

VYUŽITÍ MODERNÍCH METOD PRO STANOVENÍ REZISTENCE K ANTIBIOTIKŮM

MILADA ŠOLCOVÁ a SABINA PURKRTOVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika
Milada.Solcova@vscht.cz

Došlo 27.6.22, přepracováno 21.2.23, přijato 2.3.23.

Zvyšující se výskyt antibiotických rezistencí patří k závažným problémům 21. století. Výskyt bakteriálních kmenů rezistentních k antibiotikům následně zužuje spektrum vhodných antibiotik použitelných pro léčbu i běžných bakteriálních infekcí nebo pro prevenci jejich výskytu, např. v chirurgii. Čistírny odpadních vod, nemocnice, ale i potravinový řetězec patří k ohniskům, kde nejčastěji dochází ke vzniku či šíření nových i stávajících kmenů bakterií rezistentních k antibiotikům a genů rezistence k antibiotikům.

Ke stanovení antibiotických rezistencí se v laboratořích standardně používají fenotypové kultivační metody, které jsou však náročné na čas i práci a částečně i přesnou interpretaci výsledků. Z tohoto důvodu jsou hledány rychlejší alternativní metody detekce bakterií rezistentních k antibiotikům nebo přímo genů rezistence k antibiotikům. Příkladem alternativní metody detekce bakterií rezistentních k antibiotikům je například použití fenotypové metody využívající hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem pro stanovení producentů beta-laktamas. Zrychlení a zároveň větší přesnost detekce poskytují genotypové metody. Pomocí polymerasové řetězové reakce lze přímo detekovat a kvantifikovat geny rezistence k antibiotikům. Pro další zrychlení a vyšší specifitu detekce ampliconů z PCR lze použít mikročipy.

Metody masivního paralelního sekvenování poskytují ucelenou informaci o rezistomu daného prostředí. Umožňují sekvenovat DNA amplicony či jednotlivé molekuly DNA pro detekci determinant antibiotické rezistence. Metody masivního paralelního sekvenování mají potenciál nahradit konvenční charakterizaci patogenů a umožňují detekci všech mikroorganismů ve vzorku (včetně obtížně kultivovatelných či nekultivovatelných mikroorganismů).

Klíčová slova: antibiotika, rezistence, geny kódující rezistenci k antibiotikům, stanovení rezistence k antibiotikům

Obsah

1. Úvod
2. Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS)
3. Polymerasová řetězová reakce
4. Metody izolace DNA
5. Izotermální amplifikace
6. DNA mikročipy
7. Masivní paralelní sekvenování
8. Závěr

1. Úvod

Rezistence k antibiotikům (ATB) je v současné době celosvětovým problémem v oblasti veřejného zdraví. Výskyt a šíření bakteriálních kmenů rezistentních k ATB ohrožuje většinu terapeutických a preventivních opatření pro kontrolu bakteriálních infekcí, neboť většina používaných ATB již přestává být účinná¹. Tato rezistence je způsobena především nevhodnou aplikací ATB, což vystavuje

bakterie značnému evolučnímu tlaku². Jedná se zejména o nadměrné či nesprávné používání ATB v humánní medicíně či v živočišné výrobě¹. Je však nutno podotknout, že rezistence k ATB je zároveň i přirozený fenomén, který se objevil již dávno před objevem a používáním prvních ATB (cit.³).

Producenty přírodních ATB jsou některé plísňe a bakterie⁴. Ostatní bakterie byly tedy vystaveny působení ATB již dávno před jejich zavedením do medicíny. Právě tento kontakt bakterií s ATB v přírodním prostředí vedl ke vzniku a selekci genů zodpovědných za rezistenci k antibiotikům (ARG, antibiotic resistance genes). Tyto geny byly nalezeny v různých nedotčených ekosystémech, jako je například permafrost⁵ či terestrický podpovrch⁶.

Rezistence k ATB může být přirozená nebo získaná⁷. Přirozená rezistence k ATB znamená, že bakterie přirozeně postrádají cílové struktury, na které dané ATB působí. Naopak získaná rezistence znamená, že se tyto cílové struktury buď dodatečně změnily (např. mutací) nebo byly získány či vyvinuty geny kódující struktury (např. specifické enzymy či ochranné proteiny), které působení ATB na tyto cílové struktury inhibují⁷. Získání ARG je též umožněno horizontálním genovým transferem, během

kterého dochází k přenosu ARG např. na plasmidech či pomocí transpozonů⁸. Mechanismy rezistence k ATB zahrnují enzymovou degradaci (např. produkce beta-laktamas) či modifikaci ATB, modifikaci cílového místa působení (např. mutace vazebných míst pro fluoro-chinolony v případě genů pro gyrasy a další topoisomerasy) a snížení koncentrace ATB v buňce (změna počtu či průměru porinů či aktivní odčerpávání ATB pomocí efluxních pump)^{9,10}.

Vyšetření citlivosti k ATB se v laboratořích běžně provádí pomocí standardizovaných kultivačních fenotypových metod¹¹, které testují schopnost růstu daného bakteriálního kmene v přítomnosti ATB. Nejčastějšími způsoby provedení jsou disková difuzní metoda či E-test s použitím agarových ploten, anebo mikrodiluční metoda při růstu v bujónu¹².

Mezi výhody kultivačních fenotypových metod patří nízká cena, vysoká citlivost, zavedené diagnostické testy a standardizace² (např. dokumenty vydávané organizacemi Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹³ a European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)¹⁴). Prvním krokem těchto metod je izolace a identifikace čistých kultur². Omezení kultivačních fenotypových metod spočívá v tom, že některé patogeny jsou obtížně či pomalu kultivovatelné a fenotypové metody jsou též náročné na množství materiálu, čas a práci².

2. Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS)

S čistými bakteriálními kulturami pracuje i další fenotypová metoda MALDI-TOF MS, která se v klinické praxi široce používá především k přesné, rychlé a levné identifikaci mikroorganismů na základě jejich proteinového spektra¹⁵. Tato metoda však také našla uplatnění při vyšetření rezistence k ATB (cit.¹⁶).

Prvním přístupem je analýza získaného proteinového spektra s cílem stanovit pro bakteriální izoláty s určitým typem rezistence specifický proteinový profil či jeho části (tj. konkrétní vrcholy)¹⁶. Úspěšně byl takto stanoven např. typický proteinový profil tzv. VRE kmenů *E. faecium* (kmenů rezistentních k vankomycinu)¹⁷.

Druhým přístupem je využití MALDI-TOF MS pro detekci bakteriálních kmenů, které jsou producenty enzymů degradujících či modifikujících ATB. Principem je přímá detekce této enzymové aktivity, kdy dochází k detekci odpovídajících substrátů a produktů po inkubaci bakteriální kultury v roztoku ATB. Tyto změny lze pak pozorovat metodou MALDI-TOF MS jako posun jednotlivých vrcholů odpovídajících ATB (cit.¹⁸). Tento přístup byl zaveden v roce 2011 Hrabákem a spol. pro stanovení beta-laktamasové aktivity u *Pseudomonas aeruginosa* a u čeledi *Enterobacteriaceae*¹⁹ a lze jej použít i pro detekci enzymové modifikace aminoglykosidů¹⁶. V případě enzymové aktivity beta-laktamas dochází k hydrolyze

beta-laktamového kruhu ATB (zvýšení molekulové hmotnosti ATB o 18 Da), případně následované spontánní dekarboxylací (snížení molekulové hmotnosti ATB o 44 Da). V porovnání s fenotypovými kultivačními metodami (minimálně 16 hodin inkubace i pro rychle rostoucí mikroorganismy) poskytuje tento přístup výrazně rychlejší výsledek¹³. U většiny beta-laktamas lze jejich aktivitu stanovit již po 1–2 hodinách inkubace bakteriální kultury v roztoku ATB (cit.¹⁶).

Toto stanovení lze provádět i s bakteriálními buňkami izolovanými z krevních kultur (při odstranění ostatních složek krve). Při využití MALDI-TOF MS i pro identifikaci původce onemocnění se jedná o cenný nástroj pro zahájení časné ATB terapie, kdy výsledek stanovení (identifikace bakteriálního kmene a jeho produkce beta-laktamas) je pro pozitivní krevní kulturu získán do 2–3 hodin (cit.¹⁶). Pro toto stanovení lze standardně použít např. kit MBT Sepsityper IVD kit (Bruker Daltonics, Německo)^{20,21}.

Mezi omezení této metody patří přítomnost takových dalších mechanismů rezistence, které snižují koncentraci beta-laktamového ATB v buňce (snížení propustnosti porinů či efluxní pumpy), což výrazně či zcela snižuje míru jeho hydrolyzy přítomnými beta-laktamasami (typické např. u *Pseudomonas* spp. a *Acinetobacter* spp.). Tento problém lze vyřešit přidávkem 0,01% dodecylsulfátu sodného²² ke směsi ATB a bakteriální suspenze, neboť tento detergent narušuje vnější buněčnou membránu a činí ji tak propustnou pro ATB nezávisle na působení dalších mechanismů rezistence^{16,22}.

3. Polymerasová řetězová reakce

Genotypové molekulární metody analyzují DNA a lze je tak použít pro zjištění přítomnosti konkrétního ARG (včetně bodových mutací)¹¹. Fenotypové metody mohou trvat několik dní, zatímco genotypové testy pro analýzu DNA i pouze několik hodin^{2,11}.

Základní technikou pro analýzu DNA je amplifikace zvolených úseků pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR)¹¹. PCR lze použít pro detekci a/nebo kvantifikaci vybraných ARG ve vzorku testované DNA, ať již izolované z konkrétního bakteriálního kmene (výskyt ARG v genomu daného kmene) nebo z metagenomického vzorku (např. klinické vzorky, vzorky půd, odpadních vod, biofilmu, potravin). Zásadním krokem pro detekci vybraných ARG je návrh primerů, jak dostatečně specifických (detekujících požadované varianty ARG), tak selektivních (nedetekujících jiné, necílové sekvence). Pro návrh primerů je však potřeba znát sekvenci celého genu či jeho části a dodržet i další pravidla pro jejich návrh (např. obsah CG párů)¹¹.

V odborné literatuře bylo dosud popsáno velké množství protokolů pro detekci a/nebo kvantifikaci ARG pomocí PCR, rozsah jejich standardizace je však zatím pouze omezený²³. Jednotlivé PCR protokoly se liší nejen v sekvencích a počtu použitých primerů (monoplex nebo multi-

plex PCR pro detekci a/nebo kvantifikaci jednoho či více ARG), ale i v PCR reagentech a jejich koncentraci v reakční směsi a použitím reakčního protokolu (teplota a délka jednotlivých fází, počet cyklů)²³. Multiplexové uspořádání PCR umožňuje provést např. paralelní detekci a/nebo kvantifikaci více ARG odpovídajících za shodný fenotyp rezistence (např. detekce různých ARG kódujících beta-laktamasy s podobným spektrem substrátů)¹¹. V případě multiplexového uspořádání PCR však PCR amplikony musí mít rozdílné velikosti nebo je nutno použít odlišně značené DNA sondy (v případě qPCR)¹¹.

V současné době již existuje několik databází (tabulka I), které shromažďují sekvence primerů používaných pro PCR amplifikaci ARG. Tyto sekvence byly převzaty z různých odborných zdrojů. Jednotlivé databáze se liší zejména výběrem ARG, rozsahem anotací či referenčními sekvencemi²⁴. Dále existují různé databáze, které shromažďují referenční sekvence ARG, potřebné pro návrh primerů. Nejčastěji používané a aktualizované databáze jsou databáze CARD (cit.²⁵) a SARG (cit.^{24,26}). Databáze CARD si klade za cíl shromažďovat informace o široké škále ARG, bez ohledu na experimentální potvrzení jejich výskytu. Nicméně výskyt většiny ARG uložených v databázi CARD potvrzen je²⁷. Naopak další databáze ResFinder²⁸ se přednostně soustřeďuje na ty ARG, u kterých bylo prokázáno, že jsou přítomny na mobilních genetických elementech, a proto mohou být horizontálně přenášeny mezi bakteriálními druhy^{27,29}.

V odborné literatuře jsou nejčastěji popsány protokoly PCR pro detekci klinicky významných ARG kódujících širokospektré beta-laktamasy³⁰, dále protokoly zaměřené na screening ARG u vybraného bakteriálního druhu (např. *Staphylococcus aureus*³¹) nebo screening jednotlivých skupin ARG (např. OXA beta-laktamasy³²). Na trhu jsou dostupné i kity pro detekci vybraných skupin klinicky významných ARG (tabulka II) pomocí PCR. Pro detekci bodových mutací v cílových genech lze poté využít např. degenerované primery (klasická PCR) či sekvenčně specifické DNA sondy cílící na mutační oblast (qPCR) nebo rozdíly v křivce tání (qPCR)¹¹.

4. Metody izolace DNA

Důležitým kritériem pro správný průběh PCR je též kvalita (především čistota – absence proteinů, RNA, dalších inhibitorů) a množství izolované DNA (cit.²³). Volba konkrétního protokolu izolace DNA závisí na matici vzorku (např. čistá kultura, komplexní potravinová matrice, klinické vzorky), typu izolované DNA (chromozomální či plazmidová, intracelulární či extracelulární – volná DNA) a požadavku na její čistotu a též výtěžek²³. Izolace intracelulární bakteriální DNA se obecně skládá ze tří základních kroků, a to narušení buněčné stěny bakterie (tepelně, mechanicky, sonikací, chemickými detergenty, enzymově – použití proteinasy, lysozymu pro většinu gram pozitivních bakterií, lysostafinu pro stafylokoky aj.), oddělení DNA (např. extrakce DNA chemickými látkami na základě fázové separace a její následná precipitace, navázání na kolonu či magnetické kuličky) a purifikace DNA (degradace RNA RNasou ještě před oddělením DNA, purifikace vázané DNA)³³. Mezi základní metody patří izolace DNA tepelnou lýzou, laboratorní metody pro chemickou extrakci při využití detergentu CTAB (cetyltrimethylamonium bromid) nebo komerčního přípravku TRIzol (ThermoFisher Scientific, USA) pro fázovou separaci a dále různé komerční soupravy založené na adsorpci DNA na kolony či magnetické kuličky³³.

5. Izotermální amplifikace

Mezi další techniky pro amplifikaci DNA zavedené v poslední době patří techniky smyčkou zprostředkované izotermální amplifikace (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) či polymerasové amplifikace s využitím rekombinasy (recombinase polymerase amplification, RPA) (cit.¹¹). Metoda LAMP využívá DNA-polymerasu a sadu čtyř speciálně navržených primerů, které rozeznávají celkem šest různých sekvencí na cílové DNA (cit.³⁴). Metoda LAMP amplifikuje DNA s vysokou specifitou, účinností a rychlostí v izotermálních podmínkách bez nutnosti použití termocykléru a při snadné vizuální detekci

Tabulka I
Databáze shromažďující sekvence primerů pro amplifikaci ARG

Databáze	Vysvětlení zkratky
LCPDB ⁵⁶	Literature-Based, Manually-Curated Primer Pairs Database
ARGA ²⁴	Antibiotic Resistance Gene Analyzer
ARGO ⁵⁷	Antibiotic Resistance Genes Online
BLDB ⁵⁷	Beta-Lactamase Database
LacED ⁵⁸	Lactamase Engineering Database
CARD ⁵⁹	Comprehensive Antibiotic Resistance Database
SARG ⁶⁰	Structure ARG Reference Database
ResFinder ^{29,30}	Database of Antimicrobial Resistance Genes
FARME DB ⁶¹	Functional Antibiotic Resistant Metagenomic Element Database

Tabulka II

Přehled komerčně dostupných kitů pro detekci ARG metodou PCR

Název kitu	Detekce	Výrobce
Streck ARM-D Kits ⁶²	detekce více než 1000 variant ARG	Streck Corporate (USA)
Antibiotic resistance: blaGES Genesig Resistance kit ⁶³	varianty genu <i>bla</i> _{GES-1}	PrimerDesign, Novacyt Group, (Francie)
Amplisens® MDR ⁶⁴	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{OXA} (<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{OXA-162}), <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{NDM}	InterLabService Ltd. (Ruská federace)
Soupravy PCR kitů ⁶⁵	<i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{OXA} , <i>bla</i> _{NDM}	Nzytech (Portugalsko)

vzniku tzv. lamplikonů (tvorba zákalu, použití specifických barviv)³⁵, což vede k menší časové a přístrojové náročnosti³⁶. Použití metody LAMP pro detekci ARG bylo zatím popsáno například pro detekci genu pro širokospektrální beta-laktamazu *bla*_{CTX-M9} (s následnou analýzou vzniklých lamplikonů pomocí restričních endonukleas)³⁷ či genů *mcr-1* až *mcr-5* u kolistin rezistentních bakterií, což bylo publikováno v roce 2019 Zhongem a spol.³⁶. Tyto studie potvrdily, že se jedná o rychlou a spolehlivou diagnostickou techniku, kterou je možno aplikovat na klinické vzorky^{36,37}.

Metoda RPA využívá pro amplifikaci DNA DNA-rekombinasy, která vytvoří s každým primerem samostatný komplex. Tento komplex vyhledává sekvenci dvouřetězcové DNA komplementární s primerem. Za účasti DNA-rekombinasy dojde následně k vytěsnění toho řetězce DNA, který není komplementární k primeru, a tento vytěsněný řetězec je stabilizován vazebnými proteiny. Po nasednutí primeru na komplementární vlákno DNA a uvolnění DNA-rekombinasy je ponechán 3'konec primeru přístupný pro DNA-polymerasu, která v přítomnosti deoxyribonukleosidtrifosfátů řetězec prodlouží^{38,39}. Jedná se o vysoce citlivou a selektivní techniku izotermální amplifikace, která probíhá při teplotě 37 °C až 42 °C s minimální přípravou vzorku³⁹. Použití této techniky bylo úspěšně testováno při detekci ARG kódujících proteiny zajišťující rezistenci k tetracyklinovým a chinolonovým ATB či polymyxinům (gen *mcr-1*)⁴⁰. Ve srovnání s qPCR byla RPA metoda účinnější díky kratším reakčním dobám, jednoduššímu vybavení a vyšší citlivosti, zatímco specifita byla stejně vysoká⁴⁰.

6. DNA mikročipy

Rychlou metodou pro detekci PCR lamplikonů ARG jsou DNA čipy. Povrch DNA čipů je tvořen jednoduchou membránou, na kterou jsou v jednotlivých místech (tzv. spoty) imobilizovány až tisíce kopií krátkých oligonukleotidových sekvencí (sondy). Tyto sondy hybridizují s komplementárními fluorescenčně značenými oligonukleotidy (např. PCR produkty)^{41,42} za vzniku detekovatelného fluorescenčního signálu⁴³.

DNA čipy se nejčastěji používají pro studium expresních profilů (detekce a kvantifikace cDNA vybraných

genů). Obecně je ale lze použít i pro detekci PCR lamplikonů včetně těch pro detekci ARG. V takovém případě je možná současná detekce až tisíců druhů ARG (cit.¹¹). DNA čipy tak lze použít ke zkoumání diverzity ARG, jejich prostorového a časového výskytu včetně šíření ARG v rámci a mezi různými hostitelskými zdroji, populacemi a prostředími⁴⁴.

Mezi nevýhody použití DNA čipů patří jejich poměrně vysoká pořizovací cena. Nejnákladnější komponenty jsou sondy, jejich připojení k nosiči a dále značení PCR lamplikonů. I přes zavádění technik masivního paralelního sekvenování patří DNA čipy mezi perspektivní metody, které jsou dále vyvíjeny².

V praxi jsou dostupné i komerčně vyráběné DNA čipy pro detekci vybraných ARG jako např. DNA čip IDENTIBAC AMR-ve Genotyping kit Version 05 (CLONDIAG/ALERE, Německo) pro detekci determinant antibiotické rezistence u klinických izolátů *Klebsiella pneumoniae*⁴⁵ nebo souprava Pantype AS-1 (Alere Technologies GmbH, Německo), která detekuje 60 genů pro faktory virulence a 47 ARG u *Escherichia coli*⁴⁶.

7. Masivní paralelní sekvenování

Sekvenování ARG umožňuje stanovit jejich jednotlivé varianty, sekvenování celých bakteriálních genomů poté umožňuje nacházet i nové ARG. Tyto znalosti o ARG jsou pak nástrojem pro vývoj nových a co nejvíce účinných metod pro detekci, kvantifikaci a sledování přenosu ARG (cit.⁴⁷).

První metody sekvenování DNA (sekvenování první generace) byly zavedeny v polovině 70. let 20. století. Tyto metody (Sangerova metoda, metoda chemického štěpení vyvinutá Maxamem a Gilbertem) umožňovaly sekvenaci v řádu stovek bází za jeden den²⁷.

Sangerova metoda sekvenování zůstala primární technologií sekvenování až do roku 2005 (cit.²⁷). Situace se změnila s rozvojem a zvýšením výkonu sekvenačních technologií druhé a třetí generace (označovaných souhrnně jako masivní paralelní sekvenování, Massive Parallel Sequencing, MPS; dříve též metody sekvenování nové generace, Next Generation Sequencing, NGS)^{1,27}. Obecný pracovní postup metod MPS zahrnuje izolaci DNA, přípravu tzv. knihovny (fragmentace vysokomolekulární

DNA do fragmentů o délce vhodné pro danou platformu; ligace adaptérů na tyto fragmenty; a případně amplifikace fragmentů v závislosti na dané platformě) a samotné sekvenování^{27,48}.

Sekvenování druhé generace umožňuje sekvenovat krátké úseky maximálně o délce stovek párů bází (tzv. krátké čtení) a je založeno na souběžné imobilizaci mnoha molekul templátu a jejich následné mnohonásobné amplifikaci v daném místě (za vytvoření tzv. sekvenačních spotů). V jednotlivých spotech se tak vytváří obrovské množství jednovláknových kopií původních nukleotidových sekvencí. Tyto kopie jsou následně paralelně čteny postupným připojováním fluorescenčně značených nukleotidů, kdy právě množství kopií činí fluorescenční signál detekovatelným¹. Jednotlivé platformy se liší způsobem amplifikace a sekvenačního čtení. Druhé generaci dominuje metoda Illumina Solexa, která oproti metodám Roche 454 system (0,7 Gb) či AB SOLiD system (120 Gb) může produkovat až 600 Gb sekvenačních dat⁴⁹ (1 Gb odpovídá sekvenci o celkové délce 10^9 nukleotidů)⁵⁰.

Principem sekvenování třetí generace je přímá sekvenace jednotlivých molekul DNA bez nutnosti jejich předchozí amplifikace, k čemuž bylo vyvinuto více odlišných metod. Například jednomolekulové sekvenování v reálném čase (single-molecule real-time sequencing, SMRT) umožňuje sledovat replikaci jediné molekuly DNA v reálném čase. Replikace probíhá ve speciální komůrce o rozměru nanometrů, která zároveň slouží jako optické vlákno pro čtení fluorescenčního signálu po přiřazení jednotlivých fluorescenčně značených deoxynukleotidů⁵¹. Tento přístup používá např. systém PacBio RSII společnosti Pacific Biosciences, jehož provoz je ovšem finančně náročný¹.

Nanopórové sekvenování je naopak založeno na detekci změn elektrického proudu, pokud vlákno DNA prochází nanopórem. Tyto změny elektrického proudu jsou pro každou procházející bázi různé, což je způsobeno jejich různým odporem. Tento systém nanopórového sekvenování byl vyvinut v roce 2014 společností Oxford Nanopore Technologies a umožňuje sekvenování úseků dlouhých až 200 000 bází^{52,53}. Analýzu je možno provádět v reálném čase, neboť výsledky jsou generovány již v průběhu vlastního měření. K dispozici jsou různé sekvenovací platformy (MinION, GridION a další) lišící se počtem nanopórů a použitých průtokových cel. Například platforma MinION o rozměrech $105 \times 23 \times 33$ mm má 512 pórů a toto zařízení lze připojit ke standardnímu portu USB¹ na jakémkoliv počítači s dostatečnými technickými parametry (16 GB RAM, 1 TB interní SSD)⁵³. Mobilita a možnost měřit v reálném čase učinily nanopórové sekvenování zvláště atraktivní pro klinickou diagnostiku v terénu. Náklady na jednotlivé analýzy vzhledem k množství získaných sekvenačních dat se navíc v porovnání s předchozími systémy výrazně snížily¹. Jedním z hlavních problémů platform s „dlouhým čtením“ pro detekci a sekvenaci ARG je vyšší míra chyb ve srovnání s technologiemi „krátkého čtení“. Míra této chyby tak může být příliš vysoká např. pro přesnou detekci specifických

jednonukleotidových polymorfismů (SNP) spojených s některými mechanismy antibiotické rezistence. Tato nevýhoda však může být částečně překonána dosažením vyšší četnosti počtu přečtení dané báze (tzv. vyšší hloubka čtení) a zlepšením algoritmů pro čtení jednotlivých bází ze získaného chromatogramu (tj. přiřazování báze k vrcholům chromatogramu). V současné době jsou nicméně systémy Illumina převládajícími platformami v klinických laboratořích¹.

Metody MPS (zvláště nanopórové sekvenování) výrazně snížily cenu sekvenačních analýz a učinily je široce přístupnými. Použití metod MPS v mikrobiologii tak našlo časté využití například jako metoda pro rutinní sekvenování mikrobiálních genomů⁴⁷. Další slibnou oblastí pro využití metod MPS se vztahem k ARG jsou metagenomické studie. Použití metod MPS umožňuje přímo detekovat všechny mikroorganismy přítomné ve vzorku včetně těch, které jsou kultivačně náročné nebo nekultivovatelné²⁷. Při použití kroku reverzní transkripce lze pak detekovat i RNA viry²⁷.

Cílem klinické metagenomiky je získat o analyzovaném vzorku informace klinického významu, jako je identifikace přítomných patogenů až na úroveň druhu a predikce jejich citlivosti k antimikrobiálním látkám na základě detekce sekvencí ARG pro účely zavedení co nejučinnější antibiotické terapie²⁷. Klinická metagenomika za využití MPS představuje rychlý a obecný přístup pro získání všech těchto lékařsky relevantních informací během 6–8 hodin, zatímco současná doba provedení konvenčních kultivačních metod je 48 hodin. Nevýhodou této aplikace jsou vysoké náklady, nedostatečná automatizace a standardizace²⁷.

Metody MPS lze využít i pro detekci a studium ARG v environmentálních²⁷ i dalších metagenomických studiích (např. metagenomické studie potravinového řetězce)⁵⁴. Environmentální rizika spojená s antibiotickými rezistencemi lze rozdělit na dva typy: riziko šíření rezistentních kmenů klinicky významných patogenů v prostředí a riziko vzniku a selekce nových variant či nových typů ARG, které by později mohly být přeneseny do klinicky významných patogenů²⁷. Metody MPS aplikované na DNA izolovanou z daného prostředí umožňují detekovat a prozkoumat mnohem větší soubor ARG najednou než dosud používané metody PCR a mají i výrazně nižší detekční limit pro detekci jednotlivých ARG i schopnost detekovat dosud nepopsané nové ARG či jejich varianty. Metody MPS by tak mohly být základním kamenem pro systém včasného varování o budoucích rizicích spojených s ARG. Výhodou metod MPS je i skutečnost, že MPS metody umožňují snadné zkoumání i již archivovaných vzorků izolovaných ze životního prostředí, a tím i retrospektivně sledovat původ ARG a jejich šíření mezi různými prostředími. Tyto retrospektivní analýzy pomáhají vybrat, jaké strategie by byly účinné k zabránění šíření antibiotických rezistencí²⁷.

Využití MPS pro detekci ARG v sekvenačních datech (standardně ve formátu fast5 a fastq) vyžaduje jejich analýzu specializovanými bioinformatickými nástroji.

V případě nanopórového sekvenování jsou tak např. přímým výstupem sekvenace soubory typu fast5, které jsou převedeny do souborů typu fastq tzv. procesem přiřazení bázi (anglicky basecalling) (probíhá ve volně stažitelném software MinKNOW, Oxford Nanopore Technologies, UK)⁵³. Detekci ARG ve fastq souborech umožňují poté různé software, které získané sekvence (jak samostatně, tak po sestavení bakteriálního genomu v případě celogenomového sekvenování) srovnávají se sekvencemi ARG v databázích. Jedná se např. o volně dostupné software EPI2ME (ONT, UK) nebo ResFinder²⁹, které využívají databázi CARD nebo další programové balíčky za využití programovacího jazyka R či v operačním systému Linux jako např. program Staramr⁵⁵. Data pro jednotlivé bakteriální kmeny poté umožňují i srovnání fenotypového projevu s přítomností detekovaných ARG (cit.⁵⁵).

8. Závěr

Vznik a šíření rezistence k ATB patří mezi závažné problémy současné doby. Geny zodpovědné za tyto rezistence (ARG) se vyskytují v nejrůznějších prostředích včetně zdravotnických zařízení, čistíren odpadních vod či v potravinovém řetězci, kde dochází k jejich předávání a ke vzniku bakteriálních kmenů rezistentních k ATB. Z tohoto důvodu je nutné zavádět efektivní metody pro detekci ARG a předcházet tak jejich šíření a vzniku nových variant. Pro detekci ARG se nejčastěji používá metoda PCR, mikročipy a metody MPS, které umožňují sekvenovat celé bakteriální genomy, DNA z metagenomických vzorků a nacházet tak i nové ARG.

Seznam zkratk

ARG	antibiotic resistance genes, geny zodpovědné za rezistenci k antibiotikům
ATB	antibiotics, antibiotika
PCR	polymerase chain reaction, polymerasová řetězová reakce
LAMP	loop mediated isothermal amplification, smyčkou zprostředkovaná izotermální amplifikace
RPA	recombinase polymerase amplification, polymerasová amplifikace s využitím rekombinasy
MPS	massive parallel sequencing, masivní paralelní sekvenování

LITERATURA

- Escuyer V.: *Clin. Lab. Sci.* 32, 1 (2019). doi: 10.29074/ascls.119.001784.
- Wolff N., Hendling M., Schönthaler S., Geiss A. F., Barišić I.: *Sens. Bio-Sens. Res.* 23, 100266 (2019).
- Martínez J. L.: *Front Microbiol.* 3, 1 (2012).
- Hutchings M. I., Truman A. W., Wilkinson B.: *Curr. Opin. Microbiol.* 51, 72 (2019).
- D'Costa V. M. a 12 spoluautorů: *Nature* 477, 457 (2011).
- Brown M. G., Balkwill D. L.: *Microb. Ecol.* 57, 484 (2008).
- Reygaert W. C.: *AIMS Microbiol.* 4, 482 (2018).
- Chan K.-G.: *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 14, 617 (2016).
- Verraes C. a 14 spoluautorů: *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 2643 (2013).
- Munita J. M., Arias C. A.: *Microbiol. Spectrum* 4, 481 (2016).
- Anjum M. F., Zankari E., Hasman H.: *Microbiol. Spectrum* 5, (2017). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0011-2017.
- Ledina T., Bulajić S., Đorđević J.: *Veterinary Journal of Republic of Srpska* 18, 216 (2018). doi: 10.7251/VETJEN1801207L.
- CLSI: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/>, staženo 1. 12. 2022.
- EUCAST: <http://www.eucast.org>, staženo 1. 12. 2022.
- Murray P. R.: *J. Mol. Diagn.* 14, 419 (2012).
- Kostrzewa M., Sparbier K., Maier T., Schubert S.: *Proteomics: Clin. Appl.* 7, 767 (2013).
- Griffin P. M., Price G. R., Schooneveldt J. M., Schlebusch S., Tilse M. H., Urbanski T., Hamilton B., Venter D.: *J. Clin. Microbiol.* 50, 2918 (2012).
- Sparbier K., Schubert S., Weller U., Boogen C., Kostrzewa M.: *J. Clin. Microbiol.* 50, 927 (2012).
- Hrabak J., Walkova R., Studentova V., Chudackova E., Bergerova T.: *J. Clin. Microbiol.* 49, 3222 (2011).
- Jung J. S., Popp C., Sparbier K., Lange C., Kostrzewa M., Schubert S.: *J. Clin. Microbiol.* 52, 924 (2014).
- Oviaño M., Fernández B., Fernández A., Barba M. J., Mouriño C., Bou G.: *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 1146 (2014).
- Hrabak J. a 10 spoluautorů: *J. Clin. Microbiol.* 50, 2441 (2012).
- Miłobedzka A. a 11 spoluautorů: *J. Hazard. Mater.* 424, 127407 (2022).
- Wei Z., Wu Y., Feng K., Yang M., Zhang Y., Tu Q., Wang J., Deng Y.: *Environ. Int.* 128, 137 (2019).
- Alcock B. P. a 33 spoluautorů: *Nucleic Acids Res.* 48, D517 (2019).
- Yin X., Jiang X.-T., Chai B., Li L., Yang Y., Cole J. R., Tiedje J. M., Zhang T.: *Bioinformatics* 34, 2263 (2018).
- AMR Control: <http://resistancecontrol.info/2019-contents-list/>, staženo 27. 2. 2022.
- Florensa A. F., Kaas R. S., Clausen P., Aytan-Aktug D., Aarestrup F. M.: *Microb. Genomics* 8, 1 (2022). doi: 10.1099/mgen.0.000748.
- Bortolaia V. a 34 spoluautorů: *J. Antimicrob. Chemother.* 75, 3491 (2020).
- Willemsen I., Hille L., Vrolijk A., Bergmans A., Kluytmans J.: *J. Med. Microbiol.* 63, 540 (2014).
- Strommenger B., Kettlitz C., Werner G., Witte W.: *J. Clin. Microbiol.* 41, 4089 (2003).
- Dallenne C., Da Costa A., Decre D., Favier C., Arlet G.:

- J. Antimicrob. Chemother. 65, 490 (2010).
33. Ahmed O., Asghar A., Elhassan M.: Afr. J. Microbiol. Res. 8, 598 (2014).
 34. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T.: Nucleic Acids Res. 28, E63 (2000).
 35. Lencova S. Z. K., Akhatova D., Demnerova K.: Chem. Listy 113, 292 (2019).
 36. Zhong L. L. a 14 spoluautorů: Infect. Drug Resist. 12, 1877 (2019).
 37. Thirapanmethee K., Pothisamutyothin K., Nathisuwan S., Chomnawang M. T., Wiwat C.: Microbiol. Immunol. 58, 655 (2014).
 38. James A., Macdonald J.: Expert Rev. Mol. Diagn. 15, 1475 (2015).
 39. Lobato I. M., O'Sullivan C. K.: TrAC, Trends Anal. Chem. 98, 19 (2018).
 40. Xu J., Wang X., Yang L., Kan B., Lu X.: J. Med. Microbiol. 67, 1682 (2018).
 41. Fluit A. C., Visser M. R., Schmitz F. J.: Clin. Microbiol. Rev. 14, 836 (2001).
 42. Nsofor A.: J. Bacteriol. Res. 5, 68 (2013).
 43. Govindarajan R., Duraiyan J., Kaliyappan K., Palanisamy M.: J. Pharm. BioAllied Sci. 4, S310 (2012).
 44. Call D. R., Bakko M. K., Krug M. J., Roberts M. C.: Antimicrob. Agents Chemother. 47, 3290 (2003).
 45. Charnock C., Samuelsen Ø., Nordlie A.-L., Hjeltnes B.: Curr. Microbiol. 75, 163 (2018).
 46. Gwida M. a 11 spoluautorů: Vet. Microbiol. 240, 108539 (2020).
 47. Behjati S., Tarpey P. S.: Arch. Dis. Child Educ. Pract. Ed. 98, 236 (2013).
 48. Buermans H. P., den Dunnen J. T.: Biochim. Biophys. Acta 1842, 1932 (2014).
 49. Liu L., Li Y., Li S., Hu N., He Y., Pong R., Lin D., Lu L., Law M.: J. Biomed. Biotechnol. 2012, 251364 (2012).
 50. <https://www.oxfordreference.com>, staženo 6. 12. 2022.
 51. Ardui S., Ameer A., Vermeesch J. R., Hestand M. S.: Nucleic Acids Res. 46, 2159 (2018).
 52. Amarasinghe S. L., Su S., Dong X., Zappia L., Ritchie M. E., Gouil Q.: Genome Biol. 21, 30 (2020).
 53. Nanoporetech: <https://nanoporetech.com/>, staženo 11. 1. 2021.
 54. Solcova M., Demnerova K., Purkrťova S.: Microorganisms 9, 937 (2021).
 55. Bharat A. a 22 spoluautorů: Microorganisms 10, 292 (2022).
 56. Gorecki A., Decewicz P., Dziurzynski M., Janeczko A., Drewniak L., Dziewit L.: Water Res. 161, 211 (2019).
 57. Naas T., Oueslati S., Bonnin R. A., Dabos M. L., Zavalá A., Dortet L., Retailleau P., Iorga B. I.: J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 32, 917 (2017).
 58. Thai Q. K., Bös F., Pleiss J.: BMC Genomics 10, 390 (2009).
 59. Jia B. a 22 spoluautorů: Nucleic Acids Res. 45, D566 (2016).
 60. Yang Y., Jiang X., Chai B., Ma L., Li B., Zhang A., Cole J. R., Tiedje J. M., Zhang T.: Bioinformatics 32, 2346 (2016).
 61. Wallace J. C., Port J. A., Smith M. N., Faustman E. M.: Database 2017, (2017). doi: 10.1093/database/baw165.
 62. Streck: <https://www.streck.com/products/molecular/antibiotic-resistance-kits/>, staženo 12. 12. 2022.
 63. Genesig: <https://www.genesig.com/products/9670-antibiotic-resistance-blages>, staženo 12. 12. 2022.
 64. InterLabService: https://interlabservice.ru/upload/medialibrary/bb1/Product_list_2019.pdf, staženo 12. 12. 2022.
 65. Nzytech: <https://www.nzytech.com/products-services/category/molecular-diagnostics/human-pathogen/antibiotic-resistance/>, staženo 12. 12. 2022.

M. Šolcová and S. Purkrťová (*Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Application of Modern Methods for the Determination of Antibiotic Resistance**

The increasing occurrence of antibiotic resistance is one of the major problems of the 21st century. The occurrence of bacterial strains resistant to antibiotics subsequently narrows the spectrum of suitable antibiotics usable for the treatment of common bacterial infections or for the prevention of their occurrence, e.g., in surgery. Wastewater treatment plants, hospitals, and also the food chain belong to the hotspots, where the emergence and spread of new or existing strains of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes occur most frequently.

Phenotypic culture methods are routinely used in laboratories to determine antibiotic resistance, but they are laborious and time-consuming and the interpretation of exact results is also difficult. For this reason, faster alternatives for the detection of antibiotic resistant bacteria or even antibiotic resistance genes are sought. Such an example of an alternative method for the detection of antibiotic resistant bacteria is the use of the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry phenotypic method to identify the beta-lactamase producers. Genotype methods provide faster analysis and, at the same time, more accurate detection. Antibiotic resistance genes can be directly detected and quantified by polymerase chain reaction. Microarrays can be used to further speed up and increase the specificity of PCR amplicons detection. Massive parallel methods provide comprehensive information on the resistoma of the specific environment. They facilitate sequencing of individual DNA molecules or amplicons to detect determinants of antibiotic resistance. Massive parallel methods have the potential to replace conventional pathogen characterization and allow the detection of all microorganisms in a sample (including difficult-to-cultivate or noncultivable microorganisms).

Keywords: antibiotics, resistance, antibiotic resistance genes, antibiotic resistance determination