bakteriemi rezistentními vůči antibiotikům se vyznačují vyšší úmrtností a delší dobou léčby. Časté používání antibiotik v humánní a veterinární medicíně přispívá k šíření tohoto problému. Rezistentní bakterie se tak šíří z epicenter používání antibiotik do vodního prostředí prostřednictvím zemědělského a nemocničního odpadu a odpadních vod. V kombinaci s neúčinností čištění odpadních vod se tak vodní prostředí stává ideálním rezervoárem rezistentních bakterií.

Cílem této práce bylo izolovat rezistentní kmeny bakterií rodu *Enterobacteriacae* ze vzorků vody a sedimentu z pěti lokalit a tří časových bodů, které byly následně charakterizovány pomocí vybraných mikrobiologických a molekulárně biologických metod. Izoláty byly nejprve selektivně kultivovány na médiích doplněných vybranými antibiotiky - cefotaximem, ciprofloxacinem, meropenemem a kolistinem. Izoláty byly poté taxonomicky charakterizovány pomocí metody MALDI-TOF. Následně byly izoláty testovány metodou PCR na přítomnost genů rezistence k příslušným antibiotikům. Následně byly nepříbuzné izoláty *Escherichia coli* a *Citrobacter* spp. vybrány pomocí PFGE a dále charakterizovány pomocí testu fenotypové rezistence (MIC) a celogenomového sekvenování.

Celkem bylo získáno 945 izolátů ze vzorků vody a 442 izolátů ze vzorků sedimentu. Nejčastěji detekovanými geny rezistence pomocí PCR byly bla_{CTX-M} a *qnrB*. Geny rezistence ke karbapenemům a kolistinu nebyly zjištěny. Nejvyšší frekvence rezistentních izolátů byla zjištěna v lokalitě E. U vybraných izolátů *E. coli* a *Citrobacter* spp. byla zjištěna rezistence k ceftazolinu u 95,3 % izolátů a k ampicilinu u 81,4 % izolátů. U izolátů *E. coli* byly zjištěny patogenní typy sekvencí jako ST131 nebo ST38. Nejčastěji detekovanými geny pomocí WGS byly *mdf(A)* a bla_{CTX-M}. U izolátů *Citrobacter* spp. byly zjištěny geny *qnrB* a bla_{CMY}.

Abstrakt

Rezistencia voči antibiotikám patrí medzi najzávažnejšie problémy v oblasti verejného zdravia. Infekcie spôsobené baktériami rezistentnými voči antibiotikám sa vyznačujú vyššou úmrtnosťou a dlhšou liečbou. Časté používanie antibiotík v humánnej a veterinárnej medicíne napomáha k šíreniu tohto problému. Rezistentné baktérie sa tak šíria z epicentier používania antibiotík do vodného prostredia pomocou poľnohospodárskeho a nemocničného odpadu a odpadových vôd. V kombinácii s nedostatočnou efektivitou čistenia odpadových vôd je tak vodné prostredie ideálnym rezervoárom rezistentných baktérií.

Cieľom práce bolo zo vzoriek vody a sedimentu izolovať rezistentné bakteriálne kmene *Enterobacteriacae* v piatich lokalitách a troch časových úsekoch, ktoré boli následne charakterizované pomocou vybraných mikrobiologických a molekulárne biologických metód. Izoláty boli najprv selektívne kultivované na médiách s prídavkom vybraných antibiotík – cefotaxim, ciprofloxacín, meropenem a kolistín. Izoláty boli potom taxonomicky charakterizované pomocou metódy MALDI-TOF. Následne boli izoláty pomocou PCR otestované na prítomnosť génov rezistencie voči príslušnému antibiotiku. Následne boli pomocou metódy PFGE vybrané nepríbuzné izoláty *Escherichia coli* a *Citrobacter* spp., ktoré boli podrobnejšie charakterizované fenotypovým testom rezistencie (MIC) a celogenómovou sekvenáciou.

Dohromady bolo získaných 945 izolátov zo vzoriek vody a 442 izolátov zo vzoriek sedimentu. Metódou PCR boli najčastejšie detekované gény rezistencie $bla_{\text{CTX-M}}$ a *qnrB*. Gény rezistencie voči karbapenémom a kolistínu neboli detekované. Najvyššia početnosť rezistentných izolátov bola detekovaná v lokalite E. U vybraných izolátov *E. coli* a *Citrobacter* spp. bola zistená rezistencia na ceftazolín u 95,3 % izolátov a na ampicilín u 81,4 % izolátov. V rámci izolátov *E. coli* boli detekované patogénne sekvenčné typy ako ST131 alebo ST38. Najčastejšie detekovanými génmi pomocou WGS boli *mdf(A)* a bla_{CTX-M}. V rámci izolátov *Citrobacter spp.* boli detekované gény *qnrB* a bla_{CMY}.

Abstract

Antibiotic resistance is one of the greatest threats for public health. Infections caused by antibiotic-resistant bacteria are characterised by higher mortality and longer treatment. Frequent use of antibiotics in human and veterinary medicine is contributing to the spread of this problem. Resistant bacteria are thus spreading from the centres of antibiotic use to the water environment via agricultural and hospital waste and sewage. Combined with a lack of treatment efficiency of wastewater treatment, the aquatic environment is an ideal reservoir for resistant bacteria.

The aim of the work was to isolate resistant *Enterobacteriacae* bacterial strains from water and sediment samples at five locations and three time points, which were subsequently characterized using selected microbiological and molecular methods. Firstly, the isolates were selectively cultured on media supplemented with selected antibiotics - cefotaxime, ciprofloxacin, meropenem and colistin. Isolates were then taxonomically characterized using the MALDI-TOF method. Subsequently, the isolates were tested for the presence of resistance genes to the respective antibiotic. Subsequently, unrelated *Escherichia coli* and *Citrobacte*r spp. isolates were selected by PFGE which were further characterized by phenotypic resistance test (MIC) and whole-genome sequencing.

945 isolates were obtained from the water samples and 442 isolates were obtained from the sediment samples. The most frequently detected genes by PCR were $bla_{\text{CTX-M}}$ and *qnrB*. Carbapenem and colistin resistance genes were not detected. The highest frequency of resistant isolates was detected in site E. Resistance to ceftazolin was detected in 95.3% of and to ampicillin in 81.4% of selected *E. coli* and *Citrobacter* spp. isolates, respectively. Pathogenic sequence types such as ST131 or ST38 were detected within the *E. coli* isolates. The most frequently detected genes by WGS were *mdf(A)* and $bla_{\text{CTX-M}}$. Within Citrobacter spp. isolates, only *qnrB* and bla_{CMY} genes were detected.

MUNI
SCI

MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KOTLÁŘSKÁ 2, 611 37 BRNO
IČ: 00216224
DIČ: CZ00216224

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2024/2025

Ústav:	Ústav experimentální biologie
Student:	Bc. Dávid Fejczo
Program:	Molekulární biologie a genetika
Specializace:	Molekulární biologie a genetika

Ředitel *ústavu* PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s názvem:

Název práce:	Detekce, molekulární typizace a celogenomové sekvenování patogenních kmenů enterobakterií ve vodním prostředí
Název práce anglicky:	Detection, molecular typing and whole-genome sequencing of pathogenic strains of enterobacteria from water environment
Jazyk práce:	slovenština

Oficiální zadání:
Patogenní kmeny Enterobacteriacae jsou významným původcem závažných onemocnění člověka a zvířat. Jejich rostoucí rezistence ke kriticky důležitým skupinám antimikrobiálních látek má obrovské dopady na veřejné zdraví, zemědělství a světovou ekonomiku. Cílem diplomové práce bude prokázat v souboru izolátů patogenní kmeny Enterobacteriaceae, vyšetřit jejich citlivost k antibiotikům a následně za využití metod molekulární biologiie provést jejich detailní charakterizaci.

Vedoucí práce:	doc. RNDr. Monika Dolejská, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Jarmila Laušová
Datum zadání práce:	13. 10. 2022
V Brně dne:	20. 12. 2024

Zadání bylo schváleno prostřednictvím IS MU.

Bc. Dávid Fejczo, 20. 12. 2024
doc. RNDr. Monika Dolejská, Ph.D., 20. 12. 2024
RNDr. Pavel Lízal, Ph.D., 20. 12. 2024

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením vedoucího práce s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

V Brně 9. 1. 2025 Dávid Fejczo

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí mé diplomové práce, doc. RNDr. Monice Dolejské, PhD., za možnost pracovat na tomto projektu a za její projevenou trpělivost. Dále bych rád poděkoval Mgr. Jarmile Laušové za zaškolení a vysvětlení metodik, také za jazykovou korekturu a cenné rady při zpracování práce.

Obsah

Seznam pojmů a zkratek 19

Seznam příloh 22

1 Úvod 23

2 Enterobacteriaceae 24

2.1 Escherichia coli ... 24

2.2 Rod *Citrobacter* ... 25

3 Antibiotika 26

3.1 Mechanizmus účinku antibiotík ... 26

4 Antibiotická rezistencia 32

4.1 Prirodzená a získaná rezistencia ... 32

4.2 Mechanizmy antibiotickej rezistencie ... 33

5 Šírenie antibiotickej rezistencie vo vodnom prostredí 38

5.1 Prenos génov rezistencie do sladkovodného prostredia ... 38

5.2 Výskyt antibiotík a antibiotickej rezistencie v sladkovodnom prostredí ... 39

6 Cieľ práce 40

7 Materiál a metódy 41

7.1 Bakteriálne kmene ... 41

7.2 Kultivačné médiá ... 42

7.3 Chemikálie ... 43

7.4 Komerčné kity ... 43

7.5 Laboratórne prístroje ... 44

7.6 Ostatné pomôcky ... 45

7.7 Odber vzoriek a selektívna kultivácia ... 46

7.8 Identifikácia bakteriálnych druhov pomocou MALDI-TOF ... 47

7.9 Izolácia DNA pre PCR ... 48

7.10 PCR a gélová elektroforéza ... 48

7.11 Pulzná gélová elektroforéza (PFGE) 51
7.12 Fenotypové testy rezistencie 52
7.13 Celogenómová sekvenácia (WGS) 55

8 Výsledky **57**
8.1 Selektívna kultivácia a MALDI-TOF 57
8.2 Detekcia génov rezistencie pomocou PCR 60
8.3 Stanovenie MIC 71
8.4 WGS 74

9 Diskusia **77**

10 Súhrn **80**

11 Summary **81**

Použité zdroje **83**

Príloha A PCR **101**

Príloha B Výsledky MIC **109**

Príloha C Výsledky WGS **110**

Seznam pojmů a zkratek

AAC	–	aminoglykozid acetyltransferáza
AIEC	–	adherentne invazívna *Escherichia coli*
AMK	–	amikacín
AMP	–	ampicilín
AMS	–	ampicilín/sulbaktam
ANT	–	aminoglykozid nukleotidyltransferáza
APH	–	aminoglykozid fosfotransferáza
AZT	–	aztreonam
CAZ	–	ceftazidim
CEF, CTX	–	cefotaxim
CEP	–	cefepim
CFZ	–	ceftazolin
CIP	–	ciprofloxacin
CLSI	–	National Committee for Clinical and Laboratory Standards Institute
CMP	–	chloramfenikol
COL	–	kolistín
CPS	–	cefoperazon/sulbaktam
CPZ	–	cefoperazon
CXM	–	cefuroxim
DAEC	–	difúzne adherentná *Escherichia coli*
DMSO	–	dimetylsulfoxid
EAEC	–	enteroagregatívna *Escherichia coli*
EDTA	–	kyselina etyléndiamíntetraoctová
EIEC	–	enteroinvazívna *Escherichia coli*
EMB	–	„eosin methylene blue“
EPEC	–	enteropatogénna *Escherichia coli*

ERT	–	ertapenem
ESBL	–	„extended spectrum β-lactamase“,
ETEC	–	enterotoxigénna *Escherichia coli*
EUCAST	–	European Commitee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ExPEC	–	extraintestinálne patogénna *Escherichia coli*
G+	–	Gram-pozitívny
G-	–	Gram-negatívny
GEN	–	gentamicín
MALDI-TOF	–	hmotnostná spektrometria doby letu s laserovou desorpciou/ionizáciou za pomoci matrice
MBC	–	minimálna baktericídna koncentrácia
MCA	–	MacConkey agar
MER	–	meropenem
MIC	–	minimálna inhibčná koncentrácia
MLST	–	multilokusová sekvenčná typizácia
MPA	–	mäsopeptónový agar
MRSA	–	meticilín-rezistentný *Staphylococcus aureus*
NET	–	netilmycín
OMF	–	„outer membrane factor“
PBPs	–	„penicillin binding proteins“
PFGE	–	pulzná gélová elektroforéza
PIP	–	piperacilín
PIT	–	piperacilín/tazobaktam
rpm	–	otáčky za minútu
QRDR	–	„quinolone-resistance-determining region“
ST	–	sekvenčný typ
STEC	–	shiga-toxín produkujúca *Escherichia coli*
T/S	–	trimetoprim/sulfometoxazol

TBE	–	Tris-borát-EDTA
TET	–	tetracyklín
TGC	–	tigecyklín
TOB	–	tobramycín
Tris	–	trisaminometán
WGS	–	celogenómová sekvenácia
WHO	–	Svetová zdravotnícka organizácia

Seznam příloh

Přílohy v textu

Příloha A PCR 101

Příloha B Výsledky MIC 109

Příloha C Výsledky WGS 110

1 Úvod

Objavenie antibiotík a ich používanie v klinickej praxi znamenalo veľký prielom v oblasti medicíny. Antibiotiká umožnili efektívne liečiť mnohé infekčné choroby a vykonávať operácie ako transplantácie orgánov alebo operácie srdca (Hutchings et al., 2019). Antibiotiká sa dnes využívajú vo veľkej miere v humánnej aj veterinárnej medicíne a ich používanie stále rastie (Klein et al., 2024).

Nadmerné používanie antibiotík však viedlo k rozšíreniu rezistencie voči antibiotikám. Odhaduje sa, že baktérie rezistentné voči antibiotikám boli v roku 2019 priamo alebo nepriamo zodpovedné za smrť vyše 4,95 milióna ľudí a takisto sa odhaduje, že toto číslo môže do roku 2050 narásť až na 10 miliónov ročne (Murray et al., 2022). V roku 2019 zaradila aj Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) baktérie rezistentné voči antibiotikám medzi jednu z najväčších hrozieb pre zdravie ľudstva (World Health Organization, 2019).

Jednou z rozšírených skupín baktérií rezistentných voči antibiotikám je čeľaď *Enterobacteriacae*. Baktérie z tejto čeľade sú pôvodcami viacerých druhov infekcií zahŕňajúce infekcie močových ciest, zápaly pľúc, infekcie krvného riečišťa. Patogénne kmene *Enterobacteriacae* rezistentné voči antibiotikám sú významnou hrozbou pre verejné zdravie tým, že spôsobujú infekcie s vyššou mortalitou, dlhším pobytom na lôžku a drahšou liečbou (Pana and Zaoutis, 2018).

Baktérie rezistentné voči antibiotikám sa vyskytujú aj v prostrediach ako pôda alebo voda. Zásahmi do prostredia, ako napríklad vypúšťaním odpadovej vody do riek, je ovplyvnené pôvodné prostredie a mikroorganizmy v ňom žijúce. V poslednej dobe sa dostáva do popredia koncept „One Health“ (Jedno zdravie), ktorý spočíva v prepojení a optimalizácii zdravia človeka, zvierat aj ekosystému a ich spojení jedného celku (The Lancet, 2023).

Táto práca si dáva za cieľ izolovať a charakterizovať izoláty *Enterobacteriacae* získané z vody a sedimentu v piatich lokalitách v troch časových úsekoch. Pomocou vybraných mikrobiologických a molekulárne biologických metód bude získaný ich profil antibiotickej rezistencie.

2 Enterobacteriaceae

Enterobacteriaceae je veľká skupina Gram-negatívnych (G-) tyčinkovitých baktérií. Priemerne merajú okolo 2 až 4 µm na dĺžku a 0,4 až 0,6 µm na šírku. Sú nepohyblivé alebo pohyblivé pomocou bičíkov. *Enterobacteriaceae* sú fakultatívne anaeróbne, oxidáza-negatívne a kataláza-pozitívne baktérie. Redukujú dusičnany na dusitany a fermentujú glukózu (Morales-López *et al.,* 2019). Táto čeľaď zahŕňa mnoho rodov ako *Escherichia, Shigella, Salmonella, Enterobacter, Klebsiella* a iné. Členovia čeľade *Enterobacteriaceae* sú zastúpené v rôznych prostrediach – pôda, voda, rastliny, živočíchy. V živočíchoch sa *Enterobacteriaceae* prirodzene nachádzajú v črevnom systéme, väčšina z nich je komenzálna, no niektoré druhy patria medzi klinicky významné patogény, ako napríklad patogénne varianty rodov *Escherichia, Salmonella, Shigella* a *Yersinia* (Kang *et al.*, 2018). Identifikácia členov *Enterobacteriacae* je možná pomocou mnohých biochemických testov, avšak túto metódu postupne nahradila sekvenácia 16S rRNA (Janda *et* Abbott, 2007) a hmotnostná spektrometria doby letu s laserovou desorpciou/ionizáciou za pomoci matrice (MALDI-TOF) (Singhal *et al.,* 2015).

2.1 Escherichia coli

E. coli je zástupcom rodu *Escherichia*, ktorý zahŕňa prevažne pohyblivé bacily z čeľade *Enterobacteriacae* (Nataro *et* Kaper, 1998). Tento druh bol prvýkrát izolovaný a charakterizovaný v roku 1883 Theodorom Escherichom pod názvom *Bacterium coli* commune. Je to prevládajúci fakultatívne anaeróbny druh v ľudskom hrubom čreve. Bežne ide o neškodný komenzálny druh, no niektoré kmene sa ziskom/stratou génov vyvinuli do patogénnych variantov. Patogénne *E. coli* môžu spôsobovať širokú škálu problémov v črevnom systéme, v močových cestách, krvnom obehu aj v centrálnej nervovej sústave (Croxen *et al.,* 2013; Nataro *et* Kaper, 1998).

Črevné patogénne *E. coli* môžeme rozdeliť do niekoľkých hlavných skupín, a to na enteropatogénne (EPEC), shiga-toxín produkujúce (STEC), enteroinvazívne (EIEC), enteroagregatívne (EAEC), difúzne adherentné (DAEC), enterotoxigénne (ETEC) a adherentne

invazívne (AIEC) *E. coli*. Infekcie mimo čriev sú spôsobované extraintestinálne patogénnymi *E. coli* (ExPEC) (Croxen *et al.*, 2013; Russo *et* Johnson, 2000).

Klasickou metódou na identifikáciu kmeňov *E. coli* je sérotypizácia. Kmene sú rozdelené do sérotypov na základe ich somatických (O), kapsulárnych (K) a bičíkových (H) antigénov (Nataro *et* Kaper, 1998). Bežne používanou metódou sa stala multilokusová sekvenčná typizácia (MLST), kde sa sekvenujú tzv. „housekeeping“ gény (*aspC, clpX, fadD, icdA, lysP, mdh, uidA*) a podľa unikátnych alel je ku kmeňu priradený sekvenčný typ (ST) (Croxen *et al.,* 2013; Lacher *et al.,* 2007).

2.2 Rod *Citrobacter*

Rod *Citrobacter* je súčasťou čeľade *Enterobacteriaceae.* Sú to pohyblivé, fakultatívne aeróbne G- bacily. Ako zdroj uhlíka využívajú citrát. Zvyčajne sa dajú nájsť vo vode, v pôde a ako komenzálne druhy v živočíšnom črevnom systéme (Hawaldar *et* Sadhna, 2019; Janda *et al.*, 1994). U pacientov so zhoršenou imunitou môžu spôsobovať infekcie močových ciest, dýchacích ciest, krvného obehu alebo centrálnej nervovej sústavy (Lipsky *et al.,* 1980; Mohanty *et al.,* 2007). Najčastejšie izolovanými druhmi z ľudských vzoriek sú *C. freundii, C. youngae, C. braakii* a *C. amalonaticus*, ale väčšina infekcií je spojená s *C. koseri* a *C. freundii* (Lavigne *et al.,* 2007). Druhy *Citrobacter* sú v poslednej dobe považované za klinicky významné oportunistické patogény kvôli narastajúcemu počtu infekcií spôsobených ich multirezistentnými kmeňmi (Ramsamy *et al.,* 2020; Santos *et al.,* 2017; Yao *et al.,* 2021). U *C. freundii* existuje takisto typizačná metóda MLST, kde sa sekvenuje 7 génov (*aspC, clpX, fadD, mdh, arcA, dnaG, lysP*) (Bai *et al.,* 2012).

3 Antibiotika

Používanie látok s antimikrobiálnym účinkom proti infekciám má svoj pôvod už u starovekých civilizácií, ako Egypt alebo Čína. Tieto staroveké liečivá boli prevažne extrakty z rastlín alebo plesne (Gould, 2016). Objav penicilínu v roku 1928 bol tzv. odrazovým mostíkom pre „zlatú éru“ antibiotík po 2.svetovej vojne, kde bolo identifikovaných mnoho tried antibiotík, ktoré sa používajú až dodnes. V tejto dobe bol aj definovaný význam slova „antibiotikum“ – malá molekula pôvodom z mikroorganizmu, ktorá zabraňuje rastu ostatných mikroorganizmov (Clardy *et al.,* 2009).

Účinok antibiotík môže byť **bakteriostatický** alebo **baktericídny**. Antibiotiká s baktericídnym účinkom spôsobujú smrť baktérie, zatiaľ čo bakteriostatické antibiotiká inhibujú ich rast. Medzi baktericídne antibiotiká patria napr. chinolóny, β-laktámy, aminoglykozidy, glykopeptidy a polymyxiny. Zástupcami tried bakteriostatických antibiotík sú tetracyklíny, sulfonamidy či makrolidy.

Vyhodnotenie účinku antibiotík je možná pomocou **MIC** (minimálna inhibičná koncentrácia) – je to najnižšia koncentrácia antibiotika, ktorá zabraňuje viditeľnému rastu bakteriálnych kolónií na médiu. **MBC** (minimálna baktericídna koncentrácia) je minimálna koncentrácia antibiotika, ktorá spôsobuje smrť baktérie. Antibiotikum je tým viac baktericídne, čím sú si MIC a MBC bližšie. Hraničné MIC sú určené EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) a CLSI (National Committee for Clinical and Laboratory Standards Institute) (M. Patil *et* Patel, 2021; Pankey *et* Sabath, 2004).

3.1 Mechanizmus účinku antibiotík

V dnešnej dobe je objavených mnoho tried antibiotík, ktoré sa líšia svojou chemickou štruktúrou a účinkom. Podľa mechanizmu účinku môžeme antibiotiká rozdeliť do piatich skupín, ktoré sú popísané v nasledujúcich podkapitolách.

3.1.1 Inhibícia syntézy proteínov

Antibiotiká inhibujúce syntézu proteínov cielia na bakteriálne ribozómy – po transkripcii sa mRNA oddelí od DNA templátu a pripojí sa na ribozóm. Použitím antibiotika s týmto účinkom je možné zastaviť proteosyntézu.

Tieto antibiotiká môžeme rozdeliť na 2 skupiny – cieliace na 30S alebo 50S podjednotku ribozómu.

Medzi triedy antibiotík cieliace na 30S podjednotku patria aminoglykozidy a tetracyklíny (Halawa *et al.*, 2024).

Aminoglykozidy sa do bakteriálnej bunky dostávajú pomocou ich pozitívneho náboja, čo spôsobuje tvorbu pórov v bunkovej stene. (Hancock *et al.,* 1991) Cieľom aminoglykozidov je 16S rRNA (Vicens *et* Westhof, 2003). Základnou štruktúrnou jednotkou je aminoalkohol 2-deoxystreptamín, na ktorý sú glykozidovými väzbami naviazané 2 až 3 cukrové zvyšky (Stead, 2000). Do tejto triedy antibiotík patria napríklad streptomycín, neomycín, kanamycín či tobramycín. Tieto antibiotiká sú účinné proti *E. coli, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes, Proteus* spp. či *Serratia* spp. (Landman *et al.,* 2010).

Tetracyklíny sa viažu na 30S podjednotku ribozómu a inhibujú syntézu proteínov tým, že blokujú naviazanie tRNA s aminokyselinou na A-miesto ribozómu. Táto trieda antibiotík je používaná od 40. rokov 20. storočia a boli to prvé širokospektrálne antibiotiká (Brodersen *et al.,* 2000). Do tejto triedy patrí napríklad tetracyklín, oxytetracyklín či doxycyklín.

Medzi skupiny antibiotík, ktoré sa viažu na 50S podjednotku patria **makrolidy** – makrocyklické zlúčeniny majúce štruktúru laktónového kruhu, ktorý obsahuje 12 až 16 atómov uhlíka. Do tejto triedy patrí napríklad erytromycín, azitromycín či klarithromycín. Antibiotiká tejto skupiny sa vyznačujú slabšou aktivitou proti G- baktériám (Kricker *et al.,* 2021).

3.1.2 Inhibícia syntézy nukleových kyselín

Trieda **fluorochinolónov** sa vyznačuje inhibíciou syntézy DNA, čo sa deje cielením na enzýmy DNA gyrázu a topoizomerázu IV – bakteriálne enzýmy dôležité pre replikáciu DNA

(Levine *et al.*, 1998). Charakteristickou štruktúrou tejto triedy je molekula chinolónu (heterocyklus s dvoma cyklami), ktorá je v prípade fluorochinolónov fluoridovaná na 6. uhlíku. Antibiotiká tejto triedy môžeme ďalej rozdeliť podľa reťazca naviazaného na 7. uhlík na piperazinylové (ciprofloxacin, levofloxacin) – vysoko účinné proti G- baktériám a menej proti Gram-pozitívnym (G+) baktériám, pyrrolidinové (moxifloxacin) a piperidinové (balofloxacin) - proti G- baktériám účinné menej ako piperazinylové, no proti G+ viac (Fàbrega *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2003).

Antibiotiká triedy **rifamycínov** inhibujú syntézu RNA – viažu sa na β-podjednotku DNA-dependentnej RNA polymerázy (Hartmann *et al.*, 1967). Zástupcami tejto triedy sú rifampicin, rifamixin alebo rifabutin, a sú účinné proti mnohým patogénom, ako napríklad mykobaktérie, G+ koky (hlavne stafylokoky a streptokoky), *Clostridium difficile* a istú účinnosť má aj proti niektorým G- baktériám ako *Neisseria meningitides, Neisseria gonorrhoeae* alebo *Haemophilus influenzae* (Jiang *et al.,* 2010; Kunin, 1996; Rastogi *et al.*, 2000).

3.1.3 Inhibícia metabolizmu kyseliny listovej

Látky patriace do triedy **sulfonamidov** majú inhibičný efekt na enzým dihydropteroát syntázu, čo spôsobuje blokáciu syntézy kyseliny listovej. Výsledkom toho je defektná syntéza tymidínu (Chernyshev *et al.*, 2007; Goldstein *et* Proctor, 2008). Štruktúra sulfonamidov je odvodená od kyseliny p-aminobenzénsulfónovej. Tieto látky pôsobia bakteriostaticky a sú aktívne voči širokej škále G+ a G- druhov baktérií, zahrňujúc rody *Streptococcus*, *Staphylococcus, Neisseria, Escherichia, Salmonella, Chlamydia* či *Clostridium.* Látky tejto skupiny sú používané okrem iného aj proti prvokom (napr. *Toxoplasma gondii*) a plesniam (napr. *Pneumocystis carinii*) (Baran *et al.,* 2011).

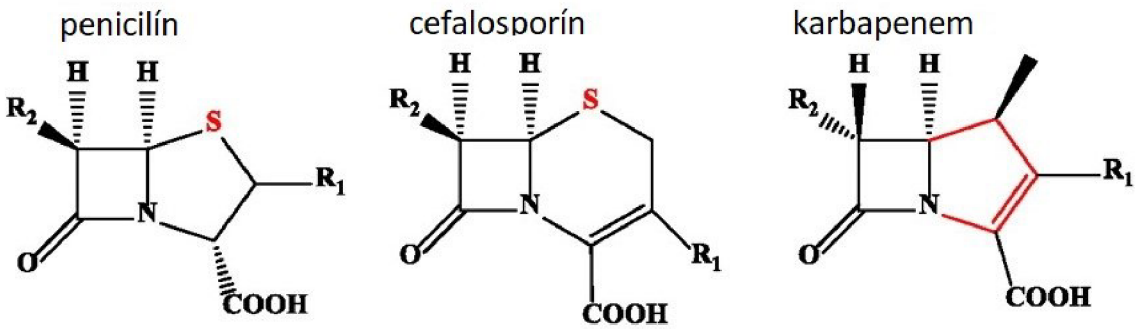
3.1.4 Inhibícia syntézy bunkovej steny

Peptidoglykán je dôležitou súčasťou bakteriálnej bunkovej steny, ktorá bunke zabezpečuje jej tvar a zabezpečuje jej odolnosť voči osmotickému stresu. Štruktúra peptidoglykánu pozostáva z polysacharidov so striedaním N-acetylglukozamínu a kyseliny N-acetylmuramovej, na ktorú sú napojené peptidové reťazce. Tieto reťazce sa môžu navzájom viazať (Vollmer *et al.*, 2008). Dôležitosť peptidoglykánu a komplexnosť jeho syntézy, pri ktorej

spolupracuje veľké množstvo enzýmov, robí z peptidoglykánu vhodný cieľ pre antibiotiká (Sibinelli-Sousa *et al.,* 2021).

Významnou triedou antibiotík cieliacich na peptidoglykán sú **β-laktámy**. Účinok β-laktámov spočíva v naviazaní sa na "penicilin-binding proteins"(PBPs), čo sú enzýmy, ktoré sú činné pri sieťovaní peptidoglykánu – vzájomnom spojení polysacharidových vrstiev pomocou peptidových reťazcov. Potom nastáva strata integrity bunky a môže nastať bunková smrť (Liu *et* Breukink, 2016). β-laktámy sú ďalej rozdelené na penicilíny, cefalosporíny, karbapenémy a monobaktamy. Toto rozdelenie pramení z rozdielnych štruktúr beta-laktámového kruhu (Lima *et al.,* 2020) (*Obr. 1*).

Penicilíny sú charakteristické štruktúrou zlúčeného β-laktámového kruhu s 5-členným kruhom obsahujúcim síru. Prvým penicilínom a zároveň aj β-laktámom bol penicilín G, ktorý objavil A. Fleming v roku 1928. Tento penicilín má úzke antimikrobiálne spektrum a má účinok proti rodom *Streptococcus*, *Staphylococcus, Pneumococcus* a *Bacillus anthracis* (Fleming, 1929; Rammelkamp *et* Keefer, 1943). Širšie spektrum aktivity majú semi-syntetické penicilíny ako ampicilín či amoxicilín. Tie sú aktívne aj proti mnohým G- baktériám *(N. gonorrhoeae, N. meningitidis, Treponema pallidum, E. coli, Salmonela* spp.*, Leptospira* spp.*, Proteus mirabilis)* (Oshiro, 1999). Karboxypenicilíny, ako karbacilín či tikarcilín, sú aktívne aj proti *Pseudomonas aeruginosa* a druhy *Proteus* rezistentné voči ampicilínu. Sú ale menej účinné proti *S. aureus* (Butler *et al.,* 1970). Neskôr vyvinuté ureidopenicilíny (azlocilín, mezlocilín, piperacilín) majú aktivitu aj proti *Serratia marcescens* a *Klebsiella* spp. (Drusano *et al.*, 1984).



Obr. 1: Chemická štruktúra rozličných tried beta-laktámových antibiotík (prevzaté a upravené z Papp-Wallace et al., 2011)

Charakteristickou štruktúrou ***cefalosporínov*** je beta-laktamový kruh spojený so šesťčlenným kruhom obsahujúcim síru (dihydrotiazín). Cefalosporíny sú podľa ich antibakteriálnej aktivity rozdelené na 5 generácií. Cefalosporíny prvej generácie sa vyznačujú silnou aktivitou proti G+ kokom (okrem enterokokov a stafylokokov rezistentných voči meticilínu), avšak ich účinnosť proti G- druhom je nízka. Druhá generácia sa vyznačuje aktivitou proti tým istým druhom ako prvá generácia, doplnenou o niektoré G- druhy (*Klebsiella* a *Proteus*). Tretia generácia má zníženú aktivitu proti G+ kokom, ale majú zvýšenú aktivitu proti G- baktériám (*Pseudomonas aeruginosa*), a často sa využívajú pri liečení G- bakterémií získaných v nemocniciach. Cefalosporíny štvrtej generácie sú oproti tretej účinnejšie proti *Enterobacter* a *Citrobacter* (Fernandes *et al.*, 2013; Paladino *et al.,* 2008). Piata generácia cefalosporínov bola vyvinutá špecificky za účelom cieliť na rezistentné baktérie, hlavne na meticilín-rezistentný *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Fritsche *et al.,* 2008; Gould *et al.*, 2012).

Skupina ***karbapenémov*** má základnú štruktúru beta-laktámový kruh spojený s cyklopenténom. Tieto látky majú najširšie spektrum účinnosti proti G+ aj G- baktériám, čo sa týka beta-laktámov. Prvým karbapenémom bol thienamycín, ktorý bol objavený v kultúre streptomycét, produkovaný konkrétne *Streptomyces cattleya* (Kahan *et al.,* 1979). Ten sa však nepoužíval ako liečivo, a to kvôli jeho nestabilite. Derivát thienamycínu, imipenem, bol stabilnejší a zachovával si antibiotické vlastnosti thienamycínu. Imipenem má vysokú účinnosť proti širokému spektru G- aj G+, aeróbnych aj anaeróbnych baktérií. Nie je však účinný proti druhom ako *Legionella, Chlamydia, Mycoplasma* alebo MRSA (Kahan *et al.*, 1983; Rodloff *et al.*, 2006). Do tejto skupiny patrí okrem imipenemu aj meropenem, ertapenem, či biapenem (Lima *et al.,* 2020).

3.1.5 Porušenie štruktúry bunkovej steny

Antibiotiká zo skupiny **polymyxínov** cielia na lipopolysacharid na povrchu vonkajšej membrány G- baktérií. Kladne nabitá polypeptidová časť antibiotika sa naviaže na záporne nabitý kyselinový zvyšok lipidu A a vytlačí tak Mg^{2+} a Ca^{2+} a tým vonkajšiu membránu destabilizuje (Moore *et al.*, 1986; Nikaido, 2003). Polymyxin B a kolistin sú polymyxíny,

ktoré sú využívané v klinickej praxi. Polymyxíny majú úzke spektrum antimikrobiálnej aktivity, a to hlavne proti G- baktériám z čeľade *Enterobacteriacae*, nevynímajúc *E. coli, Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp. Kolistín je používaný aj proti multirezistentným G- baktériám (*K. pneumoniae, Acinetobacter baumanii, P. aeruginosa*) ako antibiotikum "poslednej voľby" (Poirel *et al.,* 2017).

4 Antibiotická rezistencia

Mikroorganizmus je považovaný za rezistentný, ak dokáže prežiť v koncentrácii antibiotika, ktorá by bežne zastavila rast/zabila ostatné organizmy rovnakého druhu (Kaur Sodhi *et* Singh, 2022). Gény kódujúce rezistenciu voči antibiotikám existovali u baktérií ešte pred začiatkom ich používania, čo ilustruje nález kmeňa *Psychrobacter psychrophilus* rezistentného k streptomycínu a tetracyklínu v sibírskom permafroste (Petrova *et al.*, 2009) alebo multirezistentného kmeňa *Paenibacillus* v izolovanom jaskynnom systéme (Pawlowski *et al.*, 2016).

Po použití antibiotika však nastáva selekčný tlak, ktorý zvýhodňuje baktérie s génmi rezistencie, ktoré ich tak dokážu predať do ďalšej generácie (MacGowan *et* Macnaughton, 2017). Už v roku 1948 boli u pacientov v Británii izolované kmene *Staphylococcus aureus* rezistentné na penicilín (Barber *et* Rozwadowska-Dowzenko, 1948) a kmene *Mycobacterium tuberculosis* rezistentné na streptomycín, ktorý bol v tom istom roku objavený (Crofton *et* Mitchison, 1948).

4.1 Prirodzená a získaná rezistencia

Niektoré druhy baktérií sú prirodzene rezistentné voči určitým skupinám antibiotík. To znamená, že všetky kmene tohoto bakteriálneho druhu budú voči týmto skupinám antibiotík rezistentné (Tenover, 2006). Medzi príklady tohoto fenoménu patrí rezistencia voči vankomycínu u G- baktérií (vankomycín nedokáže prejsť cez vonkajšiu membránu G- baktérií) (Tsuchido *et* Takano, 1988).

Baktérie môžu rezistenciu aj získať, či už mutáciami v chromozóme alebo inkorporovaním mobilných genetických elementov, a to plazmidov alebo transpozónov. Baktéria môže inkorporovať tieto elementy rôznymi spôsobmi: **konjugáciou** (priamy kontakt dvoch buniek spojený s prenosom plazmidu, **transdukciou** (prenos časti DNA pomocou bakteriofága) a **transformáciou** (získaním sekvencie DNA z vonkajšieho prostredia). Tento jav sa nazýva horizontálny prenos génov (Husnik *et* McCutcheon, 2018; MacGowan *et* Macnaughton, 2017).

Bolo zistené, že frekvencia horizontálneho prenosu génov je zvýšená tvorbou biofilmu (Madsen *et al*., 2012) a prítomnosťou ťažkých kovov (Sodhi *et al.*, 2023).

4.2 Mechanizmy antibiotickej rezistencie

4.2.1 Modifikácia cieľovej molekuly

Jedným z mechanizmov antibiotickej rezistencie je zmena cieľovej molekuly antibiotika pomocou mutácií. Funkciou proteínov GyrA a ParC/GrlA je väzba na DNA a práve tieto podjednotky sú cieľovými molekulami chinolónov (Alekshun *et* Levy, 2007). Mutácie v DNA gyráze (skladá sa z proteínov GyrA a GyrB) a topoizomeráze IV (skladá sa z ParC/GrlA a ParE/GrlB) sú príčinou klinicky relevantnej rezistencie k chinolónom (Barnard *et* Maxwell, 2001; Hasan *et al.*, 2021). U G- baktérií sú pravdepodobnejšie mutácie v DNA gyráze, kým u G+ baktérií v topoizomeráze IV. Mutácie týchto podjednotiek, ktoré vedú k rezistencii, sú zväčša lokalizované v QRDR oblasti ("quinolone-resistance-determining region") (Alekshun *et* Levy, 2007). Zníženú citlivosť k β-laktámom spôsobujú mutácie v génoch pre PBPs. Inzercia štyroch aminokyselín (YRIN alebo YRIK) v proteíne PBP3 znižuje citlivosť k aztreonamu u *E. coli* (Helsens *et al.*, 2024). Gény *sul1* a *sul2* kódujú rezistenciu voči sulfonamidom, a to vo forme mutantnej dihydropteorát syntázy, na ktorú sa sulfonamidy nedokážu naviazať (Rådström *et al.*, 1991; Sköld, 2001).

4.2.2 Zníženie permeability bunkovej steny

Pre účinnosť mnohých druhov antibiotík je kľúčové, aby sa dostali cez bunkovú stenu k svojej cieľovej molekule. U G- baktérií to hrá dôležitejšiu úlohu, keďže ich bunková stena sa skladá z dvoch membrán. Takáto bunková stena je menej permeabilná, čo z nej tvorí prirodzenú bariéru proti niektorým antibiotikám (Darby *et al.,* 2023). Vonkajšia membrána G- baktérií obsahuje poríny, čo sú proteínové kanály, ktoré umožňujú vstup hydrofilných molekúl (do veľkosti 600 daltonov) do bunky. Bolo zistené, že u *K. pneumoniae* dochádza modifikáciou porínov k zníženej citlivosti voči karbapenémom. K modifikácii dochádza u porínov OmpK35 a OmpK36 (Wong *et al.*, 2019). U *E. coli* je absencia porínu OmpF

spôsobom rezistencie voči niektorým β-laktámom (aztreonam, cefoxitin, ceftazidim) (Choi *et* Lee, 2019). Modifikácie porínu OmpC majú tiež podiel na zmene citlivosti na cefotaxim (Lou *et al.,* 2011). Porín Omp36 u *Enterobacter aerogenes* má varianty (substitúcie v oblastiach L3, L5 a L6), ktoré sú asociované s rezistenciou voči cefalosporínom (Dé *et al.,* 2001).

4.2.3 Efluxné pumpy

Efluxné pumpy sú transmembránové proteínové komplexy, ktoré pri spotrebe energie transportujú z bunky látky pre ňu toxické. Nachádzajú sa u všetkých bakteriálnych druhov, no ako ochrana proti účinku antibiotík vystupujú hlavne u G- baktérií (Darby *et al.,* 2023). Efluxné pumpy sa skladajú z 3 komponentov – transmembránového transportného proteínu na vnútornej membráne, periplazmového adaptéru a proteínu, ktorý penetruje vonkajšiu membránu („outer membrane factor“, OMF) (Alav *et al.,* 2021). Najrozšírenejší efluxný systém u Enterobacteriaceae je AcrAB-TolC a má široký profil substrátov (zo skupín antibiotík sú to chloramfenikoly, tetracyklíny, chinolóny, makrolidy a β-laktámy) (Nishino *et* Yamaguchi, 2001). U *P. aeruginosa* sa vyskytuje efluxný systém MexAB-OprM, ktorého zvýšená expresia vedie k zníženej citlivosti na niektoré antibiotiká (tetracyklín, chloramfenikol, norfloxacin, benzylpenicilín) (Li *et al.*, 1995). Zvýšená expresia efluxného systému MtrCDE u *N. gonorrhoeae* spôsobená mutáciou transkripčného represoru *mtrR* je dôležitou súčasťou rezistencie na penicilín (Veal *et al.*, 2002) a azitromycín (Shafer, 2018).

4.2.4 Enzymatická modifikácia antibiotika

Rozšírený spôsob antibiotickej rezistencie medzi baktériami je enzymatická modifikácia antibiotík. Aktivita enzýmov nevyžaduje zmenu dôležitých súčastí bunky (ako napr. pri modifikácii cieľovej molekuly antibiotika alebo pri iných mutáciách). Tento spôsob rezistencie sa vyznačuje vyššou biologickou fitness – schopnosť bunky rásť je ovplyvnená menej. Modifikáciu antibiotík môžeme rozdeliť na 2 spôsoby: degradáciu antibiotika (inaktivácia) a modifikáciu pomocou prenosu chemickej skupiny (Darby *et al.,* 2023).

U aminoglykozidov sú miestom modifikácie -OH a -NH_2 skupiny. Tieto skupiny sú modifikované enzýmami aminoglykozid acetyltransferázami (AAC), nukleotidyltransferázami (ANT) a fosfotransferázami (APH).

AAC katalyzujú acetyláciu -NH_2 skupiny aminoglykozidu. Na základe miesta acetylácie skupiny sú rozdelené na AAC(1), AAC(2´), AAC(3) a AAC(6´) (Darby et al., 2023; Ramirez and Tolmasky, 2010). Enzýmy skupiny AAC(6) sú najbežnejšie a sú rozšírené u G+ aj G- baktérií. Nachádzajú sa na chromozómoch aj plazmidoch a často sú súčasťou integrónov alebo transpozónov (Quiroga *et al.,* 2007; Snelling *et al.*, 1993). Enzým AAC(6´)-Ib-cr je okrem aminoglykozidov schopný modifikovať aj niektoré látky zo skupiny chinolónov, ako ciprofloxacin (Ari Robicsek *et al.,* 2006).

ANT katalyzujú prenos adenozínmonofosfátu (AMP) z ATP na -OH skupinu aminoglykozidového antibiotika. Sú rozdelené na 5 skupín, z ktorých sú najrozšírenejšími ANT(6) a ANT(3´´). (Ramirez *et* Tolmasky, 2010).

APH katalyzujú prenos fosfátovej skupiny na molekulu aminoglykozidu. Sú rozdelené do 7 tried : APH(4), APH(6), APH(9), APH(3´), APH(2´´), APH(3´´) a APH(7´´) (Wright, 1999).

Enzymatická degradácia antibiotika je veľmi rozšírený mechanizmus antibiotickej rezistencie. Najvýznamejšími enzýmami sú **β-laktamázy**, ktoré degradujú β-laktámy. Funkcia β-laktamáz spočíva v hydrolýze amidovej väzby v β-laktámovom kruhu (Darby *et al.,* 2023).

Podľa sekvencie proteínu sa β-laktamázy rozdeľujú na kategórie A, C, D a B na základe aminokyselinových motívov. Kat. A, C a D zahŕňa enzýmy, ktoré hydrolyzujú svoje substráty pomocou serínu a kat. B pozostáva z enzýmov, ktoré ku svojej aktivite potrebujú zinok. Na základe funkčnej klasifikácie sa β-laktamázy rozdeľujú na triedu 1 (cefalosporinázy), tr. 2 (serínové β-laktamázy) a tr. 3 (metallo-β-laktamázy) (Bush *et* Jacoby, 2010).

Cefalosporinázy (tr.1 Bush & Jacoby, kat. C podľa Amblera) sa často nachádzajú na chromozómoch *Enterobacteriaceae* (Jacoby, 2009). Ich aktivita proti cefalosporínom je vyššia ako proti benzylpenicilínom a sú aktívne aj proti cefamycínom (cefoxitin). Zvyčajne sú odolné voči inhibícii kyselinou klavulánovou. V mnohých organizmoch (*E. coli, P. aeruginosa, Enterobacter cloacae*) je expresia AmpC cefalosporinázy indukovaná za prístupu k určitému β-laktámu (amoxicilín, ampicilín, imipenem) (Bush *et* Jacoby, 2010; Jacoby,

2009). Zvýšená expresia AmpC v kombinácii so zníženou akumuláciou β-laktámov v bunke dokáže zabezpečiť rezistenciu voči karbapenémom (ertapenem, imipenem) (Bradford *et al.,* 1997; Quale *et al.,* 2006). Medzi ďalších zástupcov tr. 1 patrí okrem AmpC aj GC1 u *E. cloacae* (Nukaga *et al.*, 1995).

Serínové β-laktamázy (tr.2 Bush & Jacoby, kat. A, D podľa Amblera) sú najväčšou triedou β-laktamáz. Táto trieda sa delí na viacero podskupín. Jednou z nich je skupina penicilináz. Penicilinázy sa vyznačujú úzkym spektrom substrátov, konkrétne benzylpenicilín a jeho deriváty (Bush *et* Jacoby, 2010). Často sa vyskytujú v G+ kokoch (*Staphylococcus*, *Enterococcus*) (Kernodle *et al.,* 1989; Zscheck *et* Murray, 1991).

Do triedy 2 patria aj ESBL („extended spectrum beta-lactamases, širokospektrálne β-laktamázy). Väčšina týchto enzýmov patrí medzi typy TEM, SHV alebo CTX-M (Peirano *et* Pitout, 2019). Pôvodné enzýmy sú schopné hydrolyzovať penicilíny a rané generácie cefalosporínov, sú však inhibované tazobaktamom a kyselinou klavulánovou. Enzýmy odvodené od pôvodných majú rozšírené spektrum aj na neskoršie cefalosporíny. (Queenan *et al.,* 2004). Popísaných bolo už 209 enzýmov typu TEM a 204 enzýmov SHV (Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database, 2024).

Enzýmy typu CTX-M sú odvodené od enzýmov kódovaných génom $bla_{CTX\text{-}M}$ na chromozómoch *Kluyvera* spp. Sú rozdelené na 6 hlavných skupín (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-20 a KLUC). CTX-M majú vysokú aktivitu voči cefotaximu, šíria sa rýchlo pomocou inzerčných sekvencií na plazmidoch a tak sú najrožšírenejšou variantou ESBL (D'Andrea *et al.,* 2013).Najrozšírenejšou variantou génu $bla_{\text{CTX-M}}$ je $bla_{\text{CTX-M-15}}$ (Poirel *et al.,* 2019).

OXA enzýmy (oxacilinázy) sú enzýmy s rozšíreným spektrom, ktoré dokážu štiepiť oxacilín a kloxacilín, ale nie sú dobre inhibované kys. klavulánovou. OXA enzýmy sú odvodené z enzýmu OXA-10 a väčšinou sú pôvodom z *P. aeruginosa* (Bradford, 2001). OXA enzýmy s karbapenemázovou aktivitou pochádzajú hlavne z *A. baumannii.* Príkladom je enzým OXA-48, ktorý vykazuje aktivitu voči imipenemu (Walther-Rasmussen *et* Høiby, 2006).

Serínové karbapenemázy sa vyznačujú schopnosťou štiepiť karbapenémy. Najvýznamnejšie a najrozšírenejšie skupiny serínových karbapenemáz sú GES a KPC. Enzýmy týchto

skupín sú rozširované pomocou plazmidov a ich výskyt je celosvetový. SME, IMI a NMC sú menej rozšírené skupiny, ktoré sú kódované chromozomálne (Bush *et* Jacoby, 2010; Rapp *et* Urban, 2012). Enzýmy skupiny GES boli pôvodne klasifikované ako ESBLs, avšak bola u nich pozorovaná merateľná aktivita voči imipenemu (Queenan *et* Bush, 2007). Enzýmy skupiny KPC boli pôvodne izolované z *K. pneumoniae* a dokážu štiepiť všetky druhy β-laktámov. Bolo zistené, že KPC enzýmy dokážu štiepiť aj niektoré inhibítory β-laktamáz, konkrétne kys. klavulánovú, tazobaktam a sulbaktam (Papp-Wallace *et al.,* 2010; Rapp *et* Urban, 2012).

Metallo-β-laktamázy (MBL) (tr. 3 Bush & Jacoby, kat. B podľa Amblera) sú enzýmy, ktoré potrebujú pre svoju aktivitu ión zinku. Dokážu hydrolyzovať karbapenémy, avšak voči aztreonamu majú minimálnu aktivitu a nie sú inhibované kys. klavulánovou alebo tazobaktamom. Sú však inhibované chelatačnými činidlami, ako EDTA (Bush *et* Jacoby, 2010; Marchiaro *et al.*, 2008). Prvé MBL boli objavené ako chromozomálne enzýmy u oportunistických patogénov (Iaconis *et* Sanders, 1990; Lim *et al.,* 1988). Najrozšírenejšie rodiny MBL sú IMP a VIM.

IMP-1 bol objavený v Japonsku u *P. aeruginosa.* Tento enzým bol schopný hydrolyzovať imipenem, penicilíny a širokospektrálne cefalosporíny (Watanabe *et al.*, 1991). IMP-1 a IMP-2 už boli nájdené aj v *Acinetobacter* spp., *Serratia marcescens, C. freundii* alebo *Enterobacter cloacae.* (Queenan *et* Bush, 2007).

VIM-1 a VIM-2 boli izolované v Taliansku (Lauretti *et al.*, 1999), resp. Francúzsku (Poirel *et al.,* 2000). Oba enzýmy boli nájdené v *P. aeruginosa* a ich gény sa nachádzali na integrónoch. V dnešnej dobe je známych viac ako 80 variant rodiny IMP a 60 variant rodiny VIM (Sawa *et al.*, 2020).

V roku 2009 bola u pacienta zo Švédska, ktorý sa vracal z Indie nájdená *K. pneumoniae* produkujúca novú MBL NDM-1, ktorá sa veľmi rýchlo rozšírila do iných organizmov a pomocou selekčného tlaku tak vznikli nové varianty (Johnson *et* Woodford, 2013; Yong *et al.,* 2009). NDM sa tak rozšírili do rôznych krajín vrátane Veľkej Británie (Hornsey *et al.,* 2011), Kanady (Peirano *et al.*, 2011) či Japonska (Chihara *et al.,* 2011). V Českej republike bol prvý výskyt NDM zaznamenaný v roku 2011 (Hrabák *et al.,* 2012).

5 Šírenie antibiotickej rezistencie vo vodnom prostredí

Prírodné ekosystémy majú dôležitú úlohu pri šírení antibiotickej rezistencie, slúžia ako zásobáreň mnohých potenciálnych génov antibiotickej rezistencie (Martínez, 2008). Jedným z týchto ekosystémov sú vodné prostredia, ktoré zohrávajú veľkú úlohu pri šírení antibiotickej rezistencie. Hlavnými zdrojmi prenosu antibiotickej rezistencie do vodného prostredia sú odpadové vody z priemyslu, nemocníc, poľnohospodárstva a chov vodných živočíchov (Alderton *et al.*, 2021).

Dôležitú úlohu v prenose génov rezistencie majú mikroplasty, ktoré sú prítomné vo vodných prostrediach. Baktérie sú schopné adherovať na povrch mikropolyméru a tvoriť biofilm, kde často dochádza k horizontálnemu prenosu génov (Kaur *et al.,* 2022).

5.1 Prenos génov rezistencie do sladkovodného prostredia

Čistiarne odpadových vôd sú vysoko-rizikovým prostredím pre prenos antibiotík a génov rezistencie, kvôli skutočnosti, že väčšina antibiotík používaná v humánnej a veterinárnej medicíne je v nemetabolizovanej forme vylúčená vo forme moču alebo fekálií. Tie sa cez kanalizáciu dostávajú do čistiarne odpadových vôd. Na baktérie v tejto vode pôsobí selekčný tlak spôsobený prítomnosťou antibiotík, kovov a iných zlúčenín a pomocou horizontálneho prenosu génov sa do baktérií dostávajú gény rezistencie (Aminov, 2011; Wang *et al.*, 2020). Antibiotiká spôsobujú selekčný tlak na baktérií aj v subinhibičných koncentráciách (Andersson *et* Hughes, 2012).

Proces čistenia odpadových vôd nedokáže úplne odstrániť antibiotiká, gény rezistencie ani rezistentné baktérie (Zanotto *et al.,* 2016; Zhang *et* Zhang, 2011). Táto voda sa dostáva do riek a jazier a potom sa môže používať v poľnohospodárstve alebo na rekreačné účely (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2015). Týmto spôsobom sa človek dostáva do kontaktu s rezistentnými baktériami pri kúpaní sa, pri vodných športoch, pri práci v poľnohospodárstve alebo pri konzumácii rýb a morských plodov z takto znečistenej vody (Amos *et al.,* 2014; Leonard *et al.,* 2018).

5.2 Výskyt antibiotík a antibiotickej rezistencie v sladkovodnom prostredí

V mnohých riekach je znečistenie závažný problém, čo je práve dôsledkom vypúšťania odpadových vôd do riek. (Maghsodian *et al.*, 2022). Koncentrácia antibiotík vo vodných tokoch, ktoré sú vystavené odpadovej vode z kanalizácie je vyššia ako vo vodných tokoch bez prístupu odpadovej vody (Han *et al.,* 2020). Najvyššie koncentrácie antibiotík v riekach boli zaznamenané v krajinách ako Mexiko, India, Keňa, Nigéria alebo Juhoafrická republika. (Li *et al.,* 2022). Sprievodným efektom je aj akumulácia antibiotík vo vodných organizmoch (Ondarza *et al.,* 2019) a s tým spojené ekologické riziko (Boxall *et al.,* 2012). V prostredí s rozvinutým poľnohospodárstvom je častá prítomnosť sulfonamidov, makrolidov a chinolónov v tkanivách riečnych rýb (Gao *et al.,* 2012; Ondarza *et al.,* 2019).

Medzi často vyskytujúce sa gény rezistencie v sladkých vodách a vo vodnom sedimente patria gény rezistencie voči β-laktámom ($bla_{CTX\text{-}M}$, bla_{TEM}), sulfonamidom (*sul1, sul2, sul3*), fluorochinolónom (*qnrS, oqxA, oqxB, aac(6)-Ib-cr*), makrolidom (*ermB*) a tetracyklínom (*tetA, tetM, tetO, tetW, tetX*) (Dong *et al.*, 2019; Liu *et al.,* 2019; Marti *et al.,* 2013; Pantanella *et al.,* 2020; Proia *et al.,* 2016; Wang *et al.,* 2020).

6 Cieľ práce

Cieľom tejto práce bolo získať súbor izolátov *Enterobacteriacae* z piatich lokalít a troch časových úsekov rezistentných voči klinicky významným skupinám antibiotík – fluorochinolóny, cefalosporíny, karbapenémy a kolistín. Následne bol pomocou vybraných mikrobiologických a molekulárne biologických metód charakterizovaný profil rezistencie k vybraným antibiotikám. Gény rezistencie u izolátov patriacich k druhom *E. coli* a *Citrobacter* boli podrobnejšie preskúmané pomocou celogenómového sekvenovania.

7 Materiál a metódy

7.1 Bakteriálne kmene

Metódy PCR a MIC vyžadujú použitie kontrolných kmeňov ako pozitívnu/negatívnu kontrolu. Zoznam kontrolných kmeňov je uvedený v *Tab.1*.

Názov kmeňa	**Vlastnosti kmeňa**
E. coli CTX-M-1	pozitívna PCR kontrola pre gén bla_{CTX-M}
E. coli CMY-1	pozitívna PCR kontrola pre gén bla_{CMY-1}
E. coli CMY-2	pozitívna PCR kontrola pre gén bla_{CMY-2}
E. coli K1	pozitívna PCR kontrola pre gén bla_{TEM}
E. coli CE 1251	pozitívna PCR kontrola pre gén bla_{SHV}
E. coli M4 (OXA-2)	pozitívna PCR kontrola pre gén bla_{OXA-II}
E. coli M10 (OXA-10)	pozitívna PCR kontrola pre gén bla_{OXA-IV}
E. coli DHA-1	pozitívna PCR kontrola pre gén bla_{DHA}
E. coli ACC-1	pozitívna PCR kontrola pre gén bla_{ACC}
E. coli ACT-1	pozitívna PCR kontrola pre gén bla_{ACT}
E. coli FOX-1	pozitívna PCR kontrola pre gén bla_{FOX}
E. coli Aac6	pozitívna PCR kontrola pre gén *aac(6´)-Ib-cr*
E. coli qnrA	pozitívna PCR kontrola pre gén *qnrA*
E. coli qnrB	pozitívna PCR kontrola pre gén *qnrB*
E. coli qnrC	pozitívna PCR kontrola pre gén *qnrC*
E. coli qnrS	pozitívna PCR kontrola pre gén *qnrS*
E. coli qnrD	pozitívna PCR kontrola pre gén *qnrD*
E. coli qnrE1	pozitívna PCR kontrola pre gén *qnrE1*
E. coli qepA	pozitívna PCR kontrola pre gén *qepA*
E. coli oqxAB	pozitívna PCR kontrola pre gény *oqxA* a *oqxB*
P. aeruginosa IMP-7	pozitívna PCR kontrola pre gén bla_{IMP}
P. aeruginosa VIM-4	pozitívna PCR kontrola pre gén bla_{VIM}

Názov kmeňa	**Vlastnosti kmeňa**
K. pneumoniae OXA-48	pozitívna PCR kontrola pre gén bla_{OXA-48}
K. pneumoniae KPC-3	pozitívna PCR kontrola pre gén bla_{KPC}
A. baumanii NDM-1	pozitívna PCR kontrola pre gén bla_{NDM}
Enterobacter asburiae IMI	pozitívna PCR kontrola pre gén bla_{IMI}
Transformant GES (1144)	pozitívna PCR kontrola pre gén bla_{GES}
E. coli mcr-1 412016126	pozitívna PCR kontrola pre gén *mcr-1*
E. coli KP37	pozitívna PCR kontrola pre gén *mcr-2*
Salmonella enterica SSI-AC261	pozitívna PCR kontrola pre gén *mcr-3*
E. coli pETP1	pozitívna PCR kontrola pre gén *mcr-4*
E. coli mcr-5	pozitívna PCR kontrola pre gén *mcr-5*
E. coli mcr-9	pozitívna PCR kontrola pre gén *mcr-9*
E. asburiae BP16m1	pozitívna PCR kontrola pre gén *mcr-10*
E. coli ATCC 25922	citlivá na všetky testované antibiotiká, negatívna kontrola v testovaní MIC
E. coli DI/B 172	producent ESBL, pozitívna kontrola v testovaní MIC
E. coli CE279	producent inducibilnej Amp-C β-laktamázy, pozitívna kontrola v testovaní MIC
K. pneumoniae 680m/10	producent KPC karbapenemázy, pozitívna kontrola v testovaní MIC

Tab. 1: Zoznam kontrolných kmeňov

7.2 Kultivačné médiá

- mäsopeptónový agar (MPA) (OXOID, V. Británia)
- MacConkey agar (MCA) (OXOID)
- *Klebsiella* ChromoSelect agar (Sigma-Aldrich, USA)

- eosin-methylene blue (EMB) agar (OXOID)
- *E. coli* Brillance agar (OXOID)

7.3 Chemikálie

Antibiotiká:

- cefotaxim (Sigma-Aldrich)
- ciprofloxacin (Sigma-Aldrich)
- meropenem trihydrát (Sigma-Aldrich)
- kolistin sulfát (Sigma-Aldrich)

PCR a gélová elektroforéza a PFGE:

- Combi PPP Master Mix (Top-Bio, ČR)
- PCR Ultra H_2O (Top-Bio)
- PCR primery (viď Príloha B)
- dimetylsulfoxid (Sigma-Aldrich, USA)
- Midori Green (Nippon Genetics Europe, Nemecko)
- 100 bp DNA Ladder (Central European Biosystems, ČR)
- SeaKem LE Agarose (Lonza, Švajčiarsko)
- EDTA (sodná soľ) (Sigma-Aldrich)
- kyselina boritá (Sigma-Aldrich)
- tris(hydroxymetyl)aminometán (Sigma-Aldrich)
- destilovaná voda

Ostatné chemikálie:

- síran zinočnatý ($ZnSO_4$) (Sigma-Aldrich)
- hydrogenuhličitan sodný ($NaHCO_3$) (Penta, ČR)
- kyselina α-kyano-4-hydroxyškoricová (Merck, Nemecko)

7.4 Komerčné kity

- MIC GN1 (Diagnostics, Slovensko)

- MIC GN2 (Diagnostics)
- Macherey-Nagel NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Nemecko)

7.5 Laboratórne prístroje

- analytické váhy Scaltec SPB32
- analytické váhy Sartorius CPA225D
- centrifúga 5415R (Eppendorf, Nemecko)
- centrifúga 5425 (Eppendorf)
- denzitometer Densi-La-Meter II (ERBA, Nemecko)
- digestor (Nuvia, ČR)
- DNA/RNA UV dekontaminačný box UVT-S-AR (BIOSAN, Litva)
- elektroforetické vane (Bio-Rad, USA)
- elektronická multikanálová pipeta Matrix (ThermoFisher Scientific, USA)
- hmotnostný spektrometer MALDI-TOF Microflex LT/SH (Bruker, USA)
- chladničky (Liebherr, Nemecko)
- inkubátor LabCompanion IB-25G (JeioTech, Južná Kórea)
- krokovacia pipeta Multipette M4 (Eppendorf)
- laboratórne váhy PFB 600-2M (Kern, Nemecko)
- laminárny box Safe 2020 Class II (ThermoFisher Scientific)
- laminárny box Safe Mate 0,9 Vision (BioAir, Taliansko)
- mikrocentrifúga 3722L (Fisher Scientific, USA)
- mikrovlnná rúra
- mrazničky (Liebherr, Nemecko; New Brunswick Scientific, USA)
- multifunkčný modulárny reader Infinite 200 PRO (Tecan, Švajčiarsko)
- parný sterilizátor Sterilab (BMT Medical Technology, ČR)
- termoblok Digital Heat Block BSH1004 (Benchmark Scientific, USA)
- termocykler Biometra Professional Trio (Analytik Jena, Nemecko)
- termocykler Veriti 96-Well (ThermoFisher Scientific)

- vodná kúpeľ LCB-030S (LabTech, Južná Kórea)
- vodná kúpeľ s trepaním NB-303 (N-BIOTEK, Južná Kórea)
- vortex V1 Plus (BIO-SAN, Litva)
- zdroj elektrického napätia PowerPac 300 Basic (BioRad)

7.6 Ostatné pomôcky

- bakteriologické filtre S-Pak Filters 0,22 µm (Merck Millipore, USA)
- Densi-La skúmavky 15 ml (Gama Group, ČR)
- formy a hrebene na prípravu elektroforetických gélov (BioRad)
- krabičky na skúmavky, mikroskúmavky a PCR stripy
- krycie fólie na PCR jamkové doštičky
- kryoskúmavky CryoPure Tube 1,8 ml (Sarstedt, Nemecko)
- laboratórne sklo (Fisherbrand, USA; Schott Duran, Nemecko; Simax, ČR)
- latexové a nitrilové rukavice
- mikroskúmavky typu Eppendorf 1,5 ml a 2 ml (Eppendorf)
- nožnice
- PCR jamkové doštičky (Biologix, Čína)
- PCR stripy (Biologix)
- Petriho misky (priemer 90 mm)
- plastové zámky na mikroskúmavky
- sterilné jednorazové plastové kľučky (Biologix)
- sterilné Pasteurove pipety (Copan, Taliansko)
- sterilné špičky pre krokovaciu pipetu (Eppendorf)
- sterilné špičky k automatickým pipetám (Top-Line, Nemecko; Neptune Scientific, USA)
- sterilné vatové tampóny
- stojany na skúmavky a mikroskúmavky

7.7 Odber vzoriek a selektívna kultivácia

Vzorky boli odoberané v piatich lokalitách v Prahe v troch časových obdobiach (6/2022, 8/2022, 10/2022).

Lokality odberu :

Retenčná nádrž Říčanka v blízkosti malej čistiarne odpadových vôd (A)

Prírodné kúpalisko Eliška (B)

V pískovně (C)

Kyjský rybník (D)

Breh Vltavy (E)

Z lokalít B a D boli vzorky odobrané iba počas 1. a 3. odberu a z lokality E počas 2. a 3. odberu.

Vzorky vody:

Boli odobrané 2 l povrchovej vody do sterilnej sklenenej fľaše. Vzorky boli uchované v ľade a prevezené do laboratória. Vzorky boli prefiltrované cez bakteriologický filter a filter bol prenesený na misky s médiami s prídavkom antibiotík (ciprofloxacin v koncentrácii 0,05 mg/l, cefotaxim 2 mg/l, meropenem 0,125 mg/l, kolistín 3,5 mg/l). Do média s meropenemom bol pridaný $ZnSO_4$ (100 mg/l) pre rast baktérií produkujúcich metallo-β-laktamázy a $NaHCO_3$ (4,2 g/l) pre rast baktérií produkujúcich β-laktamázu OXA-48.

Misky boli potom inkubované pri 37 °C 24 h.

Médiá: E. coli Brillance agar (+ ciprofloxacín, meropenem, alebo cefotaxim) – selekcia koliformných baktérií

Klebsiella ChromoSelect agar (+ ciprofloxacín, meropenem alebo cefotaxim) – selekcia *Klebsiella*

EMB agar (+ kolistín) – selekcia *E. coli*

Vzorky sedimentu:

1 g odobranej pôdy bol zmiešaný s 5 ml fyziologického roztoku. Vzorky boli v laboratóriu vyočkované na Petriho misky s médiom. Kultivačné média a koncentrácie antibiotík v médiách boli rovnaké ako u vzoriek vody. Na 1 misku bol vyočkovaný 1 ml suspenzie. Misky boli potom inkubované pri 37 °C 24 h.

Prečistenie a zamrazenie kultúr:

Po inkubácii misiek s izolátmi boli misky opticky vyhodnotené na rast bakteriálnych kolónií. Z každej misky boli potom preočkované kolónie morfologicky podobné *E. coli* poprípade iným zástupcom *Enterobaceriacae* na misku s MCA s prídavkom antibiotika v rovnakej koncentrácii, na ktorom bol daný izolát selektívne kultivovaný. Misky boli následne uložené do inkubátora a inkubované 24 h pri 37 °C. Na ďalší deň boli kultúry zamrazené. Pomocou sterilného vatového tampónu bolo odobraté čo najväčšie množstvo kultúry a prenesené do kryoskúmavky s kryoprotektívnym médiom. Skúmavky s kultúrami boli uchované v -80 °C.

7.8 Identifikácia bakteriálnych druhov pomocou MALDI-TOF

Na identifikáciu bakteriálneho druhu v izolátoch bola použitá metóda MALDI-TOF. Izoláty boli deň predtým vyočkované na misky s MPA a antibiotikom, na ktorom boli selektívne kultivované. Misky boli inkubované v 37°C 24 hodín.

Nasledujúci deň prebehlo samotné prístrojové meranie. Z misky s izolátom bolo špáradlom nanesené malé množstvo bakteriálnej kultúry na doštičku. Na bakteriálnu kultúru bol potom napipetovaný 1µl matrice (kyselina α-kyano-4-hydroxyškoricová). Tieto kroky boli zopakované pre všetky izoláty v rámci jedného merania.

Po zaschnutí matrice bola doštička s kultúrami vložená do hmotnostného spektrometra (MALDI-TOF Microflex LT/SH, Bruker, USA). Pomocou pripojeného PC bolo meranie

zapnuté a následne vyhodnotené pomocou referenčnej knižnice Maldi Biotyper Library (Bruker, USA).

7.9 Izolácia DNA pre PCR

DNA pre PCR bola vykonaná metódou lýzy bakteriálnych buniek varom. Izoláty boli deň predtým vyočkované na misky s MPA a antibiotikom, na ktorom boli selektívne kultivované. Misky s izolátmi boli inkubované v 37°C 24 hodín.

Následne bola z misky odobraná plná kľučka bakteriálnej kultúry, ktorá bola resuspendovaná v 500µl sterilnej destilovanej vody v 1,5 ml skúmavke typu Eppendorf a zvortexovaná. Tento postup bol zopakovaný pre všetky izoláty, u ktorých bola DNA izolovaná v danom dni. Potom boli skúmavky poistené pomocou plastového zámku, ktorý bránil otvoreniu skúmavky vplyvom vysokej teploty. Následne boli skúmavky vložené do termobloku vyhriateho na 100°C na dobu 10 minút. Po vychladnutí boli zo skúmaviek odstránené zámky a skúmavky boli odstreďované na 13000 rpm 2 minúty. Do novej sterilnej skúmavky bolo prepipetovaných 400 µl supernatantu obsahujúceho DNA. Izolovaná DNA bola následne skladovaná pri teplote -20°C.

7.10 PCR a gélová elektroforéza

7.10.1 PCR

Izoláty boli testované metódou PCR na prítomnosť génov rezistencie v závislosti na pôde s prídavkom antibiotika, na ktorej boli selektívne kultivované. V prípade kultivácie na pôde s prídavkom cefotaximu (CEF) boli našimi génmi záujmu ESBL a AmpC β-laktamázy, v prípade prídavku ciprofloxacinu (CIP) sú to plazmidovo prenášané gény pre rezistenciu voči fluorochinolónom, v prípade meropenému (MER) karbapenemázy a v prípade kolistínu (COL) plazmidovo prenášané gény pre rezistenciu voči kolistínu (*Tab. 1*).

Antibiotikum	Gény rezistencie
CEF	*bla_{CTX-M}, bla_{CMY-1}, bla_{CMY-2}, bla_{TEM}, bla_{SHV}, $bla_{OXA-2\ group}$, $bla_{OXA-4\ group}$, bla_{DHA}, bla_{ACC}, bla_{ACT}, bla_{FOX}*
CIP	*aac(6´)-Ib-cr, qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS, qnrE1, qepA, oqxA, oqxB*
MER	*bla_{IMP}, bla_{VIM}, bla_{OXA-48}, bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{IMI}, bla_{GES}*
COL	*mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4, mcr-5, mcr-6, mcr-7, mcr-8, mcr-9, mcr-10*

Tab. 1 : Súhrn génov rezistencie testovaných metódou PCR

Kvôli urýchleniu práce a ušetreniu nákladov boli izoláty testované v tzv. „pooloch“ (zmesná DNA z 5 vzoriek). Na vytvorenie „poolu“ bolo do jednej skúmavky typu Eppendorf napipetovaných po 20 µl DNA z piatich vzoriek. V prípade pozitívnej reakcie bol daný „pool“ rozbalený – vzorky boli následne otestované jednotlivo. V reakcii bol využívaný predpripravený master mix (Combi PPP Master Mix, Top-Bio, ČR), ktorý obsahuje Taq polymerázu, reakčný pufor (2x koncentrované) a farbivo. Zoznam PCR primerov a PCR programy sa nachádzajú v prílohe B.

<u>Rozpis reaktantov pre PCR v „pooloch“:</u>

6,25 µl master mix

3,25 µl H_2O (PCR Ultra H_2O, Top-Bio, ČR)

0,5 µl forward primer (10 µM)

0,5 µl reverse primer (10 µM)

2,5 µl zmesná DNA

<u>Rozpis reaktantov pre PCR jednotlivých vzoriek :</u>

6,25 µl master mix

4,75 µl H_2O (PCR Ultra H_2O, Top-Bio, ČR)

0,5 µl forward primer (10 µM)

0,5 µl reverse primer (10 µM)

1 µl DNA

PCR pre detekciu génu *qepA* vyžaduje prídavok 1,25 µl dimetylsulfoxidu (DMSO), teda pri tejto reakcii bol objem H_2O o 1,25 µl nižší.

Reaktanty pre PCR sa skladujú v teplote -20 °C, takže ako prvé ich bolo potrebné rozmraziť. Najprv bola namiešaná zmes master mixu, vody a primerov (viď rozpis vyššie). Bolo potrebné pripraviť vyšší objem zmesi z dôvodu potreby pozitívnej a negatívnej kontroly a objemovej rezervy. Reakčná zmes bola potom homogenizovaná na vortexe a na krátko odstredená na malej centrifúge. Zmes bola následne prepipetovaná do PCR stripov, poprípade PCR jamkových doštičiek.

Do stripov (doštičiek) so zmesou bola pridaná DNA. Ako negatívna kontrola bola použitá voda, a ako pozitívna kontrola bola použitá DNA bakteriálneho kmeňa s prítomnosťou daného génu, overeného sekvenáciou. Takto pripravená reakčná zmes bola prenesená do termocyklera, kde bol zvolený program odpovedajúci danému génu (viď Príloha B). Po dokončení reakcie boli produkty umiestnené do chladničky alebo rovno použité na gélovú elektroforézu.

7.10.2 Gélová elektroforéza

Pomocou gélovej elektroforézy vieme zviditeľniť výsledky PCR.

Najprv bola pripravená forma na agarózový gél. Forma slúži na tuhnutie gélu, nasadenie hrebienkov na miesto na forme zabezpečuje tvorbu jamiek, do ktorých sa pipetujú produkty PCR. Agarózový gél (1,5%) bol pripravený v objeme závislom na veľkosti formy.

Do Erlenmeyerovej banky bol naliaty 1x koncentrovaný TBE (tris-borát-EDTA) pufor a doň bola pridaná agaróza. Zmes bola následne rozvarená v mikrovlnnej rúre po dobu ~3 min. Dostatočne uvarený gél bolo možné spoznať tak, že v ňom nebolo vidieť žiadne kryštáliky agarózy. Po uvarení bol gél schladený na ~60 °C a následne doň bolo pridané interkalačné farbivo Midori Green (Nippon Genetics Europe, Nemecko). Farbivo Midori Green slúži ako menej karcinogénna a mutagénna náhrada etídiumbromidu pri vyhodnocovaní elektroforézy pod UV svetlom. Gél bol následne preliaty do formy v boxe s cirkuláciou vzduchu a nechal sa na 20-30 minút stuhnúť.

<u>Príprava TBE pufru (10X):</u>

60,5 g tris(hydroxymetyl)aminometán (Tris)

4,16 g kyselina etyléndiamíntetraoctová (EDTA)

30,85 g kyselina boritá

1000 ml destilovaná voda

Príprava agarózového gélu (100 ml) :

1,5 g agarózy

100 ml TBE pufru (1X konc.)

100 µl farbiva Midori Green

Po stuhnutí bol gél vo forme prenesený do elektroforetickej vane s TBE pufrom (hladina pufru by mala byť približne 0,5 cm nad gélom). Vzorky DNA boli napipetované do jamiek na géle v objeme 5 µl. Na začiatok a koniec každého radu bol napipetovaný marker (100 bp DNA ladder, Central European Biosystems, ČR) v objeme 3 µl. Elektroforetická vaňa bola následne zapojená do zdroja elektrickej energie. Na zdroji bola zvolená výška elektrického napätia (180V) a doba behu (40 min).

Po ukončení behu bola vaňa odpojená od zdroja a gél bol osvietený UV svetlom v transluminátore (Vilber Lourmat, Francúzsko) a vyhodnotené softvérom na PC (MF-ChemiBIS 3.2). Izoláty s pozitívnym výsledkom pre niektorý z génov boli použité v ďalšom priebehu práce.

7.11 Pulzná gélová elektroforéza (PFGE)

PFGE je metódou pre určenie fylogenetickej príbuznosti jednotlivých izolátov. Jej konečným výsledkom bol výber nepríbuzných izolátov *E.* coli a *Citrobacter* spp., ktorý bol podrobnejšie charakterizovaný metódami MIC a WGS. Na realizácii tejto metódy som sa osobne nezúčastnil.

7.12 Fenotypové testy rezistencie

Fenotypové testy sú používané na zistenie expresie génov rezistencie. V prípade tejto práce boli zvolenými testami stanovenie MIC pre 24 antibiotík pomocou komerčných kitov MIC GN 1 a MIC GN 2 (obe Diagnostics, Slovensko).

7.12.1 Stanovenie MIC

Tieto kity obsahujú 96-jamkové doštičky, na ktorých je v každom stĺpci koncentrácia daného antibiotika stúpajúca zdola hore. Kity MIC GN1 a MIC GN2 obsahujú okrem doštičiek aj skúmavky so suspenzným médiom. MIC sa testujú na tieto antibiotiká/kombinácie antibiotík/kombinácie antibiotikum + inhibítor : ampicilín (AMP), ampicilín/sulbaktam (AMS), cefazolin (CFZ), cefuroxim (CXM), aztreonam (AZT), gentamicín (GEN), amikacín (AMK), kolistín (COL), trimetoprim/sulfametoxazol (T/S), ciprofloxacin (CIP), chloramfenikol (CMP), tetracyklín (TET), piperacilín (PIP), piperaciín/tazobaktam (PIT), cefotaxim (CTX), ceftazidim (CAZ), cefoperazon (CPZ), cefoperazon/sulbaktam (CPS), cefepim (CEP), meropenem (MER), ertapenem (ERT), tigecyklín (TGC), netilmycín (NET) a tobramycín (TOB). Rozdelenie týchto antibiotík do príslušných tried je uvedené v tabuľke nižšie (*Tab.2*).

Trieda antibiotík		
β- laktámy	penicilíny	AMP, AMS, PIP, PIT
	cefalosporíny	CFZ, CXM, CTX, CAZ, CPZ, CPS, CEP
	karbapenemy	MER, ERT
	monobaktamy	AZT
aminoglykozidy		GEN, AMK, NET, TOB
polymyxíny		COL
fluorochinolóny		CIP
tetracyklíny		TET
glycylcyklíny		TGC
sulfonamidy		T/S
amfenikoly		CMP

Tab. 2: Rozdelenie antibiotík na doštičkách MIC GN1 a MIC GN2 do jednotlivých tried

ATB	Ampicilin	Ampicilin/ Sulbaktam	Cefazolin	Cefuroxim	Aztreonam	Gentamicin	Amikacin	Colistin	Trimetoprim / sulfomethoxazol	Ciprofloxacin	Chloramphenicol	Tetracyklin
C(mg/l)	AMP	AMS	CFZ	CXM	AZT	GEN	AMK	COL	T/S	CIP	CMP	TET
A	128 R	128/64 R	16	64 R	16 R	32 R	64 R	16 R	4/76 I	8 R	32 R	32
B	64 R	64/32 R	8	32 R	8 R	16 R	32 R	8 R	2/38 S	4 R	16 R	16
C	32 R	32/16 R	4	16 R	4 I	8 R	16 I	4 R	1/19 S	2 R	8 S	8
D	16 R	16/8 R	2	8 S	2 I	4 I	8 S	2 S	0,5/9,5 S	1 I	4 S	4
E	8 S	8/4 S	1	4 S	1 S	2 S	4 S	1 S	0,25/4,75 S	0,5 S	2 S	2
F	4 S	4/2 S	0,5	2 S	0,5 S	1 S	2 S	0,5 S	0,125/2,38 S	0,25 S	1 S	1
G	2 S	2/1 S	0,25	1 S	0,25 S	0,5 S	1 S	0,25 S	0,064/1,19 S	0,125 S	0,5 S	0,5
H	1 S	1/0,5 S	0,125	0,5 S	0,125 S	0,25 S	0,5 S	0,125 S	0,032/0,6 S	0,064 S	0,25 S	K

Obr. 2: Schéma doštičky MIC GN1 (prevzaté z www.diagnostics.sk)

Vysvetlivky: R – rezistentný, I – intermediárny, S – citlivý, K – kontrola rastu, prevzaté z eucast.org,

ATB	Piperacilin	Piperacilin/ tazobactam	Cefotaxim	Ceftazidim	Cefoperazom	Cefoperazon sulbactam	Cefepim	Meropenem	Ertapenem	Tigecyklin	Netilmicin	Tobramycin
C(mg/l)	PIP	PIT	CTX	CAZ	CPZ	CPS	CEP	MER	ERT	TGC	NET	TOB
A	128 R	128/4 R	8 R	16 R	64	64/32	16 R	16 R	2 R	8 R	16 R	8 R
B	64 R	64/4 R	4 R	8 R	32	32/16	8 R	8 I	1 I	4 R	8 R	4 I
C	32 R	32/4 R	2 I	4 I	16	16/8	4 I	4 I	0,5 S	2 I	4 I	2 S
D	16 I	16/4 I	1	2 I	8	8/4	2 I	2 S	0,25 S	1 R	2 S	1 S
E	8 S	8/4 S	0,5	1 S	4	4/2	1 S	1 S	0,125 S	0,5 R	1 S	0,5 S
F	4 S	4/4 S	0,25	0,5 S	2	2/1	0,5 S	0,5 S	0,064 S	0,25 R	0,5 S	0,25 S
G	2 S	2/4 S	0,125	0,25 S	1	1/0,5	0,25 S	0,25 S	0,032 S	0,125 R	0,25 S	0,125 S
H	1 S	1/4 S	0,064	0,125 S	0,5	0,5/0,25	0,125 S	0,125 S	0,016 S	0,064 R	0,13 S	K

Obr. 3: Schéma doštičky MIC GN2 (prevzaté z www.diagnostic.sk)

Vysvetlivky – viď Obr. 2

Príprava testu MIC:

Na stanovenie MIC boli potrebné 24h kultúry, ktoré boli vyočkované deň predtým. Okrem izolátov boli vyočkované aj kontrolné kmene *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* DI/B 172 (, *E. coli* CE279 a *K. pneumoniae* 680m/10. Do Densila skúmavky boli vložené 2 ml fyziologického roztoku. Do skúmavky bola prenesená bakteriálna kultúra tak, aby bola v skúmavke vytvorená suspenzia s denzitou 0,5 McFarland. Suspenzia bola následne homogenizovaná pomocou vortexu. Do skúmavky so suspenzným médiom bolo napipetovaných 60 µl suspenzie bakteriálnej kultúry. Skúmavka bola následne homogenizovaná a jej obsah preliaty do sterilnej Petriho misky. Z Petriho misky bolo potom pomocou multikanálovej pipety prenesených 100 µl suspenzie do každej jamky na doštičke. Doštička bola potom zabalená do plastového obalu a vložená do termostatu na 24 h pri 37 °C. Na druhý deň boli doštičky s MIC vyhodnotené.

Vyhodnotenie:

Vyhodnocovanie MIC je založené na zmene farby suspenzie v jamke. Modré zafarbenie jamky značí, že baktérie v jamke nerastú a ružové zafarbenie indikuje rast baktérií. Za MIC sa považuje koncentrácia prislúchajúca k prvej jamke, v ktorej baktérie nerastú (zdola hore).

Ak je celý stĺpec modrý, MIC je nižšia ako koncentrácia prislúchajúca spodnej jamke a ak je celý stĺpec ružový, MIC je vyššia ako koncentrácia prislúchajúca vrchnej jamke.

7.13 Celogenómová sekvenácia (WGS)

7.13.1 Izolácia DNA pre WGS

Bakteriálna DNA pre WGS bola izolovaná pomocou komerčného kitu Macherey Nagel NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Nemecko). Produkt obsahuje kolóny, zberné skúmavky, proteinázu K, pufry T1, BW, B3 a B5.

Najprv boli na misky s MPA a príslušným antibiotikom vyočkované izoláty, ktoré boli vybrané na WGS. Misky boli inkubované 24 h pri 37 °C. Ďalej boli pripravené Eppendorf skúmavky a termoblok s trepaním bol nahriaty na 56 °C. Do každej skúmavky bolo napipetovaných 180 µl pufru T1. Potom boli do skúmaviek pridané bakteriálne kultúry. Následne bolo do skúmaviek pridaných 25 µl proteinázy K a zmesi boli premiešané pomocou vortexu. Ďalším krokom bolo vloženie skúmavok do termobloku, kde boli bunky lyzované pri 56 °C/1000 rpm 3 hodiny. Po inkubácii boli vzorky centrifugované 10 s pri 7000 rpm. Ku zlyzovanej kultúre bolo pridaných 200 µl pufru B3 a zmes bola premiešaná vortexom. Následne boli vzorky inkubované v termobloku pri 70 °C/1000 rpm na 20 min.

Po inkubácii boli vzorky centrifugované 1 min pri 13 000 rpm a bola pripravená nová sada Eppendorf skúmaviek. Do novej sady skúmavok bol prepipetovaný supernatant zo starej sady. Následne bolo pridaných 210 µl absolútneho etanolu (99,8%) a zmes bola premiešaná vortexom.

Ďalej bolo pripravené príslušné množstvo kolón a zberných skúmaviek. Obsah každej Eppendorf skúmavky bol prepipetovaný do príslušnej kolóny a kolóna so zbernou skúmavkou boli centrifugované 1 min pri 13 000 rpm. Tekutina v zbernej skúmavke bola potom vyliata a kolóna bola premiestnená do novej zbernej skúmavky.

Kolóna bola následne premytá 500 µl pufru BW a centrifugovaná 1 min pri 13 000 rpm. Tekutina v zbernej skúmavke bola vyliata a kolóna bola potom umiestnená späť do zbernej skúmavky.

Ďalej bola kolóna premytá 600 µl pufru B5 a centrifugovaná 1 min pri 13 000 rpm. Tekutina v zbernej skúmavke bola vyliata a tento premývací krok bol zopakovaný znova. Potom bola tekutina v zbernej skúmavke vyliata a kolóna bola umiestnená do novej zbernej skúmavky.

Kolóna bola následne centrifugovaná 2 min pri 13 000 rpm. Potom bola kolóna vložená do Eppendorf skúmavky a bolo do nej napipetovaných 100 µl PCR vody. Kolóna bola potom inkubovaná v termobloku 5 min pri 56 °C. V ďalšom kroku bola kolóna centrifugovaná 2 min pri 12 000 rpm. Supernatant bol potom premiestnený do novej Eppendorf skúmavky. U izolovanej DNA bola potom odmeraná koncentrácia a kvalita na multifunkčnom modulárnom readeri Infinite 200 PRO.

7.13.2 Spracovanie a analýza sekvenačných dát

Samotná WGS bola vykonaná v externej firme technológiou Illumina HiSeq. Primárnu anlýzu sekvenačných dát vykonala Mgr. Jarmila Laušová. Sekvenačné dáta boli upravené a spracované pomocou programu Trimmomatic (Bolger *et al.,* 2014) a SPAdes (Prjibelski *et al.,* 2020).

Na detekciu génov rezistencie u osekvenovaných izolátov bol použitý nástroj ResFinder (Bortolaia *et al.,* 2020). Detekcia plazmidov bola vykonaná pomocou nástroja PlasmidFinder (Carattoli *et al.,* 2014). Zhoda identity génu/plazmidu a percento pokrytia bolo nastavené na 90 %.

Sekvenčný typ izolátov bol stanovený porovnaním alel génov podľa schémy pre *E. coli* (Lacher *et al.,* 2007) a *Citrobacter* spp. (Bai *et al.,* 2012) s databázou PubMLST (Jolley *et al.,* 2018).

8 Výsledky

8.1 Selektívna kultivácia a MALDI-TOF

Na selektívnej kultivácii som spolupracoval s Mgr. Jarmilou Laušovou. Celkové výsledky kultivácie sú uvedené pre úplnosť a možnosť porovnania jednotlivých lokalít. Ďalej pri testovaní PCR som pracoval s celým súborom izolátov.

Vzorky vody:

Dohromady bolo získaných 945 izolátov zo vzoriek vody. Na pôde s prídavkom CEF bolo získaných 246, s prídavkom CIP 238, s prídavkom MER 263 a s prídavkom COL 198 izolátov.

Antibiotikum/odber	**Lokalita**					
CEF	A	B	C	D	E	Spolu
1. odber	19	12	30	20	0	81
2. odber	25	0	13	0	18	56
3. odber	16	20	19	19	35	109
CIP	A	B	C	D	E	Spolu
1. odber	19	17	15	16	0	67
2. odber	20	0	29	0	20	69
3. odber	19	20	20	20	23	102
MER	A	B	C	D	E	Spolu
1. odber	30	29	28	22	0	109
2. odber	18	0	24	0	16	58
3. odber	20	17	20	20	19	96
COL	A	B	C	D	E	Spolu
1. odber	12	10	16	14	0	52
2. odber	17	0	29	0	20	66
3. odber	12	19	12	19	18	80

Tab. 3: Celkový súhrn izolátov zo vzoriek vody

Vzorky sedimentu:

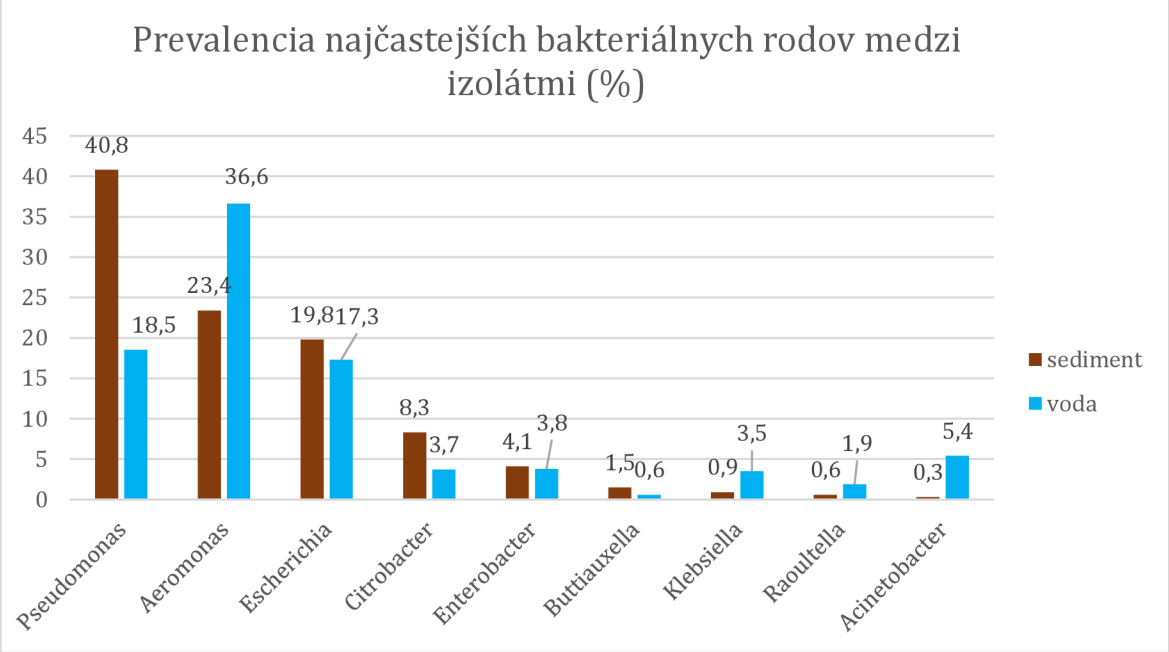
Dohromady bolo získaných 442 izolátov zo vzoriek sedimentu. Na pôde s prídavkom CEF bolo získaných 111 izolátov, s prídavkom CIP 145, s prídavkom MER 68 a s prídavkom COL 129 izolátov.

Antibiotikum/odber	**Lokalita**					
CEF	A	B	C	D	E	Spolu
1. odber	7	10	6	6	0	29
2. odber	13	0	11	0	8	32
3. odber	13	15	14	4	4	50
CIP	A	B	C	D	E	Spolu
1. odber	5	9	7	10	0	31
2. odber	15	0	13	0	15	43
3. odber	14	13	14	15	15	71
MER	A	B	C	D	E	Spolu
1. odber	9	10	8	8	0	35
2. odber	8	0	9	0	6	23
3. odber	0	0	0	5	5	10
COL	A	B	C	D	E	Spolu
1. odber	6	12	4	7	0	29
2. odber	11	0	12	0	15	38
3. odber	11	15	11	14	11	62

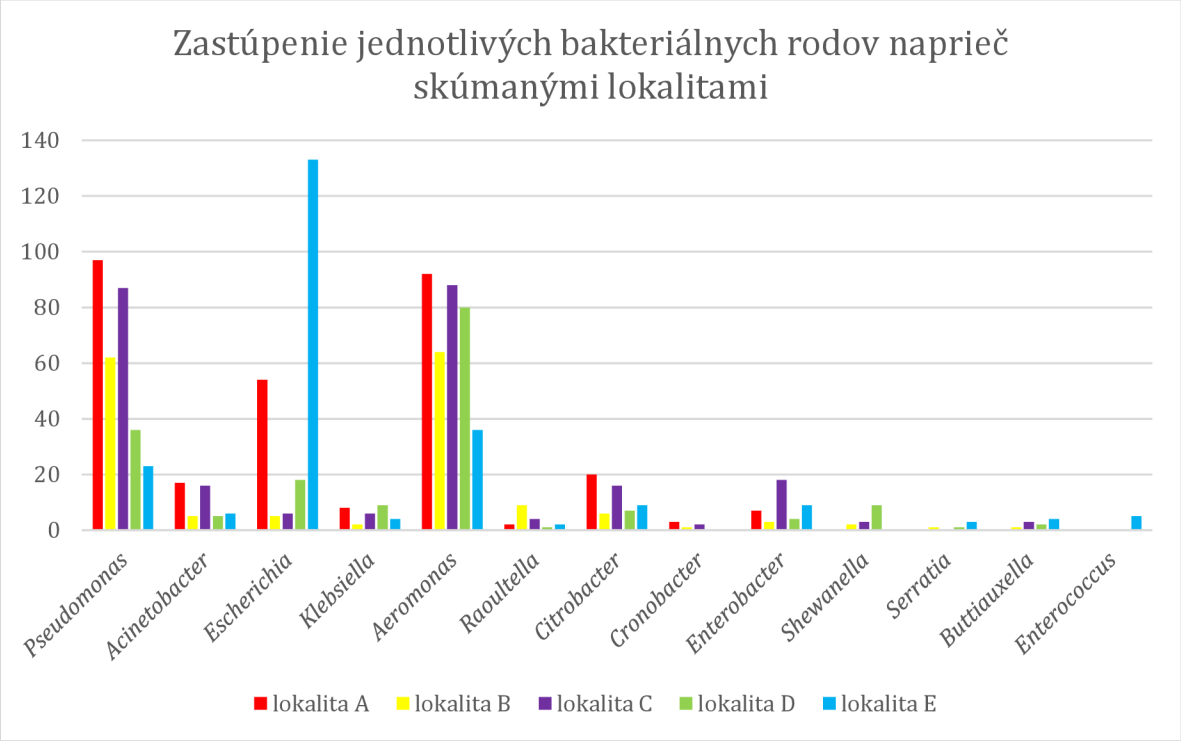
Tab. 4: Celkový súhrn izolátov zo vzoriek sedimentu

Metódou hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF sa podarilo určiť bakteriálny rod u 338 izolátov zo sedimentu a 890 izolátov z vody. Najčastejšími rodmi u izolátov zo sedimentu

boli *Pseudomonas* (n = 138; 40,8%), *Aeromonas* (n = 79; 23,4%), *Escherichia* (n = 67; 19,8%) a *Citrobacter* (n = 28; 8,3%). Medzi izolátmi z vody sa najčastejšie vyskytovali rody *Aeromonas* (n = 326; 36,6%), *Pseudomonas* (n = 181; 18,5%), *Escherichia* (n = 158; 17,3%) a *Acinetobacter* (n = 48; 5,8%) (*Obr. 4*). V lokalitách A až D boli najviac zastúpené rody *Pseudomonas* a *Aeromonas*. V lokalite E bol najčastejšie zastúpeným rodom *Escherichia* (*Obr. 5*)



Obr. 4: Graf prevalencie bakteriálnych rodov medzi izolátmi



Obr.5: Zastúpenie jednotlivých bakteriálnych rodov naprieč skúmanými lokalitami

8.2 Detekcia génov rezistencie pomocou PCR

Pri popise a interpretácii výsledkov som sa zameral na gény rezistencie voči cefalosporínom a chinolónom. Gény rezistencie voči karbapenémom a kolistínu totiž neboli detekované, respektíve boli detekované v zanedbateľnom počte.

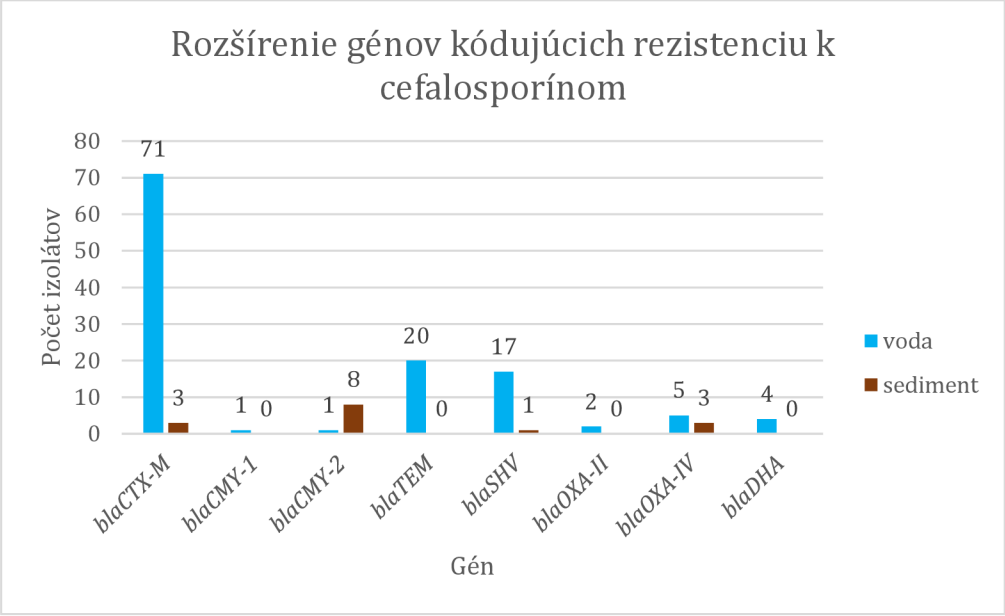
8.2.1 Detekcia génov rezistencie voči cefalosporínom

	Pozitívne izoláty (1 a viac génov)	**Celkový počet izolátov**	**Percento pozitívnych izolátov (%)**
voda	93	236	39,41
sediment	14	99	14,14
spolu	107	335	31,94

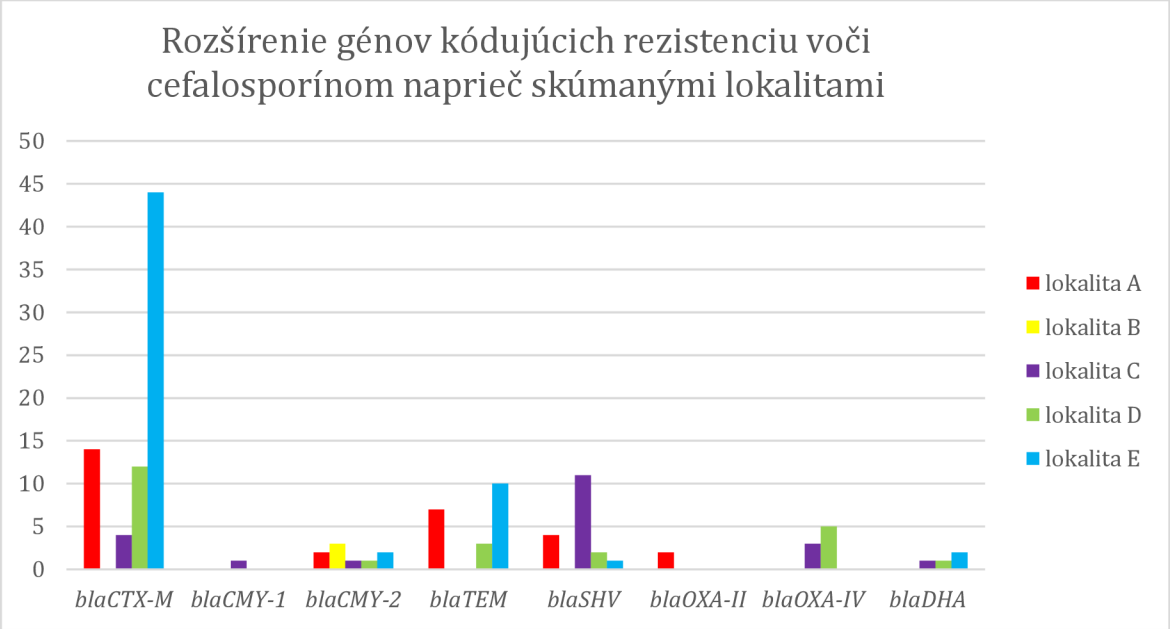
Tab. 5: Tabuľka záchytu izolátov pozitívnych na gény rezistencie voči cefalosporínom

Pomocou metódy PCR bolo nájdených 107 (31,94%) izolátov z celkových 335 s pozitívnym výsledkom aspoň pre 1 gén. Medzi vzorkami z vody ich bolo 93 a medzi vzorkami zo

sedimentu 14 (*Tab. 5*). Najčastejšie detekovanými génmi rezistencie voči cefalosporínom bol bla_{CTX-M} (74 izolátov), bla_{TEM} (20 izolátov) a bla_{SHV} (18 izolátov). Medzi vzorkami z vody bol najčastejšie zachyteným génom bla_{CTX-M} (71 izolátov) a medzi vzorkami zo sedimentu to bol bla_{CMY-2} (8 izolátov) (*Obr.5*).

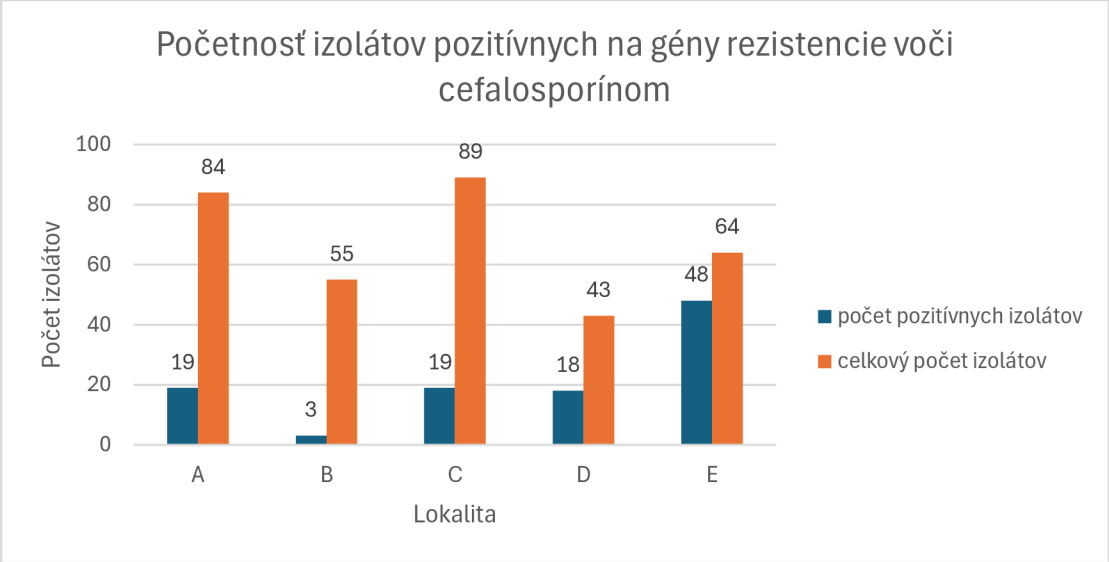


Obr. 5 : Graf rozšírenia génov kódujúcich rezistenciu k cefalosporínom



Obr. 6 : Graf rozšírenia génov kódujúcich rezistenciu voči cefalosporínom naprieč skúmanými lokalitami

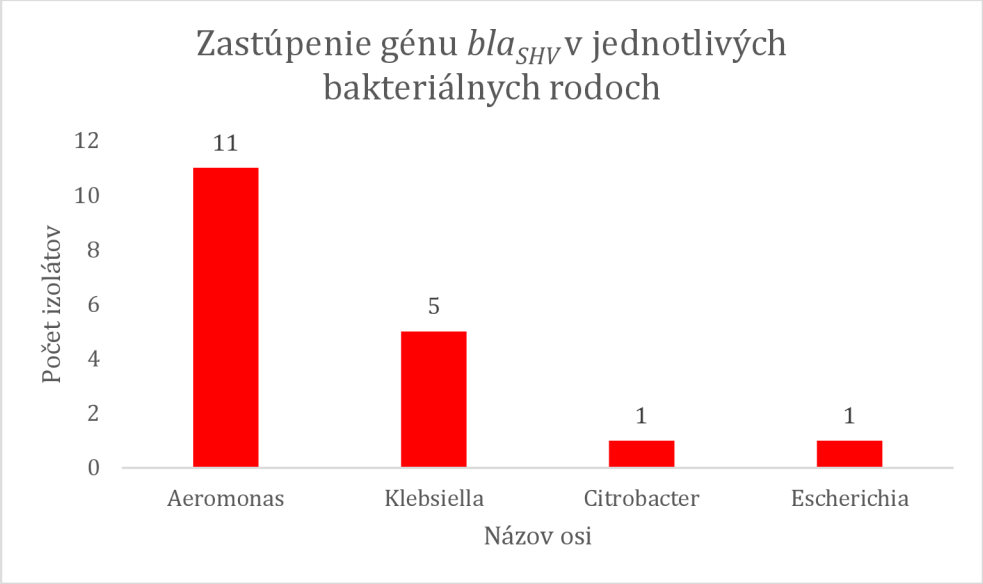
Zameranie na konkrétne lokality ukázalo, že v rôznych lokalitách boli rozšírené rôzne gény rezistencie (*Obr. 6*). V lokalite A bol najčastejšie detekovaným génom $bla_{CTX\text{-}M}$ (14 izolátov), v lokalite B to bol $bla_{CMY\text{-}2}$ (3 izoláty), v lokalite C bla_{SHV} (11 izolátov), v lokalitách D a E to bol $bla_{CTX\text{-}M}$ (D = 12 izolátov, E = 14 izolátov). Gény $bla_{CMY\text{-}1}$ a $bla_{OXA\text{-}II}$ boli detekované iba v jednej lokalite, a to v lokalite C u génu $bla_{CMY\text{-}1}$ a v lokalite A u génu $bla_{OXA\text{-}II}$. Gény bla_{ACT}, bla_{ACC} a bla_{FOX} neboli detekované v žiadnej lokalite. V lokalite E bola zistená najvyššia početnosť izolátov s aspoň jedným génom rezistencie voči cefalosporínom (48 zo 64 izolátov, 75%). Naopak najnižšia početnosť izolátov s aspoň jedným génom rezistencie voči cefalosporínom bola v lokalite B (3 z 55 izolátov, 5,45%) (*Obr. 7*).



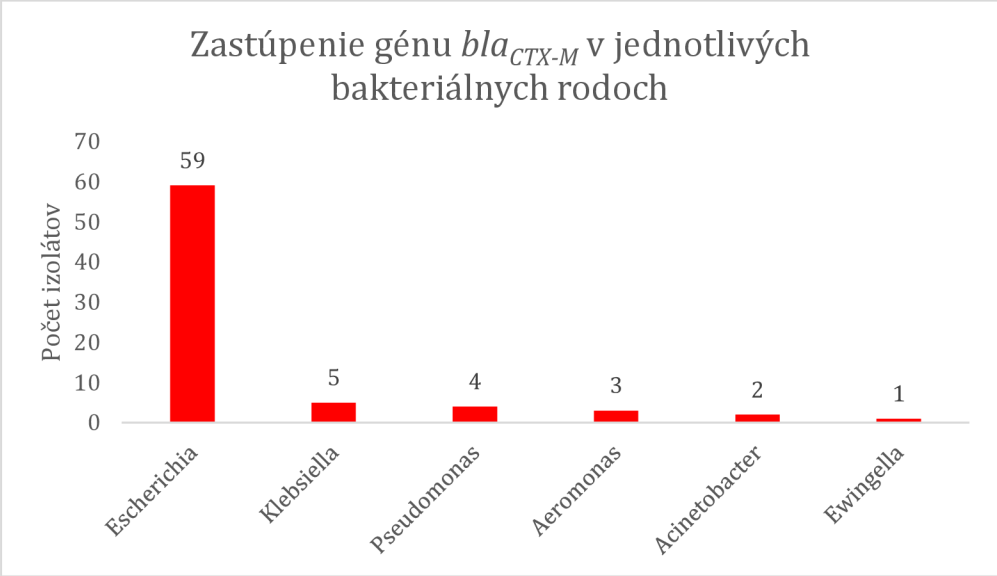
Obr. 7 : Graf početnosti izolátov pozitívnych na gény rezistencie voči cefalosporínom

Z taxonomického hľadiska bol gén bla_{SHV} najčastejšie zastúpený u rodov *Aeromonas* (33,3 % z počtu izolátov rodu *Aeromonas* kultivovaných s prídavkom CEF) a *Klebsiella* (5 izolátov, 100 % z počtu izolátov rodu *Klebsiella* kultivovaných s prídavkom CEF) (*Obr. 8*). Zastúpenie génu $bla_{CTX\text{-}M}$ bolo najvyššie u rodu *Escherichia* (59 izolátov, 89,4 % z počtu izolátov rodu *Escherichia* kultivovaných s prídavkom CEF) a *Klebsiella* (5 izolátov, 100 % z počtu izolátov rodu *Klebsiella* kultivovaných s prídavkom CEF) (*Obr. 9*). Gén bla_{TEM} bol taktiež najčastejšie zastúpený u rodov *Escherichia* (12 izolátov, 16,9 % z počtu izolátov rodu *Escherichia* kultivovaných s prídavkom CEF) a *Klebsiella* (4 izoláty, 80 % z počtu izolátov rodu *Klebsiella* kultivovaných s prídavkom CEF) (*Obr. 10*). Gén bla_{CMY} bol

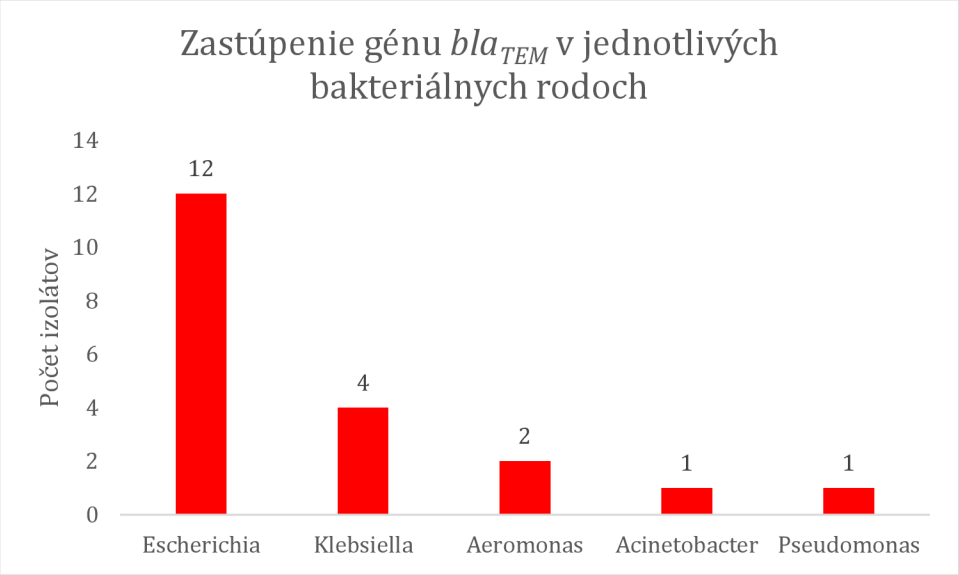
najčastejšie zasúpený u rodu *Pseudomonas* (8 izolátov, 3,9 % z počtu izolátov rodu *Pseudomonas* kultivovaných s prídavkom CEF) (*Obr. 12*).



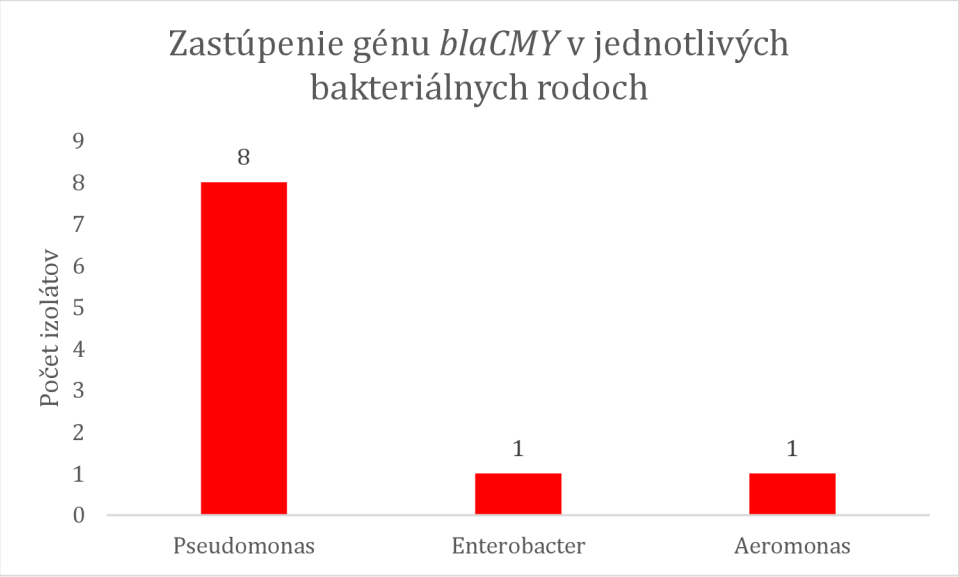
Obr. 8: Graf zastúpenia génu bla_{SHV} v jednotlivých nakteriálnych rodoch



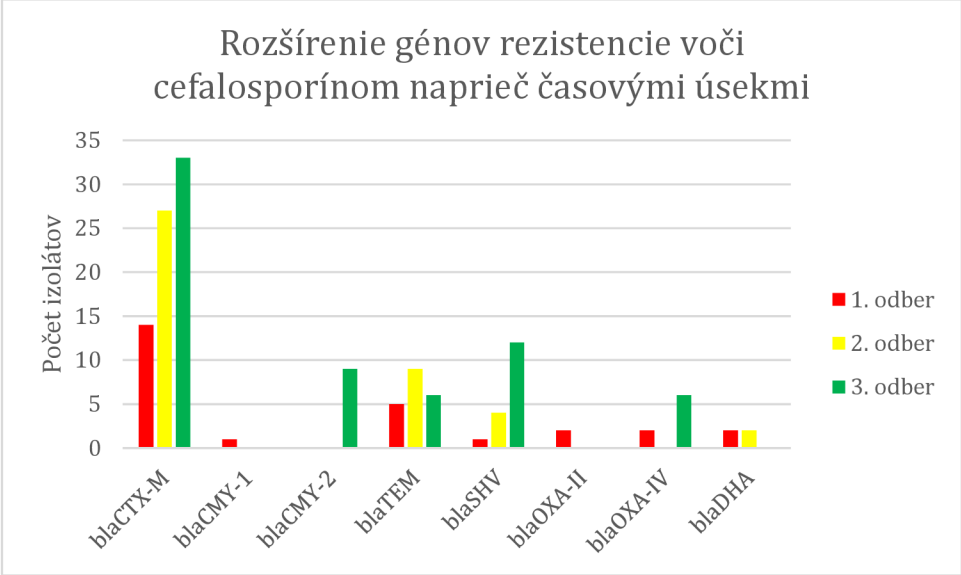
Obr. 9: Graf zastúpenia génu bla_{CTX-M} v jednotlivých bakteriálnych rodoch



Obr. 10: Graf zastúpenia génu bla_{TEM} v jednotlivých bakteriálnych rodoch

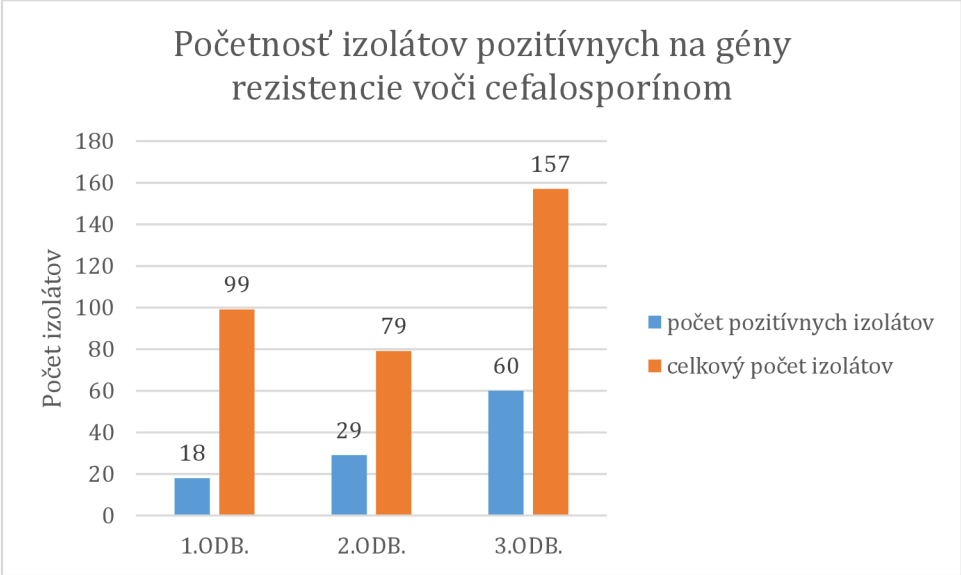


Obr. 11: Graf zastúpenia génu bla_{CMY} v jednotlivých bakteriálnych rodoch



Obr. 12: Rozšírenie génov rezistencie voči cefalosporínom naprieč časovými úsekmi

Čo sa týka časových úsekov, najviac izolátov pozitívnych na gény rezistencie voči cefalosporínom bolo detekovaných medzi izolátmi z 3. odberu (60 izolátov). Najčastejší záchyt génov *bla*$_{\text{CTX-M}}$, *bla*$_{\text{SHV}}$, *bla*$_{\text{CMY-2}}$ a *bla*$_{\text{OXA-IV}}$ bol takisto medzi izolátmi z 3. odberu. Gén *bla*$_{\text{TEM}}$ bol najčastejšie zachytený medzi izolátmi z 2. odberu (*Obr.12*). Najvyššia početnosť izolátov pozitívnych na gény rezistencie voči cefalosporínom bola zaznamenaná v 3. odbere (60 z 157 izolátov, 38,21 %), naopak najnižšia početnosť bola v 1. odbere (18 z 99 izolátov, 18,18 %) (*Obr. 13*).



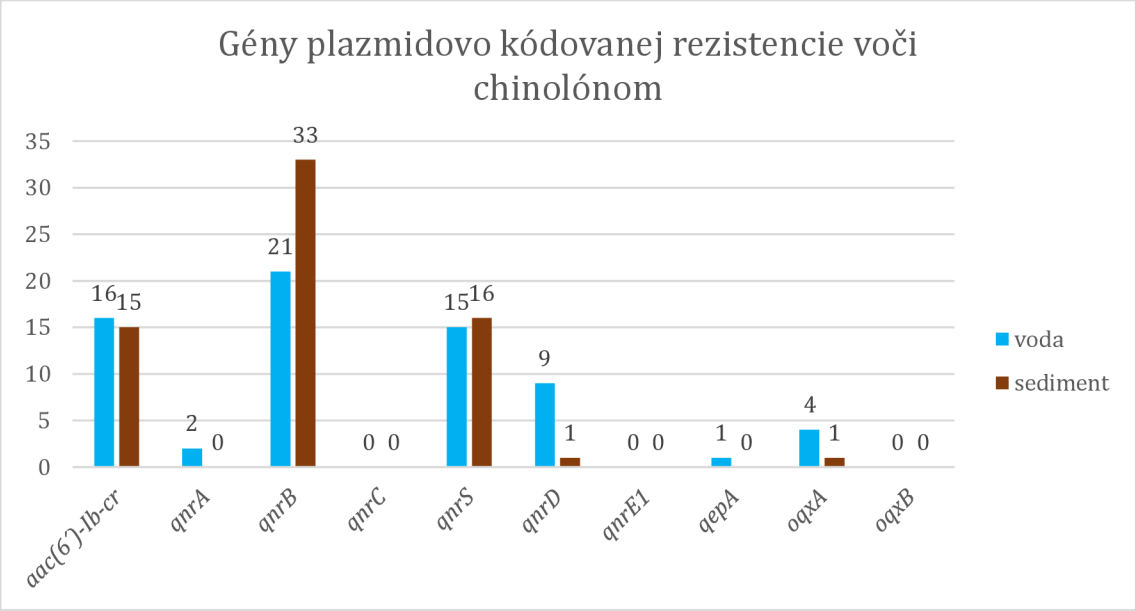
Obr. 13: Početnosť izolátov pozitívnych na gény rezistencie voči cefalosporínom

8.2.2 Detekcia plazmidovo prenášaných génov rezistencie voči chinolónom

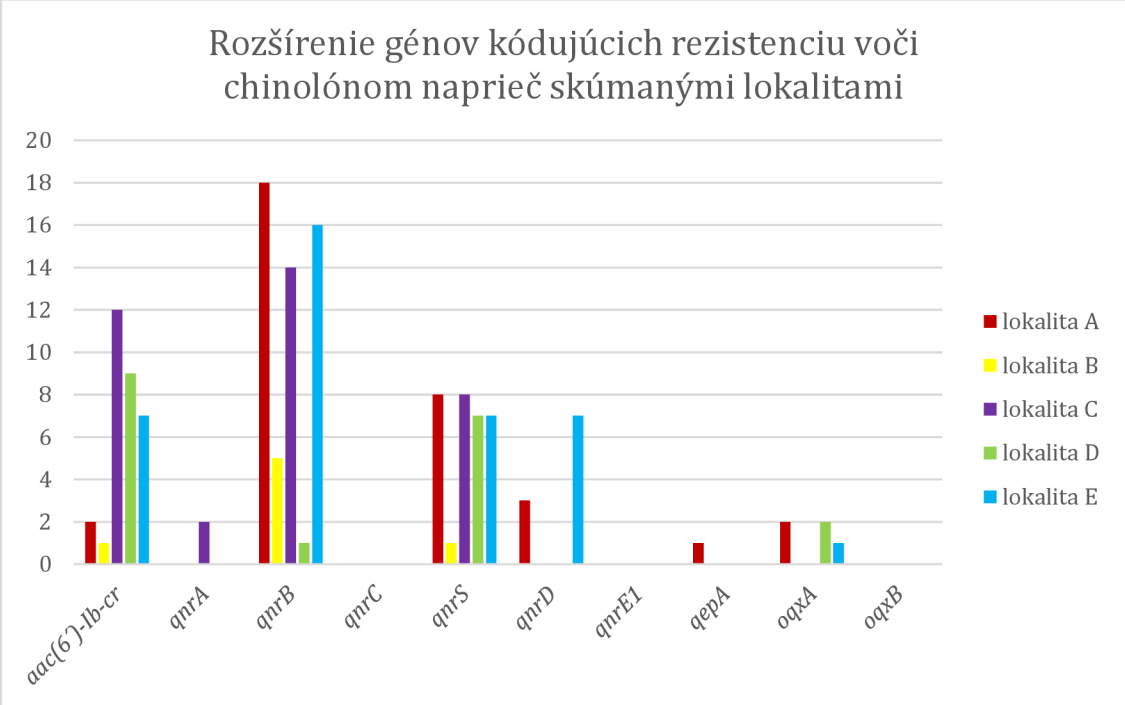
	Pozitívne izoláty (1 a viac génov)	Celkový počet izolátov	Percento pozitívnych izolátov (%)
voda	56	238	23,53
sediment	60	145	41,38
spolu	116	383	30,29

Tab. 6: Tabuľka záchytu izolátov pozitívnych na gény rezistencie voči chinolónom

Medzi vzorkami kultivovanými na CIP bolo detekovaných 116 izolátov (30,29%) s pozitívnou reakciou na aspoň jeden z génov rezistencie voči chinolónom. Zo 116 pozitívnych izolátov patrilo 56 medzi vzorky vody a 60 medzi vzorky sedimentu (*Tab. 6*). Najčastejšie detekovanými génmi boli *qnrB* (54 izolátov), *aac(6´)-Ib-cr* (31 izolátov) a *qnrS* (31 izolátov) (*Obr. 14*).

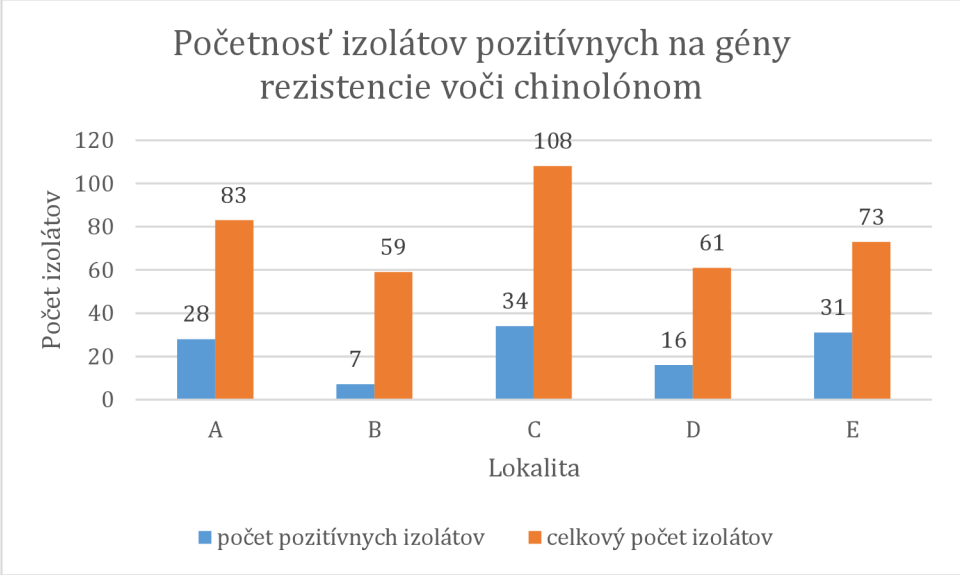


Obr. 14 : Graf detekovaných génov plazmidovo kódovanej rezistencie voči chinolónom



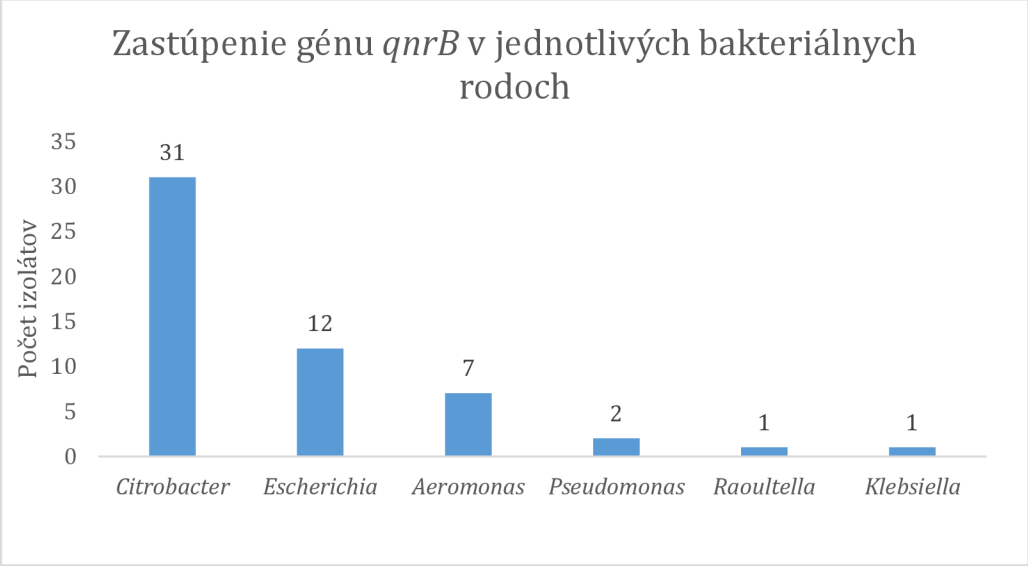
Obr. 15: Graf rozšírenia génov rezistencie voči chinolónom naprieč skúmanými lokalitami

Gén *qnrB* bol najrozšírenejším génom hneď v štyroch lokalitách (A = 18 izolátov, B = 5 izolátov, C = 14 izolátov a E = 16 izolátov). V lokalite D bol najrozšírenejším génom *aac6-Ib-cr* (9 izolátov). Niektoré gény boli detekované iba v jednej lokalite – *qnrA* v lokalite C a *qepA* v lokalite A. Gény *qnrC*, *qnrE1* a *oqxB* neboli detekované vôbec (*Obr. 15*). Najvyššia početnosť izolátov pozitívnych aspoň na jeden gén rezistencie voči chinolónom bola v lokalite E (31 zo 73 izolátov, 42,47 %). Naopak najnižšia bola v lokalite B (7 z 59 izolátov, 11,86 %) (*Obr. 16*).

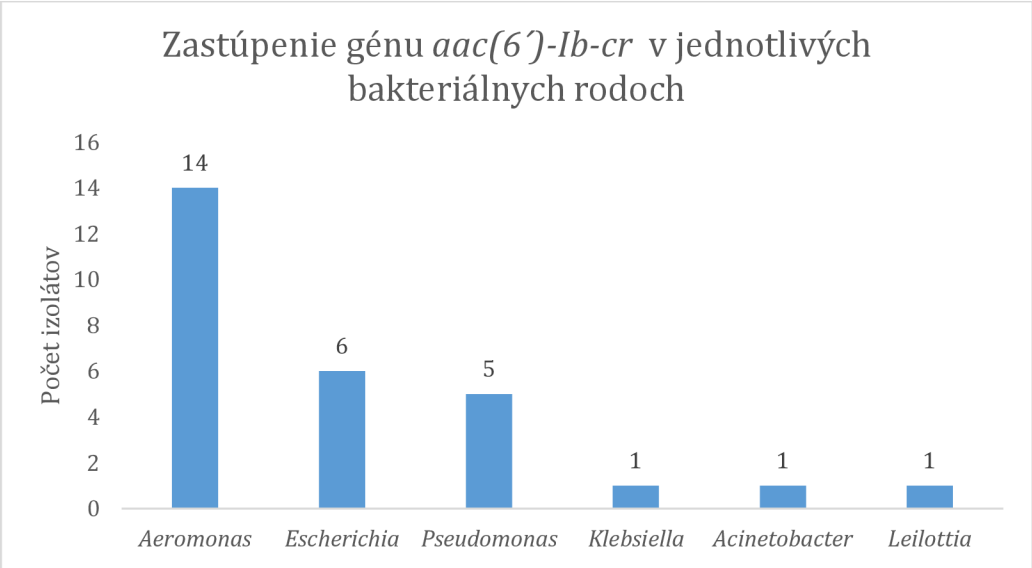


Obr. 16 : Graf početnosti izolátov pozitívnych na gény rezistencie voči chinolónom

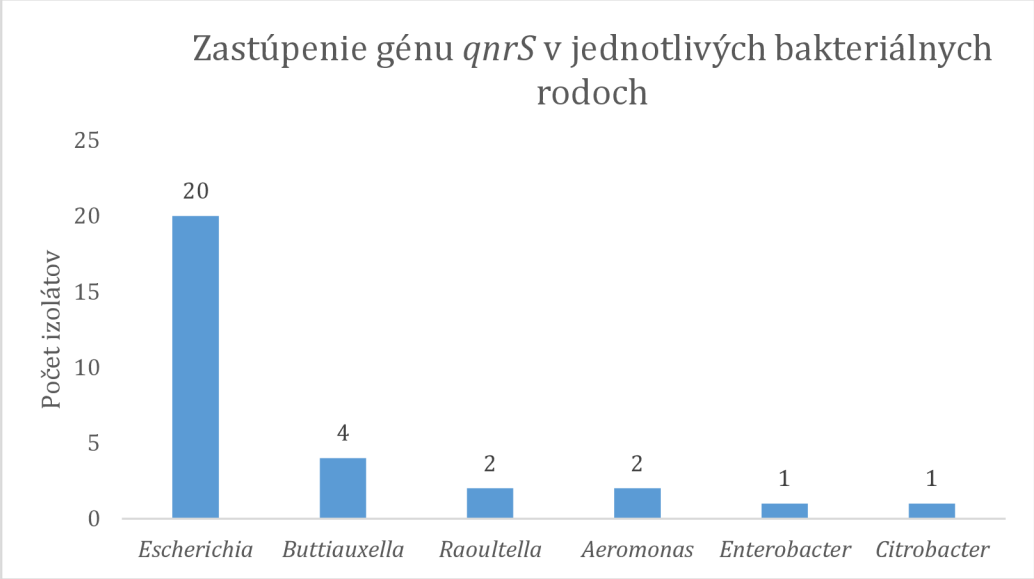
Gén *qnrB* bol najčastejšie zastúpený u rodov *Citrobacter* (31 izolátov, 86,1 % z počtu izolátov *Citrobacter* kultivovaných s prídavkom CIP) a *Escherichia* (12 izolátov, 16,9 % z počtu izolátov rodu *Escherichia* kultivovaných s prídavkom CIP) (*Obr. 17*). Gén *aac(6´)-Ib-cr* mal najvyššie zastúpenie v rodoch *Aeromonas* (14 izolátov, 10,85 % z počtu izolátov rodu *Aeromonas* kultivovaných s prídavkom CIP), *Escherichia* (6 izolátov, 8,45 % z počtu izolátov *Escherichia* kultivovaných s prídavkom CIP) a *Pseudomonas* (5 izolátov, 10,9 % z počtu izolátov rodu *Pseudomonas* kultivovaných s prídavkom CIP) (*Obr. 18*). Gén *qnrS* bol najčastejšie zastúpený v rodoch *Escherichia* (20 izolátov, 28,2 % z počtu izolátov rodu *Escherichia* kultivovaných s prídavkom CIP) a *Buttiauxella* (4 izoláty, 50 % z počtu izolátov rodu *Buttiauxella* kultivovaných s prídavkom CIP) (*Obr. 19*).



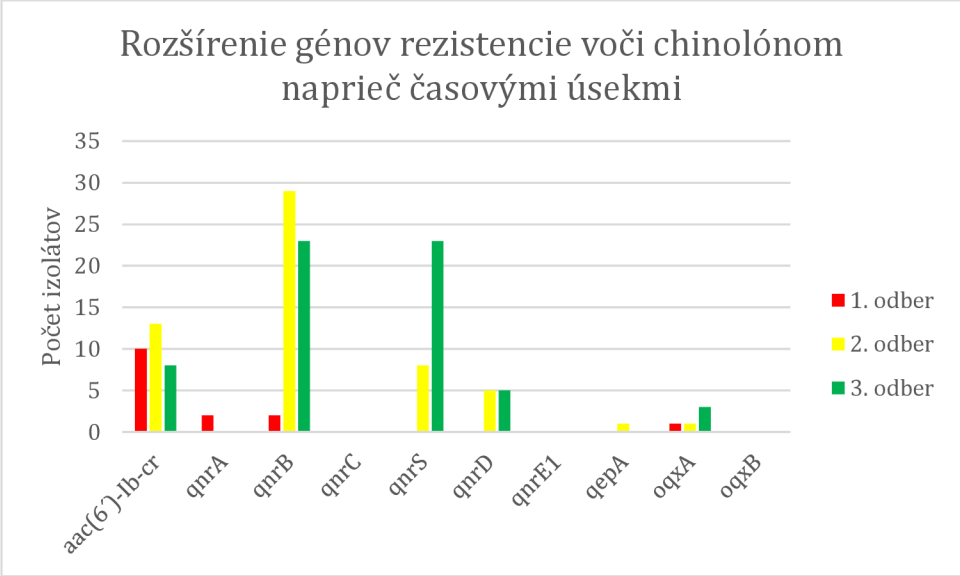
Obr. 17: Graf zastúpenia génu qnrB v jednotlivých bakteriálnych rodoch



Obr. 18: Graf zastúpenia génu aac(6´)-Ib-cr v jednotlivých bakteriálnych rodoch

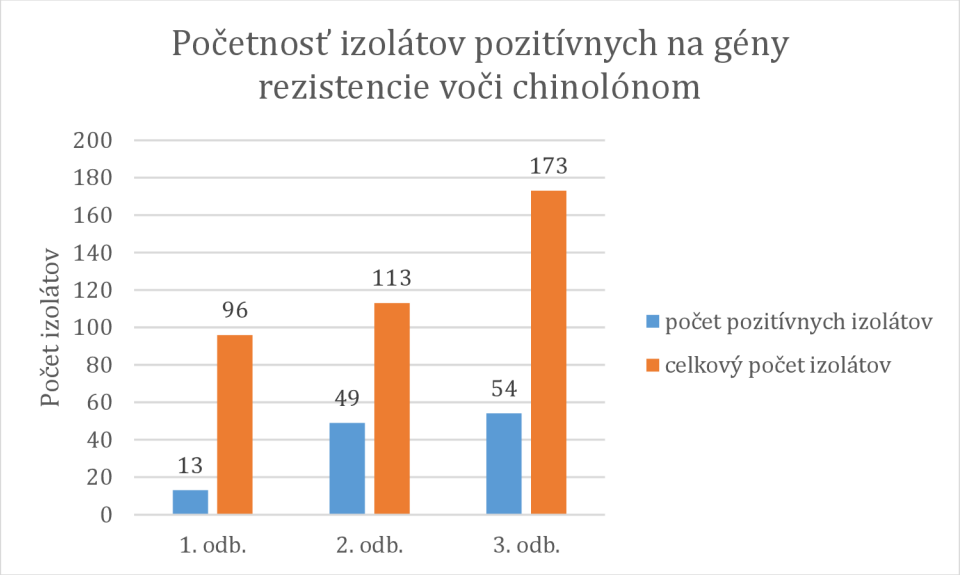


Obr. 19: Graf zastúpenia génu qnrS v jednotlivých bakteriálnych rodoch



Obr. 20: Rozšírenie génov rezistencie voči chinolónom naprieč časovými úsekmi

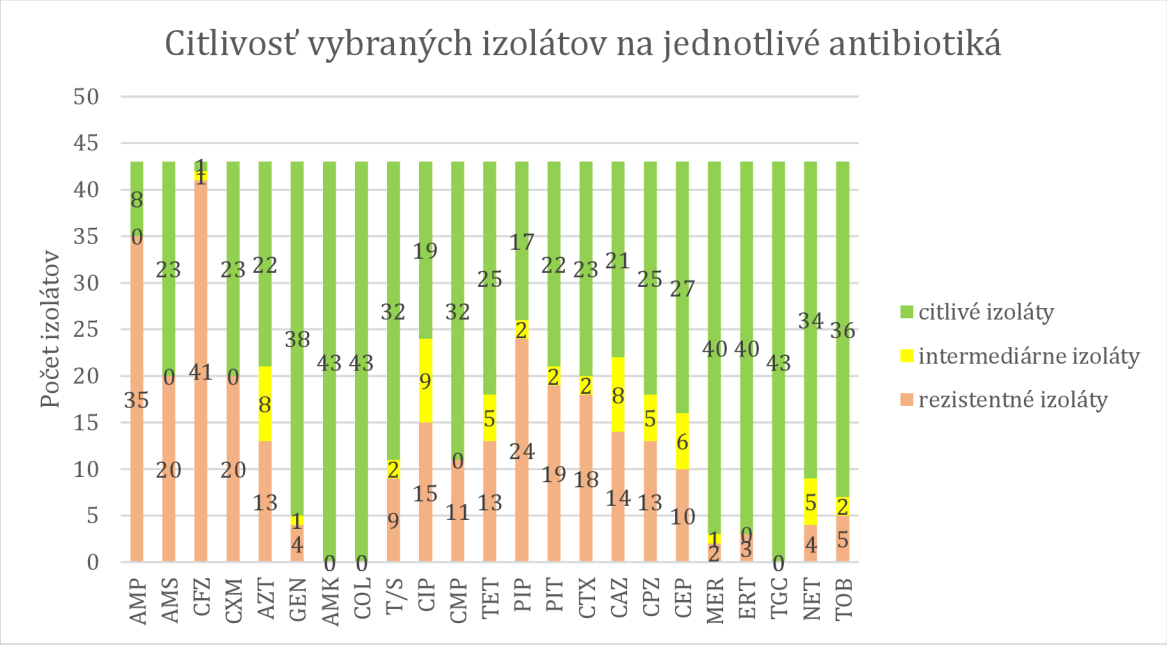
Najviac izolátov pozitívnych na gén *aac(6´)Ib-cr* bolo v 2. odbere, rovnako ako u génu *qnrB*. Gén *qnrS* bol najviac prevalentný medzi izolátmi odobranými v 3. odbere. Gény *qnrA* a *qepA* boli detekované iba medzi izolátmi v jednom časovom úseku, a to konkrétne v 1., resp. 2. odbere (*Obr. 20*). Najvyššia početnosť izolátov pozitívnych na gény rezistencie voči chinolónom bola zaznamenaná v 2. odbere (49 zo 113 izolátov, 43,36 %). Naopak, najnižšia početnosť pozitívnych izolátov bola zaznamenaná v 1. odbere (13 z 96 izolátov, 13,5 %).



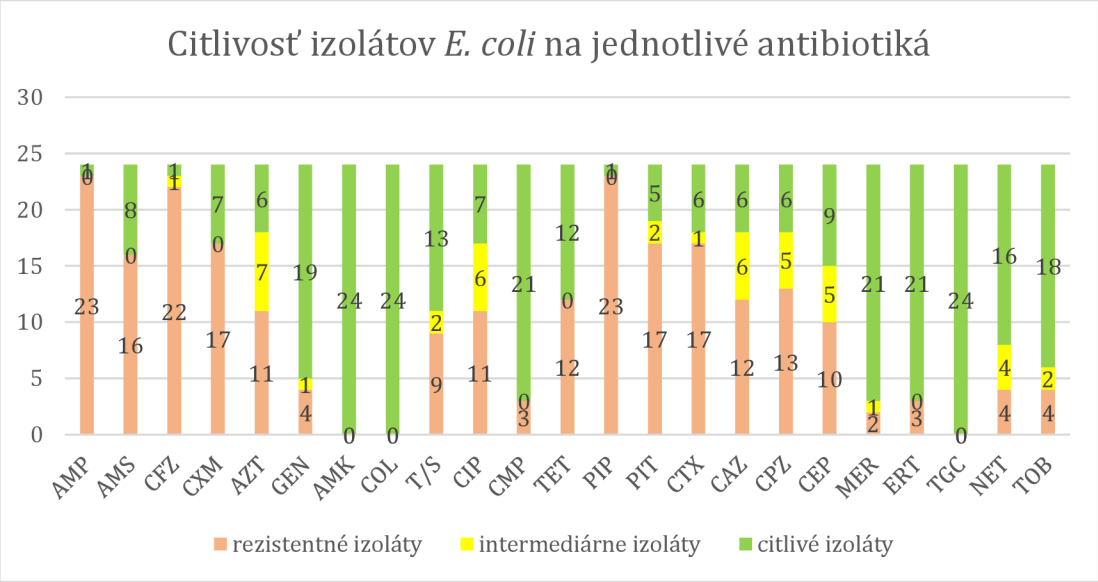
Obr. 21: Početnosť izolátov pozitívnych na gény rezistencie voči chinolónom

8.3 Stanovenie MIC

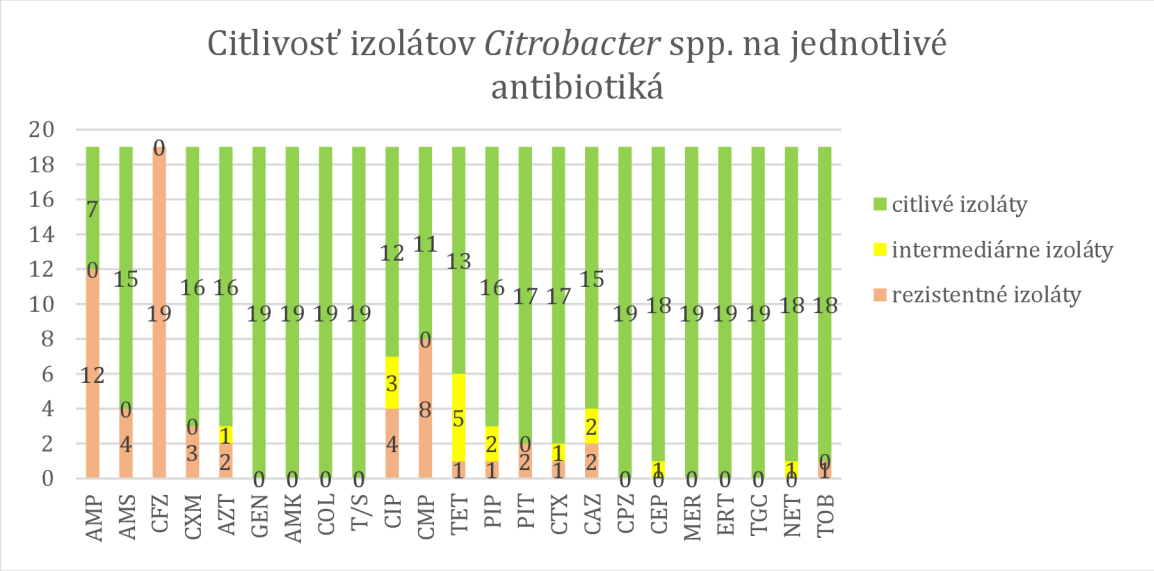
Izoláty, ktoré boli metódou PFGE vybrané na WGS, boli ďalej testované pomocou kitov MIC GN1 a MIC GN2, kde bola stanovená ich citlivosť k danej sade antibiotík. Na fenotypové testy a WGS bolo vybraných 43 izolátov *E. coli* a *Citrobacter* spp. Z týchto izolátov bolo 32 kultivovaných na pôdach s prídavkom CIP a 11 na pôdach s prídavkom CEF. Žiadny z vybraných izolátov nevykazoval rezistenciu k AMK, COL a TGC. Najviac izolátov bolo rezistentných voči CFZ (41 izolátov, 95,3 %) a AMP (35 izolátov, 81,4 %). Na cefotaxim (CEF, CTX) vykazovalo rezistenciu 18 izolátov (41,9 %) a na CIP bolo rezistentných 15 izolátov (34,9 %) (*Obr. 22*).



Obr. 22: Graf citlivosti vybraných izolátov na antibiotiká z kitov MIC GN1 a MIC GN2

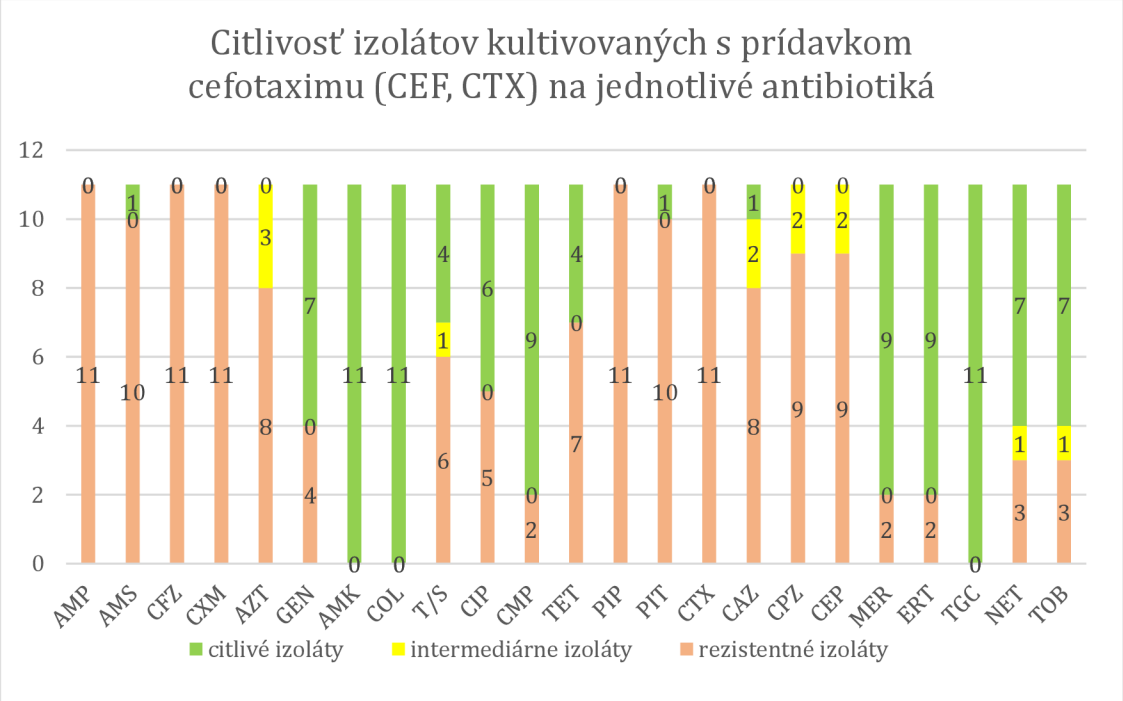


Obr. 23: Graf citlivosti izolátov E. coli na jednotlivé antibiotiká z kitov MIC GN a MIC GN2

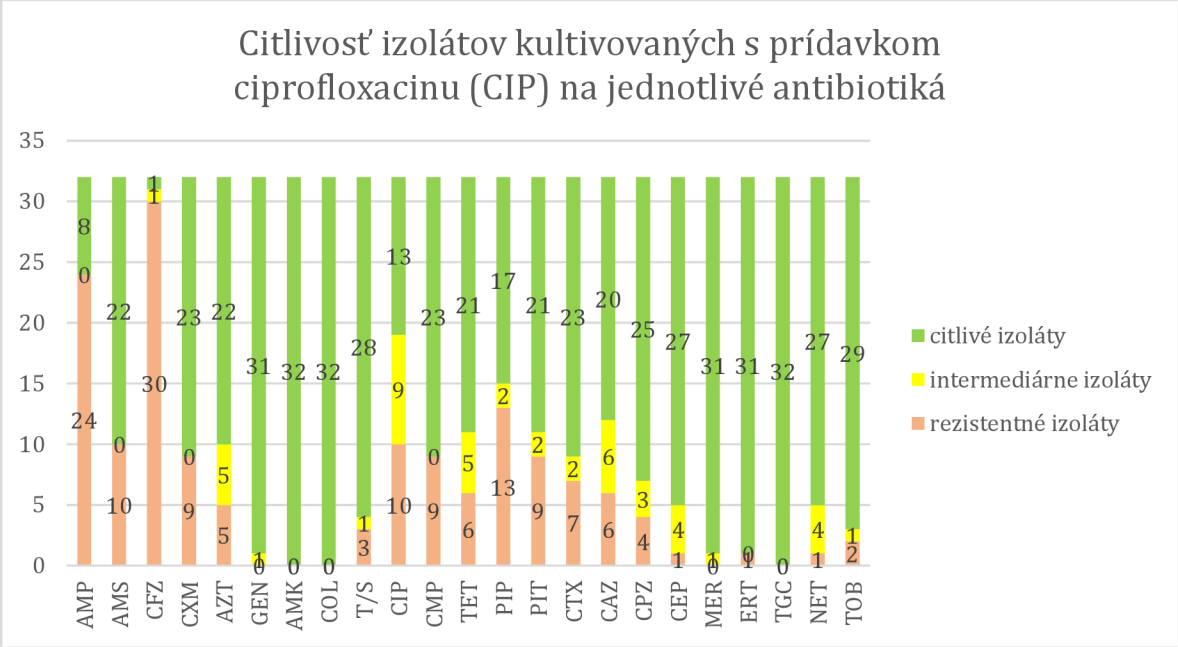


Obr. 24: Graf citlivosti izolátov Citrobacter spp. na jednotlivé antibiotiká z kitov MIC GN1 a MIC GN2

Zo skupiny izolátov *E. coli* bolo 11 kultivovaných na CEF a 13 na CIP. Najviac izolátov bolo rezistentných voči AMP (21 izolátov, 87,5 %), PIP (21 izolátov, 87,5 %) a CFZ (20 izolátov, 83,3 %) (*Obr. 23*). Všetky izoláty *Citrobacter* spp. boli kultivované na CIP. Najvyšší počet izolátov *Citrobacter* spp. bol rezistentný na CFZ (19 izolátov, 100 %) a AMP (12 izolátov, 63,2 %) (*Obr. 24*).



Obr. 25: Graf citlivosti izolátov kultivovaných s prídavkom cefotaximu na jednotlivé antibiotiká



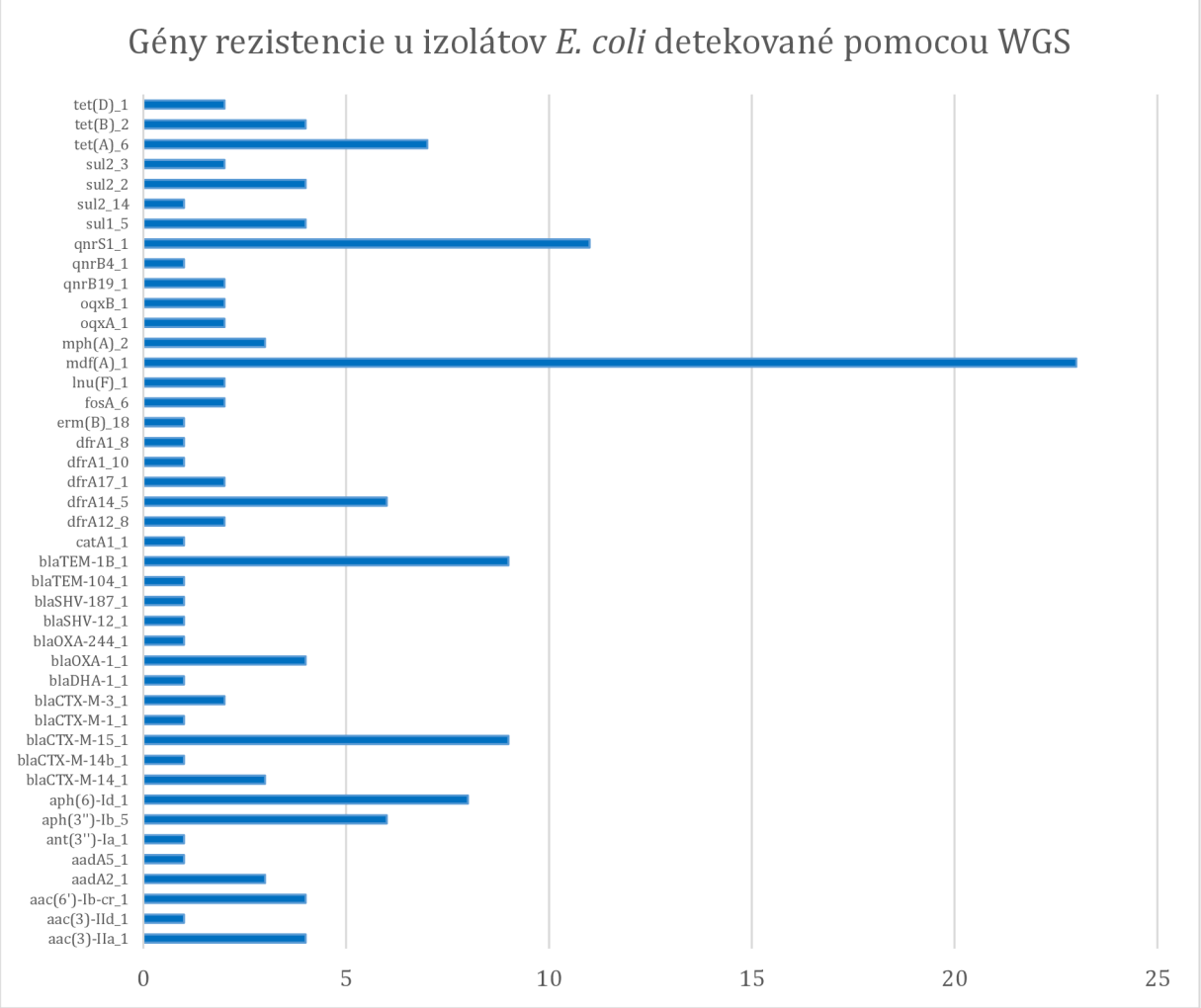
Obr. 26: Graf citlivosti izolátov kultivovaných s prídavkom ciprofloxacinu na jednotlivé antibiotiká

U izolátov kultivovaných s prídavkom CTX bola zistená rezistencia voči väčšine skupín β-laktámov. Všetkých 11 izolátov bolo rezistentných voči AMP, CFZ, CXM, PIP a CTX. Vysoká prevalencia rezistencie bola detekovaná aj voči AMS, PIT (10 izolátov, 91 %), CPZ, CEP (9 izolátov, 82 %), CAZ, AZT (8 izolátov, 73 %). Rezistencia voči karbapenémom bola zistená iba u dvoch izolátov, ktoré boli rezistentné voči MER aj ERT (*Obr. 25*). Izoláty kultivované s prídavkom CIP boli najčastejšie rezistentné voči CFZ (30 izolátov, 93,75 %) a AMP (24 izolátov, 75 %). Rezistencia voči CIP bola detekovaná u 10 izolátov (31,25 %), no ďalších 9 izolátov (28,1 %) bolo klasifikovaných ako intermediárne (*Obr. 26*).

8.4 WGS

Na WGS bolo poslaných 23 izolátov *E. coli* a 19 izolátov *Citrobacter* spp. . U *E. coli* bol najčastejšie detekovaný gén pre efluxnú pumpu *mdf(A)* (23 izolátov, 100%). Bolo zachytených viac skupín génov kódujúcich β-laktamázy, konkrétne bla_{CTX-M} ($bla_{CTX-M-14}$, bla_{CTX-M-}

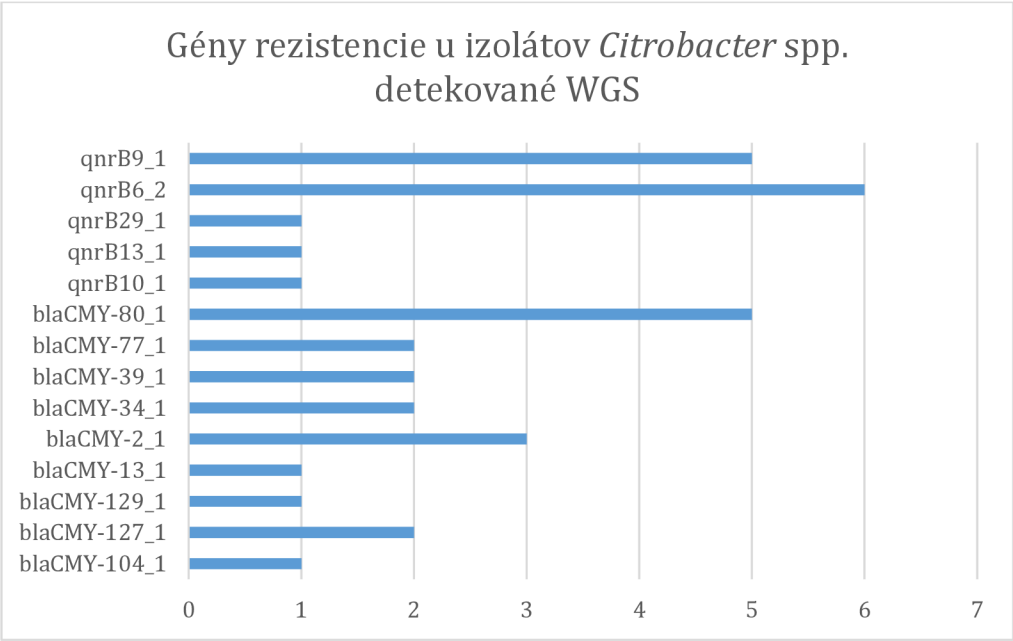
14b, *bla*$_{CTX-M-15}$, *bla*$_{CTX-M-1}$ a *bla*$_{CTX-M-3}$), *bla*$_{TEM}$ (*bla*$_{TEM-18}$, *bla*$_{TEM-104}$), *bla*$_{SHV}$ (*bla*$_{SHV-187}$, *bla*$_{SHV-12}$), *bla*$_{OXA}$ (*bla*$_{OXA-1}$, *bla*$_{OXA-244}$) a *bla*$_{DHA}$ (*bla*$_{DHA-1}$). Z génov rezistencie voči chinolónom mal u *E. coli* najvyššie zastúpenie *qnrS1* a detekované boli aj *qnrB4*, *qnrB19* a *aac(6´)-Ib-cr*. Gény rezistencie voči aminoglykozidom boli ďalšou početne zastúpenou skupinou, kde najčastejšie detekovanými génmi boli *aph(6)-Id* a *aph(3´´)-Ib*. Kompletný prehľad zachytených génov rezistencie je na obrázku č. 19 (*Obr. 27*).



Obr. 27: Gény rezistencie detekované WGS u E. coli

U *Citrobacter* spp. bolo nájdených menej génov rezistencie ako u *E. coli*. Bolo zachytených 9 génov kódujúcich β-laktamázy skupiny *bla*$_{CMY}$ (*bla*$_{CMY-2}$, *bla*$_{CMY-13}$, *bla*$_{CMY-129}$,

bla$_{CMY-127}$, *bla*$_{CMY-104}$, *bla*$_{CMY-80}$, *bla*$_{CMY-77}$, *bla*$_{CMY-34}$, *bla*$_{CMY-39}$) a 5 génov rezistencie voči chinolónom skupiny *qnrB* (*qnrB9, qnrB6_2, qnrB29, qnrB13* a *qnrB10*) (*Obr. 28*).



Obr. 28: Gény rezistencie detekované WGS u Citrobacter spp.

V súbore izolátov *E. coli* boli najčastejšími sekvenčnými typmi ST13214 (2 izoláty), ST101 (2 izoláty) a ST10 (2 izoláty). Tri izoláty nebolo možné priradiť k žiadnemu sekvenčnému typu. V súbore izolátov *Citrobacter* spp. boli detekované sekvenčné typy ST755, ST17, ST728, ST166, ST208, ST260 a ST301. K ST728 boli priradené 2 izoláty, zatiaľ čo k ostatným sekvenčným typom bol priradený 1 izolát. 11 izolátov nebolo možné priradiť k žiadnemu zo sekvenčných typov. Prehľad stanovených sekvenčných typov je možné nájsť v tabuľke v Prílohe C.

9 Diskusia

V tejto práci bola opísaná izolácia, selektívna kultivácia a následná mikrobiologická a molekulárne biologická charakterizácia súboru izolátov zo vzoriek vody a sedimentu z piatich lokalít v troch časových úsekoch. Zo vzoriek vody bolo získaných 945 izolátov a zo vzoriek sedimentu bolo získaných 442 izolátov.

Najčastejšie získanými bakteriálnymi rodmi boli *Pseudomonas* a *Aeromonas*. Zástupcovia týchto rodov sa hojne vyskytujú vo vodnom prostredí a patria medzi patogény rýb (Li *et al.,* 2019). Rod *Escherichia* bol tretím najčastejšie zachyteným rodom. *Escherichia coli* je indikátorom fekálneho znečistenia a v európskych vodách je jej výskyt častý, hlavne vo vodných plochách, do ktorých ústí odpadová voda (Martak *et al.,* 2020; Van Heijnsbergen *et al.*, 2022). Rod *Escherichia* bol najčastejšie zaznamenaný v lokalite E. Lokalita E sa nachádza na brehu Vltavy v centre Prahy, kde je častá interakcia ľudí a domácich alebo voľne žijúcich zvierat s vodným prostredím. Do tejto rieky odteká aj odpadová voda z domácností, nemocníc či priemyslu potom, čo prejde čistiarňou odpadových vôd. V lokalite E bolo zároveň detekovaných najviac izolátov pozitívnych na niektorý zo skúmaných génov rezistencie. Naopak, najmenej pozitívnych izolátov bolo nájdených v lokalite B. Lokalita B je súčasťou chráneného územia a tak sa do nej nedostáva také množstvo potenciálne škodlivého odpadu. Čo sa týka časových úsekov, najviac pozitívnych izolátov bolo zachytených medzi izolátmi odobranými v 3. odbere, ktorý sa konal v októbri 2022.

U izolátov kultivovaných na médiu s prídavkom CEF bol najčastejšie zachyteným génom gén $bla_{CTX\text{-}M}$. Enzýmy skupiny CTX-M sú najrozšírenejšie ESBL a ich rozšírenie je celosvetové (Yu *et al.,* 2024). *E. coli* s génmi $bla_{CTX\text{-}M}$ boli zaznamenané vo vodnom prostredí v západnej a strednej Európe (Falgenhauer *et al.,* 2021; Girlich *et al.,* 2020). Gény bla_{TEM} a bla_{SHV} sú tiež pomerne často detekované vo vodnom prostredí (Marti *et al.,* 2013).

Lokalita E, kde bolo detekovaných najviac génov pre rezistenciu k antibiotikám, je breh Vltavy, kde je častý kontakt zvierat a ľudí s vodným prostredím. Je to možný dôvod vysokej prevalencie génov rezistencie voči cefalosporínom v baktériách vo vodnom prostredí.

qnrB je gén, ktorý je často prenášaný *E. coli* produkujúcimi ESBL v Európe, USA aj v Afrike. ESBL produkujúce *E. coli* prenášajú aj ostatné skupiny *qnr* génov, ale v menšom pomere (Juraschek *et al.,* 2022). To môže vysvetľovať vyššiu incidenciu záchytu tohto génu v skúmaných izolátoch.

Gény pre karbapenemázy neboli v tomto súbore izolátov detekované, čo môže znamenať, že karbapenemázy nie sú v skúmaných lokalitách rozšírené.

U izolátov kultivovaných s prídavkom CEF (10 izolátov) bola v 9 prípadoch pomocou WGS potvrdená prítomnosť génu $bla_{CTX\text{-}M}$, ktorý bol detekovaný pomocou PCR. Gén bla_{TEM} bol pomocou PCR detekovaný u 3 izolátov, zatiaľ čo WGS odhalila tento gén ešte u ďalších 3 izolátov. Gény bla_{OXA} a bla_{SHV} neboli u skúmaných izolátov kultivovaných s prídavkom CEF detekované pomocou PCR, zatiaľ čo pomocou WGS detekované boli – bla_{OXA} u 3 izolátov a bla_{SHV} u 1 izolátu. Gén bla_{DHA} bol naopak detekovaný iba pomocou PCR a pomocou WGS bol detekovaný iba u izolátu kultivovaného s prídavkom CIP.

U izolátov kultivovaných s prídavkom CIP korešpondovali gény detekované PCR s génmi detekovanými WGS vo všetkých prípadoch okrem izolátov 2WA4h (pomocou PCR boli detekované gény *aac(6´)-Ib-cr* a *qnrD*, WGS potvrdila iba *aac(6´)-Ib-cr*), 2WA5h (pomocou PCR boli detekované gény *qnrS* a *qnrD*, WGS potvrdila iba *qnrS*) a 2WA9h (pomocou PCR boli detekované gény *qnrB* a *qnrS*, WGS potvrdila iba *qnrS*).

K testovaniu MIC bolo vybraných 44 izolátov *E. coli* a *Citrobacter* spp., ktoré boli kultivované na médiu s prídavkom CIP alebo CEF. Nenašiel sa ani jeden izolát rezistentný voči kolistínu, amikacinu a tigecyklínu. Gény rezistencie voči kolistínu boli detekované v zanedbateľnom počte už v PCR testovaní. Amikacin a tigecyklín sú antibiotiká, ktoré sa používajú proti G- baktériám produkujúcim karbapenemázy (Hirsch *et* Tam, 2010). Citlivosť skúmaných izolátov k týmto antibiotikám môže znamenať ich nízku frekvenciu používania týchto antibiotík v skúmaných lokalitách. Iba 11 izolátov vykazovalo fenotyp rezistencie na CIP, aj keď bolo testovaných 32 izolátov kultivovaných na CIP. Koncentrácia CIP v médiu bola iba 0,05 mg/l, čo je menej ako najnižšia koncentrácia na doštičke MIC (0,064 mg/l). Je tak možné, že ich MIC sa pohybuje v hodnotách od 0,05 do 0,064 mg/l. Niektoré izoláty však obsahovali gén rezistencie voči chinolónom, no v MIC testovaní sa ukázali ako citlivé.

Patrili medzi ne 2WA17h1 s génom *qnrB10*, 3ME1h a 3ME7h s génom *qnrB17*. Iné izoláty s génom *qnrB17* (2MC7h) však vykazovali rezistenciu voči CIP.

Ampicilín, piperacilín a cefazolin – antibiotiká, na ktorých bolo najviac izolátov rezistentných patria medzi penicilíny (AMP, PIP) a cefalosporíny prvej generácie (CFZ). Tieto antibiotiká sú dobre štiepiteľné detekovanými triedami ESBL ako CTX-M, CMY alebo TEM (Jacoby, 2009; Sawa *et al.,* 2020).

Veľmi častým javom u skúmaných izolátov bola prítomnosť génu kódujúceho β-laktamázu (väčšinou $bla_{CTX\text{-}M}$ alebo bla_{CMY}) spolu s génom pre rezistenciu voči chinolónom skupiny *qnrB*. Toto zistenie je v súlade s výsledkami štúdie z roku 2022, kde boli gény skupiny *qnrB* s vysokou frekvenciou lokalizované na plazmidoch u *E. coli* produkujúcich ESBL (Juraschek et al., 2022). U izolátov *Citrobacter* spp. boli pomocou WGS identifikované iba gény skupín bla_{CMY} a *qnrB*. Kmene *Citrobacter* spp. sa vyznačujú chromozomálne kódovanými β-laktamázami, medzi ktoré patrí aj bla_{CMY} (Hem *et al.*, 2024). Tieto gény sa často vyskytujú spoločne (Pai *et al.,* 2007). Izoláty *Citrobacter* spp. obsahujúce gén bla_{CMY} boli kultivované s prídavkom CIP, takže u nich nebola robená PCR na gény rezistencie voči cefalosporínom.

Gén *mdf(A)* je efluxná pumpa, ktorá poskytuje rezistenciu voči niektorým aminoglykozidom a fluorochinolónom a vyskytuje sa u *E. coli* (Edgar *et* Bibi, 1997). Tento gén bol detekovaný u všetkých izolátov *E. coli*.

Izoláty *E. coli* sa dali rozdeliť do 17 sekvenčných typov. U 3 izolátov sa nedal určiť sekvenčný typ, čo znamená, že sú to nové sekvenčné typy. Jedným z nových sekvenčných typov je aj izolát 2WA19cX_A, ktorý nesie až 18 génov rezistencie. Bol detekovaný 1 izolát ST131, ktorý niesol gény *mdf(A)* a $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$. *E. coli* ST131 je významným pôvodcom infekcií močových ciest a krvného riečišťa (Biggel *et al.,* 2022). Medzi ďalšie rozšírené detekované patogénne sekvenčné typy patrí ST38 (Paramita *et al.*, 2020; Roer *et al.,* 2017), ST58 (Reid *et al.,* 2022), ST10 (Lee *et al.,* 2024).

Izoláty *Citrobacter spp.* boli rozdelené do 7 sekvenčných typov. U 11 izolátov sa nedal určiť sekvenčný typ. Izolované sekvenčné typy sa pravdepodobne nedajú klasifikovať ako patogénne, no ST17 bol identifikovaný v Ázii aj Európe (Liu *et al.*, 2021).

10 Súhrn

Detekce, molekulární typizace a celogenomové sekvenování patogenních kmenů enterobakterií ve vodním prostředí.

Táto práca si dala za cieľ detekovať a charakterizovať patogénne kmene *Enterobacteriaceae* v piatich lokalitách v troch časových úsekoch. V týchto lokalitách bolo izolovaných 945 izolátov zo vzoriek vody a 442 izolátov zo vzoriek sedimentu. Najčastejšími izolovanými rodmi boli *Pseudomonas, Aeromonas* a *Escherichia*, kde *Escherichia* bol prevalentný hlavne v lokalite E. V tejto lokalite sa zároveň našlo najviac rezistentných izolátov. PCR testovaním na gény rezistencie boli najčastejšie detekované gény bla_{CTX-M} a *qnrB*. Tieto gény boli u vybraných izolátov *Escherichia coli* a *Citrobacter* spp. potvrdené pomocou WGS, a väčšinou sa nachádzali na rovnakých izolátoch. U *Citrobacter* spp. bol s génom *qnrB* spoločne detekovaný aj gén bla_{CMY}. Gény rezistencie voči karbapenémom a kolistínu neboli zaznamenané, čo značí, že baktérie s týmito génmi ešte nie sú v ČR všeobecne rozšírené. Všetky izoláty boli fenotypovo rezistentné voči zástupcom penicilínov a cefalosporínov 1. generácie. Medzi skúmanými izolátmi sa nachádzali aj celosvetovo rozšírené patogénne sekvenčné typy ako *E. coli* ST131, ST38 či ST10. Takisto bol zaznamenaný aj rozšírený ST17 *Citrobacter* spp.

11 Summary

Detection, molecular typing and whole-genome sequencing of pathogenic strains of enterobacteria from water environment

This work aimed to detect and characterize pathogenic Enterobacteriaceae strains in five locations at three time points. At these sites, 945 isolates were isolated from water samples and 442 isolates from sediment samples. The most common genera isolated were Pseudomonas, Aeromonas and Escherichia, where Escherichia was the most prevalent at site E. This site also yielded the biggest number of resistant isolates. By PCR testing for resistance genes, $bla_{\text{CTX-M}}$ and *qnrB* were the most frequently detected genes. These genes were confirmed in selected *Escherichia coli* and *Citrobacter* spp. isolates by WGS, and were mostly found on the same isolates. In Citrobacter spp., the bla_{CMY} gene was also detected together with the *qnrB* gene. Carbapenem and colistin resistance genes were not detected, indicating that bacteria with these genes are not yet widespread in the Czech Republic. All isolates were phenotypically resistant to the representatives of penicillins and 1st generation cephalosporins. Among the isolates studied, there were also globally spread pathogenic sequence types such as *E. coli* ST131, ST38 or ST10. Also, the globally spread *Citrobacter* ST17 was detected.

Použité zdroje

Alav, I., Kobylka, J., Kuth, M.S., Pos, K.M., Picard, M., Blair, J.M.A., Bavro, V.N., 2021. Structure, Assembly, and Function of Tripartite Efflux and Type 1 Secretion Systems in Gram-Negative Bacteria. Chem. Rev. 121, 5479–5596. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00055

Alderton, I., Palmer, B.R., Heinemann, J.A., Pattis, I., Weaver, L., Gutiérrez-Ginés, M.J., Horswell, J., Tremblay, L.A., 2021. The role of emerging organic contaminants in the development of antimicrobial resistance. Emerg. Contam. 7, 160–171. https://doi.org/10.1016/j.emcon.2021.07.001

Alekshun, M.N., Levy, S.B., 2007. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. Cell 128, 1037–1050. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004

Aminov, R.I., 2011. Horizontal Gene Exchange in Environmental Microbiota. Front. Microbiol. 2. https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00158

Amos, G.C.A., Hawkey, P.M., Gaze, W.H., Wellington, E.M., 2014. Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. J. Antimicrob. Chemother. 69, 1785–1791. https://doi.org/10.1093/jac/dku079

Andersson, D.I., Hughes, D., 2012. Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. Drug Resist. Updat. 15, 162–172. https://doi.org/10.1016/j.drup.2012.03.005

Bai, L., Xia, S., Lan, R., Liu, L., Ye, C., Wang, Y., Jin, D., Cui, Z., Jing, H., Xiong, Y., Bai, X., Sun, H., Zhang, J., Wang, L., Xu, J., 2012. Isolation and Characterization of Cytotoxic, Aggregative Citrobacter freundii. PLoS ONE 7, e33054. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033054

Baran, W., Adamek, E., Ziemiańska, J., Sobczak, A., 2011. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. J. Hazard. Mater. 196, 1–15. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.08.082

Barber, M., Rozwadowska-Dowzenko, M., 1948. INFECTION BY PENICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCI. The Lancet 252, 641–644. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(48)92166-7

Barnard, F.M., Maxwell, A., 2001. Interaction between DNA Gyrase and Quinolones: Effects of Alanine Mutations at GyrA Subunit Residues Ser^{83} and Asp^{87}. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 1994–2000. https://doi.org/10.1128/AAC.45.7.1994-2000.2001

Biggel, M., Moons, P., Nguyen, M.N., Goossens, H., Van Puyvelde, S., 2022. Convergence of virulence and antimicrobial resistance in increasingly prevalent Escherichia coli ST131 papGII+ sublineages. Commun. Biol. 5, 752. https://doi.org/10.1038/s42003-022-03660-x

Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30, 2114–2120. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170

Bortolaia, V., Kaas, R.S., Ruppe, E., Roberts, M.C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R.L., Rebelo, A.R., Florensa, A.F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T.,

Neumann, B., Werner, G., Bender, J.K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B.B., Malhotra-Kumar, S., Westh, H., Pinholt, M., Anjum, M.F., Duggett, N.A., Kempf, I., Nykäsenoja, S., Olkkola, S., Wieczorek, K., Amaro, A., Clemente, L., Mossong, J., Losch, S., Ragimbeau, C., Lund, O., Aarestrup, F.M., 2020. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. J. Antimicrob. Chemother. 75, 3491–3500. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345

Boxall, A.B.A., Rudd, M.A., Brooks, B.W., Caldwell, D.J., Choi, K., Hickmann, S., Innes, E., Ostapyk, K., Staveley, J.P., Verslycke, T., Ankley, G.T., Beazley, K.F., Belanger, S.E., Berninger, J.P., Carriquiriborde, P., Coors, A., DeLeo, P.C., Dyer, S.D., Ericson, J.F., Gagné, F., Giesy, J.P., Gouin, T., Hallstrom, L., Karlsson, M.V., Larsson, D.G.J., Lazorchak, J.M., Mastrocco, F., McLaughlin, A., McMaster, M.E., Meyerhoff, R.D., Moore, R., Parrott, J.L., Snape, J.R., Murray-Smith, R., Servos, M.R., Sibley, P.K., Straub, J.O., Szabo, N.D., Topp, E., Tetreault, G.R., Trudeau, V.L., Van Der Kraak, G., 2012. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What Are the Big Questions? Environ. Health Perspect. 120, 1221–1229. https://doi.org/10.1289/ehp.1104477

Bradford, P.A., 2001. Extended-Spectrum β-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. Clin. Microbiol. Rev. 14, 933–951. https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001

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, 563–569. https://doi.org/10.1128/AAC.41.3.563

Briñas, L., Zarazaga, M., Sáenz, Y., Ruiz-Larrea, F., Torres, C., 2002. β-Lactamases in Ampicillin-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Foods, Humans, and Healthy Animals. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 3156–3163. https://doi.org/10.1128/AAC.46.10.3156-3163.2002

Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Carter, A.P., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., Ramakrishnan, V., 2000. The Structural Basis for the Action of the Antibiotics Tetracycline, Pactamycin, and Hygromycin B on the 30S Ribosomal Subunit. Cell 103, 1143–1154. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00216-6

Bush, K., Jacoby, G.A., 2010. Updated Functional Classification of β-Lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 969–976. https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09

Butler, K., English, A.R., Ray, V.A., Timreck, A.E., 1970. Carbenicillin: Chemistry and Mode of Action. J. Infect. Dis. 122, S1–S8. https://doi.org/10.1093/infdis/122.Supplement_1.S1

Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Møller Aarestrup, F., Hasman, H., 2014. *In Silico* Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 3895–3903. https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14

Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C.-J., Nordmann, P., 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. J. Antimicrob. Chemother. 60, 394–397. https://doi.org/10.1093/jac/dkm204

Cavaco, L.M., Hasman, H., Xia, S., Aarestrup, F.M., 2009. *qnrD* , a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin. Antimicrob. Agents Chemother. 53, 603–608. https://doi.org/10.1128/AAC.00997-08

Chernyshev, A., Fleischmann, T., Kohen, A., 2007. Thymidyl biosynthesis enzymes as antibiotic targets. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74, 282–289. https://doi.org/10.1007/s00253-006-0763-1

Chihara, S., Okuzumi, K., Yamamoto, Y., Oikawa, S., Hishinuma, A., 2011. First Case of New Delhi Metallo- -Lactamase 1-Producing Escherichia coli Infection in Japan. Clin. Infect. Dis. 52, 153–154. https://doi.org/10.1093/cid/ciq054

Choi, U., Lee, C.-R., 2019. Distinct Roles of Outer Membrane Porins in Antibiotic Resistance and Membrane Integrity in Escherichia coli. Front. Microbiol. 10, 953. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00953

Clardy, J., Fischbach, M.A., Currie, C.R., 2009. The natural history of antibiotics. Curr. Biol. 19, R437–R441. https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.04.001

Crofton, J., Mitchison, D.A., 1948. Streptomycin Resistance in Pulmonary Tuberculosis. BMJ 2, 1009–1015. https://doi.org/10.1136/bmj.2.4588.1009

Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M., Finlay, B.B., 2013. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia coli. Clin. Microbiol. Rev. 26, 822–880. https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13

D'Andrea, M.M., Arena, F., Pallecchi, L., Rossolini, G.M., 2013. CTX-M-type β-lactamases: A successful story of antibiotic resistance. Int. J. Med. Microbiol. 303, 305–317. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.008

Darby, E.M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M.S., Alav, I., Webber, M.A., Blair, J.M.A., 2023. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. Nat. Rev. Microbiol. 21, 280–295. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y

Dé, E., Baslé, A., Jaquinod, M., Saint, N., Malléa, M., Molle, G., Pagès, J., 2001. A new mechanism of antibiotic resistance in Enterobacteriaceae induced by a structural modification of the major porin. Mol. Microbiol. 41, 189–198. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02501.x

Dong, P., Cui, Q., Fang, T., Huang, Y., Wang, H., 2019. Occurrence of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in water and sediment in urban recreational water. J. Environ. Sci. 77, 65–74. https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.06.011

Drusano, G.L., Schimpff, S.C., Hewitt, W.L., 1984. The Acylampicillins: Mezlocillin, Piperacillin, and Azlocillin. Clin. Infect. Dis. 6, 13–32. https://doi.org/10.1093/clinids/6.1.13

Edgar, R., Bibi, E., 1997. MdfA, an Escherichia coli multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. J. Bacteriol. 179, 2274–2280. https://doi.org/10.1128/jb.179.7.2274-2280.1997

Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E., Vila, J., 2009. Mechanism of action of and resistance to quinolones. Microb. Biotechnol. 2, 40–61. https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00063.x

Falgenhauer, L., Zur Nieden, A., Harpel, S., Falgenhauer, J., Domann, E., 2021. Clonal CTX-M-15-Producing Escherichia coli ST-949 Are Present in German Surface Water. Front. Microbiol. 12, 617349. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.617349

Fernandes, R., Amador, P., Prudêncio, C., 2013. β-Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. Rev. Med. Microbiol. 24, 7–17. https://doi.org/10.1097/MRM.0b013e3283587727

Fleming, A., 1929. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzæ. Br. J. Exp. Pathol. 10, 226–236.

Fritsche, T.R., Sader, H.S., Jones, R.N., 2008. Antimicrobial activity of ceftobiprole, a novel anti–methicillin-resistant Staphylococcus aureus cephalosporin, tested against contemporary pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2005–2006). Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 61, 86–95. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.02.008

Gao, L., Shi, Y., Li, W., Liu, J., Cai, Y., 2012. Occurrence, distribution and bioaccumulation of antibiotics in the Haihe River in China. J. Environ. Monit. 14, 1248. https://doi.org/10.1039/c2em10916f

Girlich, D., Bonnin, R.A., Naas, T., 2020. Occurrence and Diversity of CTX-M-Producing Escherichia coli From the Seine River. Front. Microbiol. 11, 603578. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.603578

Goldstein, E.J.C., Proctor, R.A., 2008. Role of Folate Antagonists in the Treatment of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection. Clin. Infect. Dis. 46, 584–593. https://doi.org/10.1086/525536

Gould, I.M., David, M.Z., Esposito, S., Garau, J., Lina, G., Mazzei, T., Peters, G., 2012. New insights into meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. Int. J. Antimicrob. Agents 39, 96–104. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.09.028

Gould, K., 2016. Antibiotics: from prehistory to the present day. J. Antimicrob. Chemother. 71, 572–575. https://doi.org/10.1093/jac/dkv484

Halawa, E.M., Fadel, M., Al-Rabia, M.W., Behairy, A., Nouh, N.A., Abdo, M., Olga, R., Fericean, L., Atwa, A.M., El-Nablaway, M., Abdeen, A., 2024. Antibiotic action and resistance: updated review of mechanisms, spread, influencing factors, and alternative approaches for combating resistance. Front. Pharmacol. 14, 1305294. https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1305294

Han, Q.F., Zhao, S., Zhang, X.R., Wang, X.L., Song, C., Wang, S.G., 2020. Distribution, combined pollution and risk assessment of antibiotics in typical marine aquaculture farms surrounding the Yellow Sea, North China. Environ. Int. 138, 105551. https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105551

Hancock, R.E., Farmer, S.W., Li, Z.S., Poole, K., 1991. Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of

Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother. 35, 1309–1314. https://doi.org/10.1128/AAC.35.7.1309

Hartmann, G., Honikel, K.O., Knüsel, F., Nüesch, J., 1967. The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. Biochim. Biophys. Acta BBA - Nucleic Acids Protein Synth. 145, 843–844. https://doi.org/10.1016/0005-2787(67)90147-5

Hasan, C.M., Dutta, D., Nguyen, A.N.T., 2021. Revisiting Antibiotic Resistance: Mechanistic Foundations to Evolutionary Outlook. Antibiotics 11, 40. https://doi.org/10.3390/antibiotics11010040

Hawaldar, R., Sadhna, S., 2019. Prevalence and drug resistance pattern of Citrobacter sps – A retrospective study. Indian J. Microbiol. Res. 6, 142–145. https://doi.org/10.18231/j.ijmr.2019.030

Helsens, N., Sadek, M., Le Terrier, C., Poirel, L., Nordmann, P., 2024. Reduced susceptibility to aztreonam-avibactam conferred by acquired AmpC-type β-lactamases in PBP3-modified Escherichia coli. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. https://doi.org/10.1007/s10096-024-04769-z

Hem, S., Cummins, M.L., Wyrsch, E.R., Drigo, B., Hoye, B.J., Maute, K., Sanderson-Smith, M., Gorman, J., Bogema, D.R., Jenkins, C., Deutscher, A.T., Yam, J., Hai, F., Donner, E., Jarocki, V.M., Djordjevic, S.P., 2024. Genomic analysis of Citrobacter from Australian wastewater and silver gulls reveals novel sequence types carrying critically important antibiotic resistance genes. Sci. Total Environ. 909, 168608. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168608

Hirsch, E.B., Tam, V.H., 2010. Detection and treatment options for Klebsiella pneumoniae carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. J. Antimicrob. Chemother. 65, 1119–1125. https://doi.org/10.1093/jac/dkq108

Hornsey, M., Phee, L., Wareham, D.W., 2011. A Novel Variant, NDM-5, of the New Delhi Metallo-β-Lactamase in a Multidrug-Resistant Escherichia coli ST648 Isolate Recovered from a Patient in the United Kingdom. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 5952–5954. https://doi.org/10.1128/AAC.05108-11

Hrabák, J., Stolbová, M., Studentová, V., Fridrichová, M., Chudáčková, E., Zemlickova, H., 2012. NDM-1 producing Acinetobacter baumannii isolated from a patient repatriated to the Czech Republic from Egypt, July 2011. Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull. 17, 20085.

Hu, X.E., Kim, N.K., Gray, J.L., Almstead, J.-I.K., Seibel, W.L., Ledoussal, B., 2003. Discovery of (3 *S*)-Amino-(4 *R*)-ethylpiperidinyl Quinolones as Potent Antibacterial Agents with a Broad Spectrum of Activity and Activity against Resistant Pathogens. J. Med. Chem. 46, 3655–3661. https://doi.org/10.1021/jm030272n

Husnik, F., McCutcheon, J.P., 2018. Functional horizontal gene transfer from bacteria to eukaryotes. Nat. Rev. Microbiol. 16, 67–79. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.137

Hutchings, M.I., Truman, A.W., Wilkinson, B., 2019. Antibiotics: past, present and future. Curr. Opin. Microbiol. 51, 72–80. https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008

Iaconis, J.P., Sanders, C.C., 1990. Purification and characterization of inducible beta-lactamases in Aeromonas spp. Antimicrob. Agents Chemother. 34, 44–51. https://doi.org/10.1128/AAC.34.1.44

Jacoby, G.A., 2009. AmpC β-Lactamases. Clin. Microbiol. Rev. 22, 161–182. https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08

Janda, J.M., Abbott, S.L., 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. J. Clin. Microbiol. 45, 2761–2764. https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07

Janda, J.M., Abbott, S.L., Cheung, W.K., Hanson, D.F., 1994. Biochemical identification of citrobacteria in the clinical laboratory. J. Clin. Microbiol. 32, 1850–1854. https://doi.org/10.1128/jcm.32.8.1850-1854.1994

Jiang, Z.-D., DuPont, H.L., La Rocco, M., Garey, K.W., 2010. In vitro susceptibility of *Clostridium difficile* to rifaximin and rifampin in 359 consecutive isolates at a university hospital in Houston, Texas. J. Clin. Pathol. 63, 355–358. https://doi.org/10.1136/jcp.2009.071688

Johnson, A.P., Woodford, N., 2013. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-β-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. J. Med. Microbiol. 62, 499–513. https://doi.org/10.1099/jmm.0.052555-0

Jolley, K.A., Bray, J.E., Maiden, M.C.J., 2018. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. Wellcome Open Res. 3, 124. https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1

Juraschek, K., Malekzadah, J., Malorny, B., Käsbohrer, A., Schwarz, S., Meemken, D., Hammerl, J.A., 2022. Characterization of qnrB-carrying plasmids from ESBL- and non-ESBL-producing Escherichia coli. BMC Genomics 23, 365. https://doi.org/10.1186/s12864-022-08564-y

Kahan, F.M., Kropp, H., Sundelof, J.G., Birnbaum, J., 1983. Thienamycin: development of imipenem-cilastatin. J. Antimicrob. Chemother. 12, 1–35. https://doi.org/10.1093/jac/12.suppl_D.1

Kahan, J.S., Kahan, F.M., Goegelman, R., Currie, S.A., Jackson, M., Stapley, E.O., Miller, T.W., Miller, A.K., Hendlin, D., Mochales, S., Hernandez, S., Woodruff, H.B., Birnbaum, J., 1979. Thienamycin, a new .BETA.-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. J. Antibiot. (Tokyo) 32, 1–12. https://doi.org/10.7164/antibiotics.32.1

Kang, E., Crouse, A., Chevallier, L., Pontier, S.M., Alzahrani, A., Silué, N., Campbell-Valois, F.-X., Montagutelli, X., Gruenheid, S., Malo, D., 2018. Enterobacteria and host resistance to infection. Mamm. Genome 29, 558–576. https://doi.org/10.1007/s00335-018-9749-4

Karczmarczyk, M., Martins, M., McCusker, M., Mattar, S., Amaral, L., Leonard, N., Aarestrup, F.M., Fanning, S., 2010. Characterization of antimicrobial resistance in Salmonella enterica food and animal isolates from Colombia: identification of a qnrB19-mediated quinolone resistance marker in two novel serovars:

QnrB19 in Colombian Salmonellae from foods. FEMS Microbiol. Lett. 313, 10–19. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02119.x

Kaur, K., Reddy, S., Barathe, P., Oak, U., Shriram, V., Kharat, S.S., Govarthanan, M., Kumar, V., 2022. Microplastic-associated pathogens and antimicrobial resistance in environment. Chemosphere 291, 133005. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133005

Kaur Sodhi, K., Singh, C.K., 2022. Recent development in the sustainable remediation of antibiotics: A review. Total Environ. Res. Themes 3–4, 100008. https://doi.org/10.1016/j.totert.2022.100008

Kernodle, D.S., Stratton, C.W., Mcmurray, L.W., Chipley, J.R., Mcgraw, P.A., 1989. Differentiation of -Lactamase Variants of Staphylococcus aureus by Substrate Hydrolysis Profiles. J. Infect. Dis. 159, 103–108. https://doi.org/10.1093/infdis/159.1.103

Kieffer, N., Royer, G., Decousser, J.-W., Bourrel, A.-S., Palmieri, M., Ortiz De La Rosa, J.-M., Jacquier, H., Denamur, E., Nordmann, P., Poirel, L., 2019. *mcr-9* , an Inducible Gene Encoding an Acquired Phosphoethanolamine Transferase in Escherichia coli, and Its Origin. Antimicrob. Agents Chemother. 63, e00965-19. https://doi.org/10.1128/AAC.00965-19

Kim, H.B., Park, C.H., Kim, C.J., Kim, E.-C., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., 2009a. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants over a 9-Year Period. Antimicrob. Agents Chemother. 53, 639–645. https://doi.org/10.1128/AAC.01051-08

Kim, H.B., Wang, M., Park, C.H., Kim, E.-C., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., 2009b. *oqxAB* Encoding a Multidrug Efflux Pump in Human Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae*. Antimicrob. Agents Chemother. 53, 3582–3584. https://doi.org/10.1128/AAC.01574-08

Klein, E.Y., Impalli, I., Poleon, S., Denoel, P., Cipriano, M., Van Boeckel, T.P., Pecetta, S., Bloom, D.E., Nandi, A., 2024. Global trends in antibiotic consumption during 2016–2023 and future projections through 2030. Proc. Natl. Acad. Sci. 121, e2411919121. https://doi.org/10.1073/pnas.2411919121

Kricker, J.A., Page, C.P., Gardarsson, F.R., Baldursson, O., Gudjonsson, T., Parnham, M.J., 2021. Nonantimicrobial Actions of Macrolides: Overview and Perspectives for Future Development. Pharmacol. Rev. 73, 1404–1433. https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000300

Kunin, C.M., 1996. Antimicrobial Activity of Rifabutin. Clin. Infect. Dis. 22, S3–S14. https://doi.org/10.1093/clinids/22.Supplement_1.S3

Kutilova, I., Valcek, A., Papagiannitsis, C.C., Cejkova, D., Masarikova, M., Paskova, V., Davidova-Gerzova, L., Videnska, P., Hrabak, J., Literak, I., Dolejska, M., 2020. Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria from American Crows in the United States. Antimicrob. Agents Chemother. 65, e00586-20. https://doi.org/10.1128/AAC.00586-20

Lacher, D.W., Steinsland, H., Blank, T.E., Donnenberg, M.S., Whittam, T.S., 2007. Molecular Evolution of Typical Enteropathogenic *Escherichia coli* : Clonal Analysis

by Multilocus Sequence Typing and Virulence Gene Allelic Profiling. J. Bacteriol. 189, 342–350. https://doi.org/10.1128/JB.01472-06

Landman, D., Babu, E., Shah, N., Kelly, P., Backer, M., Bratu, S., Quale, J., 2010. Activity of a novel aminoglycoside, ACHN-490, against clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae from New York City. J. Antimicrob. Chemother. 65, 2123–2127. https://doi.org/10.1093/jac/dkq278

Lauretti, L., Riccio, M.L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., Rossolini, G.M., 1999. Cloning and Characterization of *bla*$_{VIM}$, a New Integron-Borne Metallo-β-Lactamase Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 1584–1590. https://doi.org/10.1128/AAC.43.7.1584

Lavigne, J.-P., Defez, C., Bouziges, N., Mahamat, A., Sotto, A., 2007. Clinical and molecular epidemiology of multidrug-resistant Citrobacter spp. infections in a French university hospital. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 26, 439–441. https://doi.org/10.1007/s10096-007-0315-3

Lee, J.H., Tareen, A.R., Kim, N.-H., Jeong, C., Kang, B., Lee, G., Kim, D.-W., Zahra, R., Lee, S.H., 2024. Complete genome sequence of a high-risk *Escherichia coli* ST10 isolated from avian feces in Pakistan. Microbiol. Resour. Announc. 13, e00769-24. https://doi.org/10.1128/mra.00769-24

Lei, C.-W., Zhang, Y., Wang, Y.-T., Wang, H.-N., 2020. Detection of Mobile Colistin Resistance Gene *mcr-10.1* in a Conjugative Plasmid from *Enterobacter roggenkampii* of Chicken Origin in China. Antimicrob. Agents Chemother. 64, e01191-20. https://doi.org/10.1128/AAC.01191-20

Leonard, A.F.C., Zhang, L., Balfour, A.J., Garside, R., Hawkey, P.M., Murray, A.K., Ukoumunne, O.C., Gaze, W.H., 2018. Exposure to and colonisation by antibiotic-resistant E. coli in UK coastal water users: Environmental surveillance, exposure assessment, and epidemiological study (Beach Bum Survey). Environ. Int. 114, 326–333. https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.11.003

Levine, C., Hiasa, H., Marians, K.J., 1998. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr. 1400, 29–43. https://doi.org/10.1016/S0167-4781(98)00126-2

Lewis, J.S., Herrera, M., Wickes, B., Patterson, J.E., Jorgensen, J.H., 2007. First Report of the Emergence of CTX-M-Type Extended-Spectrum β-Lactamases (ESBLs) as the Predominant ESBL Isolated in a U.S. Health Care System. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 4015–4021. https://doi.org/10.1128/AAC.00576-07

Li, S., Liu, Y., Wu, Y., Hu, J., Zhang, Y., Sun, Q., Sun, W., Geng, J., Liu, X., Jia, D., You, X., Qi, D., Tang, M., Lyu, Y., Kong, F., Cai, L., Ai, Y., Wang, Y., Ni, J., 2022. Antibiotics in global rivers. Natl. Sci. Open 1, 20220029. https://doi.org/10.1360/nso/20220029

Li, X.M., Zhu, Y.J., Ringø, E., yang, deguo, 2019. Prevalence of Aeromonas hydrophila and Pseudomonas fluorescens and factors influencing them in different freshwater fish ponds. Iran. J. Fish. Sci. https://doi.org/10.22092/ijfs.2019.120174

Li, X.Z., Nikaido, H., Poole, K., 1995. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 1948–1953. https://doi.org/10.1128/AAC.39.9.1948

Lim, H.M., Pène, J.J., Shaw, R.W., 1988. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the Bacillus cereus 5/B/6 beta-lactamase II structural gene. J. Bacteriol. 170, 2873–2878. https://doi.org/10.1128/jb.170.6.2873-2878.1988

Lima, L.M., Silva, B.N.M.D., Barbosa, G., Barreiro, E.J., 2020. β-lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. Eur. J. Med. Chem. 208, 112829. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829

Lipsky, B.A., Hook, E.W., Smith, A.A., Plorde, J.J., 1980. Citrobacter Infections in Humans: Experience at the Seattle Veterans Administration Medical Center and a Review of the Literature. Clin. Infect. Dis. 2, 746–760. https://doi.org/10.1093/clinids/2.5.746

Liu, L., Zhang, L., Zhou, H., Yuan, M., Hu, D., Wang, Y., Sun, H., Xu, J., Lan, R., 2021. Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of Citrobacter spp. Causing Extraintestinal Infections. Front. Cell. Infect. Microbiol. 11, 737636. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.737636

Liu, X., Zhang, G., Liu, Y., Lu, S., Qin, P., Guo, X., Bi, B., Wang, L., Xi, B., Wu, F., Wang, W., Zhang, T., 2019. Occurrence and fate of antibiotics and antibiotic resistance genes in typical urban water of Beijing, China. Environ. Pollut. 246, 163–173. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.005

Liu, Y., Breukink, E., 2016. The Membrane Steps of Bacterial Cell Wall Synthesis as Antibiotic Targets. Antibiotics 5, 28. https://doi.org/10.3390/antibiotics5030028

Lou, H., Chen, M., Black, S.S., Bushell, S.R., Ceccarelli, M., Mach, T., Beis, K., Low, A.S., Bamford, V.A., Booth, I.R., Bayley, H., Naismith, J.H., 2011. Altered Antibiotic Transport in OmpC Mutants Isolated from a Series of Clinical Strains of Multi-Drug Resistant E. coli. PLoS ONE 6, e25825. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025825

M. Patil, S., Patel, P., 2021. Bactericidal and Bacteriostatic Antibiotics, in: Neri, V., Huang, L., Li, J. (Eds.), Infections and Sepsis Development. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.99546

MacGowan, A., Macnaughton, E., 2017. Antibiotic resistance. Medicine (Baltimore) 45, 622–628. https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.07.006

Madsen, J.S., Burmølle, M., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., 2012. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 65, 183–195. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x

Maghsodian, Z., Sanati, A.M., Mashifana, T., Sillanpää, M., Feng, S., Nhat, T., Ramavandi, B., 2022. Occurrence and Distribution of Antibiotics in the Water, Sediment, and Biota of Freshwater and Marine Environments: A Review. Antibiotics 11, 1461. https://doi.org/10.3390/antibiotics11111461

Marchiaro, P., Ballerini, V., Spalding, T., Cera, G., Mussi, M.A., Moran-Barrio, J., Vila, A.J., Viale, A.M., Limansky, A.S., 2008. A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative

carbapenemase producers. J. Antimicrob. Chemother. 62, 336–344. https://doi.org/10.1093/jac/dkn185

Martak, D., Henriot, C.P., Broussier, M., Couchoud, C., Valot, B., Richard, M., Couchot, J., Bornette, G., Hocquet, D., Bertrand, X., 2020. High Prevalence of Human-Associated Escherichia coli in Wetlands Located in Eastern France. Front. Microbiol. 11, 552566. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.552566

Marti, E., Jofre, J., Balcazar, J.L., 2013. Prevalence of Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Community Composition in a River Influenced by a Wastewater Treatment Plant. PLoS ONE 8, e78906. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078906

Martínez, J.L., 2008. Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. Science 321, 365–367. https://doi.org/10.1126/science.1159483

Mlynarcik, P., Dolejska, M., Vagnerova, I., Kutilová, I., Kolar, M., 2021. Detection of clinically important β -lactamases by using PCR. FEMS Microbiol. Lett. 368, fnab068. https://doi.org/10.1093/femsle/fnab068

Mohanty, S., Singhal, R., Sood, S., Dhawan, B., Kapil, A., Das, B.K., 2007. Citrobacter infections in a tertiary care hospital in Northern India. J. Infect. 54, 58–64. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.01.015

Moore, R.A., Bates, N.C., Hancock, R.E., 1986. Interaction of polycationic antibiotics with Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide and lipid A studied by using dansyl-polymyxin. Antimicrob. Agents Chemother. 29, 496–500. https://doi.org/10.1128/AAC.29.3.496

Morales-López, S., Yepes, J.A., Prada-Herrera, J.C., Torres-Jiménez, A., 2019. Enterobacteria in the 21st century: a review focused on taxonomic changes. J. Infect. Dev. Ctries. 13, 265–273. https://doi.org/10.3855/jidc.11216

Murray, C.J.L., Ikuta, K.S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S.C., Browne, A.J., Chipeta, M.G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B.H., Kumaran, E.A.P., McManigal, B., Achalapong, S., Agarwal, R., Akech, S., Albertson, S., Amuasi, J., Andrews, J., Aravkin, A., Ashley, E., Babin, F.-X., Bailey, F., Baker, S., Basnyat, B., Bekker, A., Bender, R., Berkley, J.A., Bethou, A., Bielicki, J., Boonkasidecha, S., Bukosia, J., Carvalheiro, C., Castañeda-Orjuela, C., Chansamouth, V., Chaurasia, S., Chiurchiù, S., Chowdhury, F., Clotaire Donatien, R., Cook, A.J., Cooper, B., Cressey, T.R., Criollo-Mora, E., Cunningham, M., Darboe, S., Day, N.P.J., De Luca, M., Dokova, K., Dramowski, A., Dunachie, S.J., Duong Bich, T., Eckmanns, T., Eibach, D., Emami, A., Feasey, N., Fisher-Pearson, N., Forrest, K., Garcia, C., Garrett, D., Gastmeier, P., Giref, A.Z., Greer, R.C., Gupta, V., Haller, S., Haselbeck, A., Hay, S.I., Holm, M., Hopkins, S., Hsia, Y., Iregbu, K.C., Jacobs, J., Jarovsky, D., Javanmardi, F., Jenney, A.W.J., Khorana, M., Khusuwan, S., Kissoon, N., Kobeissi, E., Kostyanev, T., Krapp, F., Krumkamp, R., Kumar, A., Kyu, H.H., Lim, C., Lim, K., Limmathurotsakul, D., Loftus, M.J., Lunn, M., Ma, J., Manoharan, A., Marks, F., May, J., Mayxay, M., Mturi, N., Munera-Huertas, T., Musicha, P., Musila, L.A., Mussi-Pinhata, M.M., Naidu, R.N., Nakamura, T., Nanavati, R., Nangia, S., Newton, P., Ngoun, C., Novotney, A., Nwakanma, D., Obiero, C.W., Ochoa, T.J.,

Olivas-Martinez, A., Olliaro, P., Ooko, E., Ortiz-Brizuela, E., Ounchanum, P., Pak, G.D., Paredes, J.L., Peleg, A.Y., Perrone, C., Phe, T., Phommasone, K., Plakkal, N., Ponce-de-Leon, A., Raad, M., Ramdin, T., Rattanavong, S., Riddell, A., Roberts, T., Robotham, J.V., Roca, A., Rosenthal, V.D., Rudd, K.E., Russell, N., Sader, H.S., Saengchan, W., Schnall, J., Scott, J.A.G., Seekaew, S., Sharland, M., Shivamallappa, M., Sifuentes-Osornio, J., Simpson, A.J., Steenkeste, N., Stewardson, A.J., Stoeva, T., Tasak, N., Thaiprakong, A., Thwaites, G., Tigoi, C., Turner, C., Turner, P., Van Doorn, H.R., Velaphi, S., Vongpradith, A., Vongsouvath, M., Vu, H., Walsh, T., Walson, J.L., Waner, S., Wangrangsimakul, T., Wannapinij, P., Wozniak, T., Young Sharma, T.E.M.W., Yu, K.C., Zheng, P., Sartorius, B., Lopez, A.D., Stergachis, A., Moore, C., Dolecek, C., Naghavi, M., 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet 399, 629–655. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0

Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11, 142–201. https://doi.org/10.1128/CMR.11.1.142

Nikaido, H., 2003. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67, 593–656. https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003

Nishino, K., Yamaguchi, A., 2001. Analysis of a Complete Library of Putative Drug Transporter Genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 183, 5803–5812. https://doi.org/10.1128/JB.183.20.5803-5812.2001

Nukaga, M., Haruta, S., Tanimoto, K., Kogure, K., Taniguchi, K., Tamaki, M., Sawai, T., 1995. Molecular Evolution of a Class C β-Lactamase Extending Its Substrate Specificity. J. Biol. Chem. 270, 5729–5735. https://doi.org/10.1074/jbc.270.11.5729

Ondarza, P.M., Haddad, S.P., Avigliano, E., Miglioranza, K.S.B., Brooks, B.W., 2019. Pharmaceuticals, illicit drugs and their metabolites in fish from Argentina: Implications for protected areas influenced by urbanization. Sci. Total Environ. 649, 1029–1037. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.383

Oshiro, B.T., 1999. The Semisynthetic Penicillins. Prim. Care Update OBGYNS 6, 56–60. https://doi.org/10.1016/S1068-607X(98)00184-X

Pai, H., Seo, M.-R., Choi, T.Y., 2007. Association of QnrB Determinants and Production of Extended-Spectrum β-Lactamases or Plasmid-Mediated AmpC β-Lactamases in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 366–368. https://doi.org/10.1128/AAC.00841-06

Paladino, J.A., Sunderlin, J.L., Singer, M.E., Adelman, M.H., Schentag, J.J., 2008. Influence of extended-spectrum β-lactams on gram-negative bacterial resistance. Am. J. Health. Syst. Pharm. 65, 1154–1159. https://doi.org/10.2146/ajhp070435

Pana, Z.D., Zaoutis, T., 2018. Treatment of extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBLs) infections: what have we learned until now? F1000Research 7, 1347. https://doi.org/10.12688/f1000research.14822.1

Pankey, G.A., Sabath, L.D., 2004. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. Clin. Infect. Dis. 38, 864–870. https://doi.org/10.1086/381972

Pantanella, F., Lekunberri, I., Gagliardi, A., Venuto, G., Sànchez-Melsió, A., Fabiani, M., Balcázar, J.L., Schippa, S., De Giusti, M., Borrego, C., Solimini, A., 2020. Effect of Urban Wastewater Discharge on the Abundance of Antibiotic Resistance Genes and Antibiotic-Resistant Escherichia coli in Two Italian Rivers. Int. J. Environ. Res. Public. Health 17, 6813. https://doi.org/10.3390/ijerph17186813

Papp-Wallace, K.M., Bethel, C.R., Distler, A.M., Kasuboski, C., Taracila, M., Bonomo, R.A., 2010. Inhibitor Resistance in the KPC-2 β-Lactamase, a Preeminent Property of This Class A β-Lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 890–897. https://doi.org/10.1128/AAC.00693-09

Paramita, R.I., Nelwan, E.J., Fadilah, F., Renesteen, E., Puspandari, N., Erlina, L., 2020. Genome-based characterization of Escherichia coli causing bloodstream infection through next-generation sequencing. PLOS ONE 15, e0244358. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244358

Park, C.H., Robicsek, A., Jacoby, G.A., Sahm, D., Hooper, D.C., 2006. Prevalence in the United States of *aac(6 ') - Ib - cr* Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 3953–3955. https://doi.org/10.1128/AAC.00915-06

Pawlowski, A.C., Wang, W., Koteva, K., Barton, H.A., McArthur, A.G., Wright, G.D., 2016. A diverse intrinsic antibiotic resistome from a cave bacterium. Nat. Commun. 7, 13803. https://doi.org/10.1038/ncomms13803

Peirano, G., Pillai, D.R., Pitondo-Silva, A., Richardson, D., Pitout, J.D.D., 2011. The characteristics of NDM-producing Klebsiella pneumoniae from Canada. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 71, 106–109. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.06.013

Peirano, G., Pitout, J.D.D., 2019. Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. Drugs 79, 1529–1541. https://doi.org/10.1007/s40265-019-01180-3

Pérez-Pérez, F.J., Hanson, N.D., 2002. Detection of Plasmid-Mediated AmpC β-Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 40, 2153–2162. https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002

Petrova, M., Gorlenko, Z., Mindlin, S., 2009. Molecular structure and translocation of a multiple antibiotic resistance region of a *Psychrobacter psychrophilus* permafrost strain. FEMS Microbiol. Lett. 296, 190–197. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01635.x

Poirel, L., De La Rosa, J.-M.O., Richard, A., Aires-de-Sousa, M., Nordmann, P., 2019. CTX-M-33 Is a CTX-M-15 Derivative Conferring Reduced Susceptibility to Carbapenems. Antimicrob. Agents Chemother. 63, e01515-19. https://doi.org/10.1128/AAC.01515-19

Poirel, L., Jayol, A., Nordmann, P., 2017. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. Clin. Microbiol. Rev. 30, 557–596. https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16

Poirel, L., Naas, T., Nicolas, D., Collet, L., Bellais, S., Cavallo, J.-D., Nordmann, P., 2000. Characterization of VIM-2, a Carbapenem-Hydrolyzing Metallo-β-Lactamase

and Its Plasmid- and Integron-Borne Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate in France. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 891–897. https://doi.org/10.1128/AAC.44.4.891-897.2000

Poirel, L., Walsh, T.R., Cuvillier, V., Nordmann, P., 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 70, 119–123. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002

Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., Korobeynikov, A., 2020. Using SPAdes De Novo Assembler. Curr. Protoc. Bioinforma. 70, e102. https://doi.org/10.1002/cpbi.102

Proia, L., Von Schiller, D., Sànchez-Melsió, A., Sabater, S., Borrego, C.M., Rodríguez-Mozaz, S., Balcázar, J.L., 2016. Occurrence and persistence of antibiotic resistance genes in river biofilms after wastewater inputs in small rivers. Environ. Pollut. 210, 121–128. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.11.035

Quale, J., Bratu, S., Gupta, J., Landman, D., 2006. Interplay of Efflux System, *ampC* , and *oprD* Expression in Carbapenem Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 1633–1641. https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1633-1641.2006

Queenan, A.M., Bush, K., 2007. Carbapenemases: the Versatile β-Lactamases. Clin. Microbiol. Rev. 20, 440–458. https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07

Queenan, A.M., Foleno, B., Gownley, C., Wira, E., Bush, K., 2004. Effects of Inoculum and β-Lactamase Activity in AmpC- and Extended-Spectrum β-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Tested by Using NCCLS ESBL Methodology. J. Clin. Microbiol. 42, 269–275. https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.269-275.2004

Quiroga, M.P., Andres, P., Petroni, A., Soler Bistué, A.J.C., Guerriero, L., Vargas, L.J., Zorreguieta, A., Tokumoto, M., Quiroga, C., Tolmasky, M.E., Galas, M., Centrón, D., 2007. Complex Class 1 Integrons with Diverse Variable Regions, Including *aac* (*6 ′*)- *Ib* - *cr* , and a Novel Allele, *qnrB10* , Associated with IS *CR1* in Clinical Enterobacterial Isolates from Argentina. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 4466–4470. https://doi.org/10.1128/AAC.00726-07

Rådström, P., Swedberg, G., Sköld, O., 1991. Genetic analyses of sulfonamide resistance and its dissemination in gram-negative bacteria illustrate new aspects of R plasmid evolution. Antimicrob. Agents Chemother. 35, 1840–1848. https://doi.org/10.1128/AAC.35.9.1840

Ramirez, M.S., Tolmasky, M.E., 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist. Updat. 13, 151–171. https://doi.org/10.1016/j.drup.2010.08.003

Rammelkamp, C.H., Keefer, C.S., 1943. PENICILLIN: ITS ANTIBACTERIAL EFFECT IN WHOLE BLOOD AND SERUM FOR THE HEMOLYTIC STREPTOCOCCUS AND STAPHYLOCOCCUS AUREUS 1. J. Clin. Invest. 22, 649–657. https://doi.org/10.1172/JCI101437

Ramsamy, Y., Mlisana, K.P., Amoako, D.G., Allam, M., Ismail, A., Singh, R., Abia, A.L.K., Essack, S.Y., 2020. Pathogenomic Analysis of a Novel Extensively Drug-Resistant Citrobacter freundii Isolate Carrying a blaNDM-1 Carbapenemase in South Africa. Pathogens 9, 89. https://doi.org/10.3390/pathogens9020089

Rapp, R.P., Urban, C., 2012. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemases in Enterobacteriaceae: History, Evolution, and Microbiology Concerns. Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther. 32, 399–407. https://doi.org/10.1002/j.1875-9114.2012.01035.x

Rastogi, N., Goh, K.S., Berchel, M., Bryskier, A., 2000. Activity of rifapentine and its metabolite 25-O-desacetylrifapentine compared with rifampicin and rifabutin against Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium africanum, Mycobacterium bovis and M. bovis BCG. J. Antimicrob. Chemother. 46, 565–570. https://doi.org/10.1093/jac/46.4.565

Rebelo, A.R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J.S., Pedersen, S.K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I.M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J.A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S.A., De Frutos Escobar, C., Malhotra-Kumar, S., Villa, L., Carattoli, A., Hendriksen, R.S., 2018. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. Eurosurveillance 23. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672

Reid, C.J., Cummins, M.L., Börjesson, S., Brouwer, M.S.M., Hasman, H., Hammerum, A.M., Roer, L., Hess, S., Berendonk, T., Nešporová, K., Haenni, M., Madec, J.-Y., Bethe, A., Michael, G.B., Schink, A.-K., Schwarz, S., Dolejska, M., Djordjevic, S.P., 2022. A role for ColV plasmids in the evolution of pathogenic Escherichia coli ST58. Nat. Commun. 13, 683. https://doi.org/10.1038/s41467-022-28342-4

Robicsek, Ari, Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Hye Park, C., Bush, K., Hooper, D.C., 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat. Med. 12, 83–88. https://doi.org/10.1038/nm1347

Robicsek, A., Strahilevitz, J., Sahm, D.F., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., 2006. *qnr* Prevalence in Ceftazidime-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolates from the United States. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 2872–2874. https://doi.org/10.1128/AAC.01647-05

Rodloff, A.C., Goldstein, E.J.C., Torres, A., 2006. Two decades of imipenem therapy. J. Antimicrob. Chemother. 58, 916–929. https://doi.org/10.1093/jac/dkl354

Rodriguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sànchez-Melsió, A., Borrego, C.M., Barceló, D., Balcázar, J.L., 2015. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. Water Res. 69, 234–242. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021

Roer, L., Hansen, F., Thomsen, M.C.F., Knudsen, J.D., Hansen, D.S., Wang, M., Samulionené, J., Justesen, U.S., Røder, B.L., Schumacher, H., Østergaard, C., Andersen, L.P., Dzajic, E., Søndergaard, T.S., Stegger, M., Hammerum, A.M., Hasman, H., 2017. WGS-based surveillance of third-generation cephalosporin-resistant Escherichia coli from bloodstream infections in Denmark. J. Antimicrob. Chemother. 72, 1922–1929. https://doi.org/10.1093/jac/dkx092

Russo, T.A., Johnson, J.R., 2000. Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli:* ExPEC. J. Infect. Dis. 181, 1753–1754. https://doi.org/10.1086/315418

Santos, C., Ramalheira, E., Da Silva, G., Mendo, S., 2017. Genetically unrelated multidrug- and carbapenem-resistant Citrobacter freundii detected in outpatients admitted to a Portuguese hospital. J. Glob. Antimicrob. Resist. 8, 18–22. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.09.010

Sawa, T., Kooguchi, K., Moriyama, K., 2020. Molecular diversity of extended-spectrum β-lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. J. Intensive Care 8, 13. https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6

Shafer, W.M., 2018. Mosaic Drug Efflux Gene Sequences from Commensal *Neisseria* Can Lead to Low-Level Azithromycin Resistance Expressed by *Neisseria gonorrhoeae* Clinical Isolates. mBio 9, e01747-18. https://doi.org/10.1128/mBio.01747-18

Sibinelli-Sousa, S., Hespanhol, J.T., Bayer-Santos, E., 2021. Targeting the Achilles' Heel of Bacteria: Different Mechanisms To Break Down the Peptidoglycan Cell Wall during Bacterial Warfare. J. Bacteriol. 203. https://doi.org/10.1128/JB.00478-20

Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P.K., Virdi, J.S., 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Front. Microbiol. 6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791

Sk□ld, O., 2001. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. Vet. Res. 32, 261–273. https://doi.org/10.1051/vetres:2001123

Snelling, A.M., Hawkey, P.M., Heritage, J., Downey, P., Homes, B., 1993. The use of a DNA probe and PCR to examine the distribution of the *aac(6′)-Ic* gene in *Serratia marcescens* and other Gram-negative bacteria. J. Antimicrob. Chemother. 31, 841–854. https://doi.org/10.1093/jac/31.6.841

Sodhi, K.K., Singh, C.K., Kumar, M., Singh, D.K., 2023. Whole-genome sequencing of Alcaligenes sp. strain MMA: insight into the antibiotic and heavy metal resistant genes. Front. Pharmacol. 14, 1144561. https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1144561

Stead, D.A., 2000. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App. 747, 69–93. https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00133-X

Tenover, F.C., 2006. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. Am. J. Med. 119, S3–S10. https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.011

The Lancet, 2023. One Health: a call for ecological equity. The Lancet 401, 169. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)00090-9

Tsuchido, T., Takano, M., 1988. Sensitization by heat treatment of Escherichia coli K-12 cells to hydrophobic antibacterial compounds. Antimicrob. Agents Chemother. 32, 1680–1683. https://doi.org/10.1128/AAC.32.11.1680

Van Heijnsbergen, E., Niebaum, G., Lämmchen, V., Borneman, A., Hernández Leal, L., Klasmeier, J., Schmitt, H., 2022. (Antibiotic-Resistant) *E. coli* in the Dutch–

German Vecht Catchment—Monitoring and Modeling. Environ. Sci. Technol. 56, 15064–15073. https://doi.org/10.1021/acs.est.2c00218

Veal, W.L., Nicholas, R.A., Shafer, W.M., 2002. Overexpression of the MtrC-MtrD-MtrE Efflux Pump Due to an *mtrR* Mutation Is Required for Chromosomally Mediated Penicillin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. J. Bacteriol. 184, 5619–5624. https://doi.org/10.1128/JB.184.20.5619-5624.2002

Vicens, Q., Westhof, E., 2003. RNA as a Drug Target: The Case of Aminoglycosides. ChemBioChem 4, 1018–1023. https://doi.org/10.1002/cbic.200300684

Vollmer, W., Blanot, D., De Pedro, M.A., 2008. Peptidoglycan structure and architecture. FEMS Microbiol. Rev. 32, 149–167. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x

Walther-Rasmussen, J., Høiby, N., 2006. OXA-type carbapenemases. J. Antimicrob. Chemother. 57, 373–383. https://doi.org/10.1093/jac/dki482

Wang, J., Chu, L., Wojnárovits, L., Takács, E., 2020. Occurrence and fate of antibiotics, antibiotic resistant genes (ARGs) and antibiotic resistant bacteria (ARB) in municipal wastewater treatment plant: An overview. Sci. Total Environ. 744, 140997. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140997

Wang, X., Wang, Yao, Zhou, Y., Li, J., Yin, W., Wang, S., Zhang, S., Shen, J., Shen, Z., Wang, Yang, 2018. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8* , in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. Emerg. Microbes Infect. 7, 1–9. https://doi.org/10.1038/s41426-018-0124-z

Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., Mitsuhashi, S., 1991. Transferable imipenem resistance in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. 35, 147–151. https://doi.org/10.1128/AAC.35.1.147

Wong, J.L.C., Romano, M., Kerry, L.E., Kwong, H.-S., Low, W.-W., Brett, S.J., Clements, A., Beis, K., Frankel, G., 2019. OmpK36-mediated Carbapenem resistance attenuates ST258 Klebsiella pneumoniae in vivo. Nat. Commun. 10, 3957. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11756-y

Wright, G.D., 1999. Aminoglycoside phosphotransferases proteins structure and mechanism. Front. Biosci. 4, d9-21. https://doi.org/10.2741/A408

Yao, Y., Falgenhauer, L., Falgenhauer, J., Hauri, A.M., Heinmüller, P., Domann, E., Chakraborty, T., Imirzalioglu, C., 2021. Carbapenem-Resistant Citrobacter spp. as an Emerging Concern in the Hospital-Setting: Results From a Genome-Based Regional Surveillance Study. Front. Cell. Infect. Microbiol. 11, 744431. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.744431

Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K., Walsh, T.R., 2009. Characterization of a New Metallo-β-Lactamase Gene, $bla_{\text{NDM-1}}$, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. Antimicrob. Agents Chemother. 53, 5046–5054. https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09

Yu, K., Huang, Z., Xiao, Y., Bai, X., Gao, H., Wang, D., 2024. Epidemiology and molecular characterization of CTX-M-type ESBLs producing Escherichia coli isolated from clinical settings. J. Glob. Antimicrob. Resist. 36, 181–187. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.11.013

Zanotto, C., Bissa, M., Illiano, E., Mezzanotte, V., Marazzi, F., Turolla, A., Antonelli, M., De Giuli Morghen, C., Radaelli, A., 2016. Identification of antibiotic-resistant Escherichia coli isolated from a municipal wastewater treatment plant. Chemosphere 164, 627–633. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.040

Zhang, X.-X., Zhang, T., 2011. Occurrence, Abundance, and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in 15 Sewage Treatment Plants across China and Other Global Locations. Environ. Sci. Technol. 45, 2598–2604. https://doi.org/10.1021/es103672x

Zscheck, K.K., Murray, B.E., 1991. Nucleotide sequence of the beta-lactamase gene from Enterococcus faecalis HH22 and its similarity to staphylococcal beta-lactamase genes. Antimicrob. Agents Chemother. 35, 1736–1740. https://doi.org/10.1128/AAC.35.9.1736

Příloha A PCR

Tab. 8: Zoznam použitých PCR primerov

Gén	Sekvencia (5´ - 3´)	Forward / Reverse	Dĺžka amplikonu (bp)	Referencia
bla$_{CTX-M}$	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA		554	(Lewis et al., 2007)
	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA			
bla$_{CMY-1}$	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT		520	(Pérez-Pérez and Hanson, 2002)
	CACATTGACATAGGTGTGGTGC			
bla$_{CMY-2}$	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA		462	(Pérez-Pérez and Hanson, 2002)
	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC			
bla$_{TEM}$	ACAGCGGTAAGATCCTTGAGAG		608	-
	ATAACTACGATACGGGAGGGC			
bla$_{SHV}$	CACTCAAGGATGTATTGTG		885	(Briñas et al., 2002)
	TTAGCGTTGCCAGTGCTCG			
bla$_{OXA-II}$	ACGATAGTTGTGGCAGACGAAC		602	-
	ATYCTGTTTGGCGTATCRATATTC			
bla$_{OXA-IV}$	GGAACAAAGAGTTCTCTGCCGAAG		719	-
	TTAGCCACCAATGATGCCCTC			
bla$_{DHA}$	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT		405	(Pérez-Pérez and Hanson, 2002)
	CCGTACGCATACTGGCTTTGC			
bla$_{ACC}$	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA		346	(Pérez-Pérez and Hanson, 2002)
	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC			
bla$_{ACT}$	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG		302	(Pérez-Pérez and Hanson, 2002)
	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT			
bla$_{FOX}$	AACATGGGGTATCAGGGAGATG		190	(Pérez-Pérez and Hanson, 2002)
	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG			
aac(6´)-Ib-cr	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA		482	(Park et al., 2006)
	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT			
qnrA	ATTTCTCACGCCAGGATTTG		516	(A. Robicsek et al., 2006)
	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA			
qnrB	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG		476	(Kim et al., 2009a)
	ATGAGCAACGATGCCTGGTA			
qnrC	GGGTTGTACATTTATTGAATCG		307	(Kim et al., 2009a)
	CACCTACCCATTTATTTTCA			
qnrS	GCAAGTTCATTGAACAGGGT		428	

	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		(Cattoir et al., 2007)
qnrD	CGAGATCAATTTACGGGGAATA AACAAGCTGAAGCGCCTG	582	(Cavaco et al., 2009)
qnrE1	GGAAAACTATCCGTACAAGG GGCTGACAGGTTAATCCATT	965	-
qepA	TGGTCTACGCCATGGACCTCA TGAATTCGGACACCGTCTCCG	1136	(Karczmarczyk et al., 2010)
oqxA	CTCGGCGCGATGATGCT CCACTCTTCACGGGAGACGA	392	(Kim et al., 2009b)
oqxB	TTCTCCCCCGGCGGGAAGTAC CTCGGCCATTTTGGCGCGTA	512	(Kim et al., 2009b)
bla_{IMP}	GGAATAGRGTGGCTTAAYTCTC CCAAACYACTASGTTATC	189	(Kutilova et al., 2020)
bla_{VIM}	CGCGGAGATTGARAAGCAAA CGCAGCACCRGGATAGAARA	247	(Mlynarcik et al., 2021)
bla_{OXA-48}	GCGTGGTTAAGGATGAACAC CATCAAGTTCAACCCAACCG	438	(Poirel et al., 2011)
bla_{KPC}	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	798	(Poirel et al., 2011)
bla_{NDM}	GGGGATTGCGACTTATGC AGATTGCCGAGCGACTTG	258	(Mlynarcik et al., 2021)
bla_{IMI}	TTGGNGTCTACGCTTTNGACAC GTTTTATCGCCAACNACCCA	574	(Mlynarcik et al., 2021)
bla_{GES}	ATGCGCTTCATTCACGC CTATTTGTCCGTGCTCAGGA	864	(Kutilova et al., 2020)
mcr-1	AGTCCGTTTGTTCTTGTGGC AGATCCTTGGTCTCGGCTTG	320	(Rebelo et al., 2018)
mcr-2	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT TCTAGCCCGACAAGCATACC	715	(Rebelo et al., 2018)
mcr-3	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG AATGGAGATCCCCGTTTTT	929	(Rebelo et al., 2018)
mcr-4	TCACTTTCATCACTGCGTTG TTGGTCCATGACTACCAATG	1116	(Rebelo et al., 2018)
mcr-5	GGTTGAGCGGCTATGAAC GAATGTTGACGTCACTACGG	207	-
mcr-6	GTCCGGTCAATCCCTATCTGT ATCACGGGATTGACATAGCTAC	556	(Wang et al., 2018)
mcr-7	GGCGACCTCCTACCTGAATG ACTTTGGCATCAGTCCCCAG	333	-

mcr-8	AACCGCCAGAGCACAGAATT	667	(Wang et al., 2018)
	TTCCCCCAGCGATTCTCCAT		
mcr-9	CGGTACCGCTACCGCAATAT	130	(Kieffer et al., 2019)
	ATAACAGCGAGACACCGGTT		
mcr-10	GGACCGACCTATTACCAGCG	366	(Lei et al., 2020)
	GGCATTATGCTGCAGACACG		

Tab. 9: Zoznam použitých PCR programov, (formát hodnôt - teplota (°C)/čas)

PCR program	**AmpC β-laktamázy***	**bla_{TEM}, bla_{VIM}, bla_{IMI}, mcr-10, mcr-9, mcr-8**	**bla_{SHV}, bla_{CTX-M}, bla_{OXA-2}, bla_{OXA-4}, mcr-7, mcr-6**	**bla_{OXA-48}, bla_{KPC}**	**bla_{IMP}**	**mcr-2**
úvodná denaturácia DNA	94/ 3 min	94/ 5 min	94/ 5 min	94/ 5 min	94/ 5 min	-
denaturácia DNA	94/ 30 s	94/ 45 s	94/ 45 s	94/ 30 s	94/ 30 s	95/ 3 min
pripojenie primerov	64/ 30 s	55/ 45 s	58/ 45 s	52/ 40 s	47/ 40 s	65/ 30 s
amplifikácia DNA	72/ 1 min	72/ 1 min	72/ 1 min	72/ 50 s	72/ 50 s	70/ 1 min
záverečná amplifikácia DNA	72/ 7 min	72/10 min	72/ 10 min	72/ 5 min	72/ 5 min	70/ 10 min
počet opakovaní krokov 2-4	25	25	35	36	36	33
	bla_{NDM}	**bla_{GES}**	**aac(6´)-Ib-cr**	**qnrA, B, C, S**	**qnrD**	**mcr-4**
úvodná denaturácia DNA	94/ 5 min	94/ 5 min	94/ 10 min	94/ 7 min	94/ 10 min	94/ 5 min
denaturácia DNA	94/ 45 s	94/ 45 s	94/ 45 s	94/ 45 s	94/ 1 min	94/ 45 s
pripojenie primerov	53/ 45 s	55/ 45 s	55/ 45 s	53/ 45 s	57/ 1 min	48/ 45 s
amplifikácia DNA	72/ 1 min	72/ 2 min	72/ 45s	72/ 1 min	72/ 1 min	72/ 1 min
záverečná amplifikácia DNA	72/ 10 min	72/ 10 min	72/ 10 min	72/ 10 min	72/ 10 min	72/ 10 min
počet opakovaní krokov 2-4	35	30	35	32	30	30
	qnrE1	**qepA**	**oqxA**	**oqxB**	**mcr-1**	**mcr-3, mcr-5**
úvodná denaturácia DNA	94/ 5 min	94/ 4 min	94/ 5 min	94/ 5 min	94/ 5 min	94/ 5 min

denaturácia DNA	94/ 45 s	94/ 1 min	94/ 45 s	94/ 45 s	94/ 30 s	94/ 45 s
pripojenie primerov	55/ 45 s	55/ 1 min	60/ 45 s	64/ 45 s	53/ 45 s	50/ 45 s
amplifikácia DNA	72/ 1 min	72/ 1,5 min	72/ 1 min	72/ 1 min	72/ 45 s	72/ 1 min
záverečná amplifikácia DNA	72/10 min	72/ 10 min	72/ 10 min	72/ 10 min	72/ 10 min	72/ 10 min
počet opakovaní krokov 2-4	32	30	30	32	25	25

* - bla_{CMY-1}, bla_{CMY-2}, bla_{DHA}, bla_{ACC}, bla_{ACT}, bla_{FOX}

Tab. 10: Izoláty pozitívne na gény rezistencie voči cefalosporínom

Izolát	odber	lokalita	CTX-M	CMY-1	CMY-2	TEM	SHV	OXA II	OXA IV	DHA	ACC	ACT	FOX
2MA5c	2	A	■										
2MA6c	2	A	■										
2MA7c	2	A	■										
3MA3c	3	A			■								
3MA9c	3	A			■								
3MB1c	3	B			■								
3MB4c	3	B			■								
3MB14c	3	B			■								
3MC9c	3	C			■								
3MC15c	3	C							■				
3MD1c	3	D							■				
3MD2c	3	D					■		■				
3MD4c	3	D			■								
3ME2c	3	E			■								
Izolát	Odber	Lokalita	CTX-M	CMY-1	CMY-2	TEM	SHV	OXA II	OXA IV	DHA	ACC	ACT	FOX
1WA5c	1	A				■		■					
1WA7c	1	A				■		■					
1WA11c	1	A	■			■							
1WC14c	1	C	■							■			
1WC15c	1	C							■				
1WC17c	1	C		■					■				
1WC26c	1	C	■										
1WD1c	1	D	■										
1WD3c	1	D	■							■			
1WD5c	1	D	■										
1WD6c	1	D	■			■							
1WD7c	1	D	■										
1WD8c	1	D	■										
1WD12c	1	D	■										
1WD13c	1	D	■										
1WD14c	1	D	■										
1WD15c	1	D	■										
1WD16c	1	D	■			■	■						
2WA9c	2	A	■			■							
2WA10c	2	A	■										
2WA14c	2	A	■			■	■						
2WA17c	2	A	■										
2WA18c	2	A	■										
2WA19c	2	A	■			■							
2WA21c	2	A	■										
2WA22c	2	A	■										
2WA23c	2	A	■			■	■						
2WA24c	2	A	■				■						
2WE1c	2	E	■										
2WE2c	2	E	■										
2WE3c	2	E	■			■							
2WE4c	2	E	■										
2WE5c	2	E	■										
2WE6c	2	E	■										
2WE7c	2	E				■				■			
2WE8c	2	E	■										
2WE9c	2	E	■										
2WE11c	2	E				■				■			
2WE12c	2	E	■										
2WE13c	2	E	■			■							
2WE16c	2	E	■										
2WE17c	2	E	■										
2WE18c	2	E	■										
2WE19c	2	E	■			■	■						
3WA1c	3	A					■						
3WC1c	3	C					■						
3WC2c	3	C					■						
3WC3c	3	C					■						
3WC4c	3	C					■						
3WC5c	3	C					■						
3WC6c	3	C					■						
3WC9c	3	C	■										
3WC15c	3	C					■						
3WC16c	3	C					■						
3WC17c	3	C					■						
3WC18c	3	C					■						
3WC19c	3	C					■						
3WC20c	3	C	■										
3WD3c	3	D	■			■							
3WD6c	3	D							■				
3WD14c	3	D							■				
3WD17c	3	D							■				
3WE1c	3	E	■										
3WE2c	3	E	■										
3WE3c	3	E	■										
3WE4c	3	E	■										
3WE5c	3	E	■										
3WE6c	3	E	■										
3WE7c	3	E	■										
3WE8c	3	E	■										
3WE9c	3	E			■								
3WE10c	3	E	■										
3WE11c	3	E	■										
3WE12c	3	E	■										
3WE13c	3	E	■										
3WE14c	3	E	■										
3WE15c	3	E	■										
3WE16	3	E	■										
3WE17c	3	E	■										
3WE18c	3	E	■										
3WE19c	3	E	■										
3WE20c	3	E	■			■							
3WE21c	3	E	■										
3WE22c	3	E	■			■							
3WE27c	3	E	■			■							
3WE28c	3	E	■										
3WE29c	3	E	■			■							
3WE30c	3	E	■			■							
3WE31c	3	E	■										
3WE32c	3	E	■										
3WE33c	3	E	■										
3WE34c	3	E	■										
3WE35c	3	E	■										

Tab. 11: Izoláty zo sedimentu pozitívne na gény rezistencie voči chinolónom

izolát	odber	lokalita	aac(6´)-Ib-cr	qnrA	qnrB	qnrC	qnrS	qnrD	qnrE1	qepA	oqxA	oqxB
1MC4h	1	C	■									
1MC7h	1	C	■									
1MC8h	1	C	■									
1MD3h	1	D	■		■							
1MD4h	1	D	■									
2MA7h	2	A			■							
2MA8h	2	A			■							
2MA9h	2	A			■							
2MA10h	2	A			■							
2MA12h	2	A			■							
2MA14h	2	A			■							
2MC6h	2	C			■							
2MC7h	2	C			■							
2MC9h	2	C	■									
2MC10h	2	C	■									
2MC12h	2	C	■									
2ME4h	2	E	■									
2ME5h	2	E	■									
2ME7h	2	E	■									
2ME8h	2	E	■									
2ME9h	2	E	■		■							
2ME10h	2	E	■					■				
2ME14h	2	E			■							
2ME15h	2	E			■							
3MA1h	3	A			■							
3MA2h	3	A	■		■							
3MA4h	3	A			■							
3MA5h	3	A			■							
3MA6h	3	A			■							
3MA12h	3	A					■					
3MA13h	3	A			■							
3MA15h	3	A					■					
3MB1h	3	B					■					
3MB8h	3	B			■							
3MB13h	3	B			■							
3MB14h	3	B			■							
3MB15h	3	B			■							
3MC1h	3	C			■							
3MC3h	3	C			■							
3MC4h	3	C					■					
3MC5h	3	C			■							
3MC6h	3	C			■							
3MC11h	3	C					■					
3MC12h	3	C					■					
3MC13h	3	C			■							
3MC14h	3	C			■		■					
3MC15h	3	C					■					
3MD6h	3	D					■				■	
3MD7h	3	D					■					
3MD8h	3	D					■					
3MD9h	3	D					■					
3MD11h	3	D					■					
3MD13h	3	D					■					
3ME1h	3	E			■							
3ME3h	3	E			■							
3ME4h	3	E			■							
3ME5h	3	E			■							
3ME7h	3	E			■							
3ME12h	3	E					■					
3ME15h	3	E					■					

Tab. 12: Izoláty z vody pozitívne na gény rezistencie voči chinolónom

Izolát	Odber	Lokalita	aac(6´)-Ib-cr	qnrA	qnrB	qnrC	qnrS	qnrD	qnrE1	qepA	oqxA	oqxB
1WB8h	1	B			■							
1WB19h	1	B	■									
1WC4h	1	C		■								
1WC8h	1	C		■								
1WC14h	1	C	■									
1WD13h	1	D	■								■	
1WD15h	1	D	■									
1WD17h	1	D	■									
2WA1h	2	A			■							
2WA2h	2	A					■	■				
2WA4h	2	A	■					■				
2WA5h	2	A					■	■				
2WA6h	2	A					■					
2WA7h	2	A					■					
2WA9h	2	A			■		■					
2WA10h	2	A			■							
2WA11h	2	A								■		
2WA12h	2	A					■					
2WA14h	2	A			■							
2WA17h	2	A			■							
2WA20h	2	A									■	
2WC8h	2	C	■									
2WC10h	2	C			■							
2WC11h	2	C			■							
2WC17h	2	C			■							
2WCC1h	2	C			■							
2WCC7h	2	C			■							
2WCC8h	2	C	■									
2WE1h	2	E			■							
2WE3h	2	E			■							
2WE5h	2	E					■					
2WE10h	2	E	■									
2WE15h	2	E			■							
2WE16h	2	E			■							
2WE17h	2	E			■			■				
2WE18h	2	E			■							
2WE19h	2	E			■							
2WE20h	2	E			■		■					
3WA2h	3	A			■						■	
3WC3h	3	C	■		■							
3WC4h	3	C	■									
3WC5h	3	C	■									
3WC9h	3	C					■					
3WC10h	3	C					■					
3WC11h	3	C					■					
3WD10h	3	D	■									
3WD11h	3	D	■									
3WD12h	3	D	■									
3WD13h	3	D	■									
3WD14h	3	D					■					
3WE12h	3	E					■	■				
3WE13h	3	E					■	■				
3WE14h	3	E						■				
3WE16h	3	E						■				
3WE17h	3	E					■	■				
3WE20h	3	E									■	

Příloha B Výsledky MIC

Izolát	bakteriálny druh	AMP	AMS	CFZ	CXM	AZT	GEN	AMK	COL	T/S	CIP	CMP	TET	PIP	PIT	CTX	CAZ	CPZ	CEP	MER	ERT	TGC	NET	TOB
1WA11cX_A	*E. coli*	>128	64/32	>16	>64	8	>32	4	0,5	>4/76	>8	8	>32	>128	>128/4	>8	16	>64	16	<0,125	0,125	0,25	16	8
1WD13cX_A	E. coli	>128	16/8	>16	>64	4	0,5	2	0,5	>4/76	>8	8	>32	128	32/4	>8	1	32	2	<0,125	<0,016	0,125	1	1
1WD15cX_A	E. coli	>128	64/32	>16	>64	>16	32	4	0,5	>4/76	0,25	8	>32	>128	>128/4	>8	16	>64	8	<0,125	0,125	0,125	8	>8
1WD7cX_A	E. coli	>128	8/4	>16	>64	8	1	4	0,5	1/19	2	8	4	>128	8/4	>8	16	64	4	<0,125	<0,016	0,125	2	1
1WD8cX_A	E. coli	>128	16/8	>16	>64	8	1	8	0,5	0,064/1,19	<0,064	4	2	>128	64/4	>8	4	>64	8	<0,125	0,032	0,25	2	1
2MA10h	Citrobacter spp.	16	8/4	>16	8	<0,125	1	4	0,5	0,25/4,75	0,5	8	1	4	4/4	0,25	0,5	<0,5	<0,125	<0,125	<0,016	0,25	2	1
2MA14h	Citrobacter spp.	4	4/2	>16	4	<0,125	0,5	2	0,5	0,125/2,38	0,5	16	4	2	4/4	0,125	1	<0,5	<0,125	<0,125	<0,016	0,25	1	1
2MA7h	Citrobacter spp.	16	16/8	>16	4	0,25	1	4	1	0,125/2,38	0,5	8	2	4	4/4	0,125	0,5	<0,5	0,25	<0,125	0,032	0,125	1	1
2MC7h	Citrobacter spp.	32	4/2	>16	1	<0,125	1	4	0,5	0,125/2,38	2	8	2	8	8/4	0,25	1	<0,5	<0,125	<0,125	<0,016	0,125	1	1
2ME14h	E. coli	>128	8/4	4	8	<0,125	2	8	0,5	0,125/2,38	1	8	>32	>128	16/4	<0,064	0,25	2	<0,125	<0,125	<0,016	0,25	2	1
2ME15hA	E. coli	<1	<1/0,5	1	<0,5	<0,125	0,5	2	0,25	0,064/1,19	1	8	2	<1	<1/4	<0,064	<0,125	<0,5	<0,125	<0,125	<0,016	0,25	1	0,5
2WA10h	E. coli	>128	16/8	>16	64	2	2	2	0,25	4/76	0,5	8	2	64	32/4	2	16	4	<0,125	<0,125	0,064	0,25	2	1
2WA17cX_B	E. coli	>128	16/8	>16	>64	8	1	4	0,5	0,125/2,38	<0,064	8	>32	>128	128/4	>8	16	>64	16	>16	>2	0,125	2	4
2WA18cX_B	E. coli	>128	16/8	>16	>64	8	0,5	2	0,5	0,125/2,38	<0,064	8	2	>128	32/4	>8	2	32	8	<0,125	0,032	0,125	1	2
2WA19cX_C	E. coli	>128	16/8	>16	>64	4	1	4	0,5	>4/76	2	16	>32	>128	128/4	>8	>16	64	16	>16	>2	0,25	2	2
2WA4h	E. coli	>128	16/8	>16	>64	16	2	8	1	>4/76	>8	16	>32	>128	>128/4	>8	16	>64	8	<0,125	0,25	0,5	8	>8
2WA5h	E. coli	>128	32/16	8	4	<0,125	1	4	0,25	0,125/2,38	1	8	>32	>128	64/4	<0,064	0,25	32	<0,125	<0,125	0,032	0,25	2	1
2WA6h	E. coli	>128	64/32	16	4	<0,125	2	4	0,5	>4/76	1	8	>32	>128	>128/4	0,5	2	>64	1	2	>2	0,25	4	1
2WA7h	E. coli	>128	4/2	>16	>64	4	2	2	0,5	0,064/1,19	1	8	2	32	8/4	>8	2	32	1	<0,125	<0,016	0,25	1	0,5
2WA9c	E. coli	>128	32/16	>16	>64	8	0,5	2	0,5	>4/76	<0,064	8	2	>128	>128/4	>8	8	>64	>16	<0,125	0,125	0,25	2	1
2WA9h	E. coli	>128	4/2	>16	8	>16	2	4	1	0,125/2,38	2	8	2	128	32/4	4	16	16	1	<0,125	<0,016	0,25	4	1
3MA13h	Citrobacter spp.	8	4/2	>16	2	<0,125	1	2	0,5	0,125/2,38	0,5	8	2	2	2/4	0,125	0,5	<0,5	<0,125	<0,125	<0,016	0,25	1	1
3MA15h	E. coli	>128	4/2	>16	>64	>16	4	8	2	2/38	4	8	4	128	4/4	>8	>16	32	2	4	0,5	0,5	2	4
3MA4h	Citrobacter spp.	64	8/4	>16	64	2	0,5	4	0,5	0,125/2,38	0,25	8	2	4	2/4	0,5	1	<0,5	<0,125	<0,125	0,032	0,25	2	1
3MA5h	Citrobacter spp.	64	8/4	>16	8	0,5	1	4	0,5	0,25/4,75	1	32	8	8	8/4	0,25	4	<0,5	0,5	<0,125	0,064	0,25	1	1
3MA6hA	Citrobacter spp.	32	4/2	>16	4	0,5	1	8	0,5	0,25/4,75	>8	2	4	4	4/4	0,25	1	<0,5	<0,125	0,25	0,032	0,25	2	2
3MB15h	Citrobacter spp.	128	32/16	>16	32	1	0,5	4	0,5	0,125/2,38	0,5	8	2	16	2/4	0,125	0,5	1	<0,125	<0,125	<0,016	0,25	1	0,5
3MC13h	Citrobacter spp.	16	4/2	>16	2	<0,125	1	2	0,5	0,125/2,38	0,5	8	2	4	2/4	0,25	1	<0,5	<0,125	<0,125	<0,016	0,125	2	0,5
3MC8h	Citrobacter spp.	4	8/4	>16	4	<0,125	0,5	2	0,5	0,125/2,38	1	16	4	4	4/4	0,25	1	<0,5	0,25	<0,125	<0,016	0,25	1	1
3MD8h	E. coli	>128	16/8	>16	4	<0,125	2	2	0,5	>4/76	2	8	>32	>128	32/4	<0,064	0,25	4	<0,125	<0,125	<0,016	0,25	2	1
3ME12h	E. coli	>128	16/8	8	2	<0,125	1	8	0,25	0,064/1,19	1	8	4	>128	8/4	<0,064	0,25	1	<0,125	<0,125	<0,016	0,25	4	1
3ME1h	Citrobacter spp.	16	2/1	>16	4	<0,125	1	4	0,5	0,125/2,38	0,5	8	2	4	2/4	0,125	1	<0,5	0,25	<0,125	<0,016	0,125	1	1
3ME3h	Citrobacter spp.	8	2/1	16	2	<0,125	1	2	0,5	0,125/2,38	0,5	8	2	4	2/4	<0,064	0,25	<0,5	<0,125	<0,125	<0,016	0,25	1	0,5
3ME5h	Citrobacter spp.	8	8/4	>16	8	0,25	0,5	2	0,5	0,25/4,75	1	32	8	8	8/4	0,25	2	1	0,25	0,25	0,125	0,25	2	1
3ME7h	Citrobacter spp.	8	4/2	>16	2	<0,125	2	4	0,5	0,125/2,38	0,5	8	2	4	4/4	0,125	0,5	<0,5	<0,125	<0,125	<0,016	0,125	2	1
3WC10h	E. coli	>128	4/2	>16	>64	4	2	8	0,25	0,125/2,38	2	8	2	128	32/4	>8	4	64	2	<0,125	<0,016	0,25	2	1
3WC9h	E. coli	>128	4/2	>16	>64	4	2	4	1	0,125/2,38	2	8	2	128	16/4	>8	4	64	2	<0,125	<0,016	0,25	2	1
ATCC		4	4/2	4	4	0,25	1	4	0,5	0,125/2,38	<0,064	4	2	4	2/4	<0,064	0,25	<0,5	0,25	<0,125	<0,016	0,25	2	1
CE 279		>128	16/8	>16	16	4	2	8	0,5	>4/76	>8	8	>32	>128	32/4	4	16	32	0,25	<0,125	0,125	0,25	2	1
DIB 172		>128	>128/64	>16	>64	>16	2	16	1	>4/76	>8	>32	>32	>128	>128/4	>8	>16	>64	>16	>16	>2	0,25	>16	>8
KPC		>128	>128/64	>16	>64	>16	2	32	1	>4/76	>8	>32	8	>128	>128/4	>8	>16	>64	>16	>16	>2	0,25	>16	>8

Tab. 14: Výsledky MIC – rezistentné izoláty sú označené červenou, intermediárne sú označené žltou a citlivé zelenou

Příloha C Výsledky WGS

Tab. 15: Gény rezistencie voči antibiotikám detekované WGS

Izolát	Druhové zaradenie	Sekvenčný typ (ST)	Gény
1WD13cX_A	*E. coli*	744	*aadA5_1, aph(3´´)-Ib, aph(6´)-Id, bla*$_{CTX-M-14}$, *dfrA17, mdf(A), sul1*
1WD15cX_A	*E. coli*	-	*aac(3)-IIa, aac(6´)-Ib-cr, aph(3´´)-Ib, aph(6´)-Id, bla*$_{CTX-M-14}$, *bla*$_{CTX-M-15}$, *bla*$_{OXA-1}$, *bla*$_{TEM-1B}$, *dfrA14, fosA, mdf(A), oqxA, oqxB, sul2_2, tet(D)*
1WD1cX_A	*E. coli*	10	*aac(3)-IIa, aph(6´)-Id, bla*$_{CTX-M-14}$, *bla*$_{CTX-M-15}$, *bla*$_{TEM-104}$, *dfrA14, mdf(A), tet(A)*
1WD7cX_A	*E.coli*	678	*bla*$_{CTX-M-15}$, *dfrA1, mdf(A), qnrS1*
1WD8cX_A	*E. coli*	131	*bla*$_{CTX-M-1}$, *mdf(A)*
2MA10h	*Citrobacter* spp.	-	*bla*$_{CMY-80}$, *qnrB6*
2MA14h	*Citrobacter* spp.	-	*bla*$_{CMY-80}$, *qnrB6*
2MA7h	*Citrobacter* spp.	-	*bla*$_{CMY-80}$, *qnrB6*
2MA8h	*Citrobacter* spp.	-	*bla*$_{CMY-2}$, *qnrB9*
2MC7h	*Citrobacter* spp.	755	*bla*$_{CMY-77}$, *qnrB17*
2ME14h	*E. coli*	1011	*bla*$_{TEM-1B}$, *mdf(A), qnrB19, tetA*
2ME15h_A	*E. coli*	1141	*mdf(A), qnrB19*
2WA10h	*E. coli*	58	*bla*$_{DHA-1}$, *dfrA17, mdf(A), mph(A), qnrB4, sul1*
2WA14h	*Citrobacter* spp.	-	*bla*$_{CMY-2}$, *qnrB9*
2WA17cX_A	*E. coli*	-	*aac(3)-IIa, aac(6´)-Ib-cr, aph(3´´)-Ib, aph(6)-Id, bla*$_{CTX-M-3}$, *bla*$_{OXA-1}$, *bla*$_{TEM-1B}$, *dfrA14, mdf(A), sul2, tet(B)*
2WA17h1	*Citrobacter* spp.	-	*bla*$_{CMY-104}$, *oqxB*
2WA18cX_A	*E. coli*	641	*bla*$_{CTX-M-3}$, *mdf(A)*
2WA19cX_A	*E. coli*	-	*aac(3)-IIa, aac(6´)-Ib-cr, aph(3´´)-Ib, aph(6)-Id, bla*$_{CTX-M-15}$, *bla*$_{OXA-1}$, *bla*$_{SHV-187}$, *bla*$_{TEM-1B}$, *dfrA14, fosA, mdf(A), oqxA, oqxB, qnrS1, sul2, tet(A), tet(B), tet(D)*
2WA4h	*E. coli*	648	*aac(6´)-Ib-cr, aadA2, bla*$_{CTX-M-15}$, *bla*$_{OXA-1}$, *dfrA12, erm(B), mdf(A), mph(A), sul1, tet(A)*
2WA5h	*E. coli*	88	*aadA2, lnuF, mdf(A), qnrS1, tetA*
2WA6h	*E.coli*	10	*aph(3´´)-Ib, aph(6)-Id, bla*$_{OXA-244}$, *bla*$_{TEM-1B}$, *dfrA14, mdf(A), qnrS1, sul2_2, tetA*
2WA7h	*E.coli*	13214	*bla*$_{CTX-M-15}$,*mdf(A), qnrS1*

2WA9c	*E. coli*	38	*aph(3´´)-Ib, aph(6)-Id,* $bla_{CTX-M-14b}$, bla_{TEM-1B}, *dfrA1, mdf(A), sul2*
2WA9h	*E. coli*	446	*ant(3´´)-Ia,* bla_{SHV-12}, *lnu(F), mdf(A), qnrS1*
3MA13h	*Citrobacter* spp.	-	bla_{CMY-80}, *qnrB6*
3MA15h	*E. coli*	13214	$bla_{CTX-M-15}$, *mdf(A), qnrS1*
3MA4h	*Citrobacter* spp.	17	bla_{CMY-34}, *qnrB9*
3MA5h	*Citrobacter* spp.	-	bla_{CMY-2}, *qnrB9*
3MA6hA	*Citrobacter* spp.	-	bla_{CMY-34}, *qnrB9*
3MB15h	*Citrobacter* spp.	-	$bla_{CMY-127}$, *qnrB6*
3MC13h	*Citrobacter* spp.	728	bla_{CMY-39}, *qnrB17*
3MC6h	*Citrobacter* spp.	166	$bla_{CMY-129}$, *qnrB13*
3MD8h	*E. coli*	349	*aph(6)-Id,* bla_{TEM-1B}, *dfrA14, mdf(A), qnrS1, sul2_2, tet(A)*
3ME12h	*E. coli*	101	bla_{TEM-1B}, *mdf(A), qnrS1*
3ME1h	*Citrobacter* spp.	301	bla_{CMY-77}, *qnrB17*
3ME3h	*Citrobacter* spp.	-	bla_{CMY-80}, *qnrB6*
3ME4h	*Citrobacter* spp.	208	$bla_{CMY-127}$, *qnrB17*
3ME5h	*Citrobacter* spp.	260	bla_{CMY-13}, *qnrB29*
3ME7h	*Citrobacter* spp.	728	bla_{CMY-39}, *qnrB17*
3WC10h	*E. coli*	101	$bla_{CTX-M-15}$, *mdf(A), qnrS1*
3WC9h	*E. coli*	219	$bla_{CTX-M-15}$, *mdf(A), qnrS1*
3WD3c	*E. coli*	48	*aac(3)-IId, aadA2,* bla_{TEM-1B}, *catA1, dfrA12, mdf(a), mph(A), sul1, tet(B)*