

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



**Bc. Lucie Kladivová**

**Role efluxového systému AdeABC v rezistenci *Acinetobacter baumannii*  
k aminoglykozidům**

**The role of the AdeABC efflux system in resistance of *Acinetobacter baumannii*  
to aminoglycosides**

Diplomová práce

Školitel: Doc. RNDr. Alexandr Nemeč, PhD.

Praha, 2014

**Prohlášení:**

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

V Praze, 4. 8. 2014

Podpis:

Děkuji svému školiteli, doc. RNDr. Alexandru Nemcovi, PhD., za vedení diplomové práce, odborné konzultantce, Mgr. Lence Křížové, za cenné rady a pomoc s qRT-PCR, Martině Maixnerové za technickou pomoc a v neposlední řadě i své rodině a příteli za podporu při studiu.

## Abstrakt

*Acinetobacter baumannii* je významný nemocniční patogen charakterizovaný schopností získávat a vyvíjet komplexní rezistenci k antimikrobním látkám. Na této schopnosti se zásadně podílejí efluxové systémy, které odstraňují molekuly antibiotik z intracelulárního prostoru bakterie. AdeABC je chromozomální efluxový systém typu RND, který je specifický pro *A. baumannii* a vyznačuje se širokým substrátovým spektrem. V této práci jsme se zaměřili na funkční analýzu systému AdeABC s cílem definovat jeho roli při vzniku rezistence k aminoglykozidům u geneticky odlišných kmenů. Východiskem byl soubor 15 epidemiologicky a genotypově definovaných kmenů *A. baumannii*, které byly plně citlivé k aminoglykozidům a dalším antibiotikům primárně účinným na tento druh. U těchto kmenů jsme určili genotyp AdeABC a v přítomnosti netilmicinu selektovali rezistentní varianty. Pomocí kvantitativní RT-PCR jsme porovnali expresi transportérového genu *adeB* u původně citlivých kmenů a selektovaných variant. Získané výsledky potvrzují, že zvýšená exprese AdeABC významně snižuje citlivost k aminoglykozidům a dalším antibiotikům, a naznačují, že tento systém poskytuje nemocničním kmenům *A. baumannii* významnou selekční výhodu.

**Klíčová slova:** *Acinetobacter baumannii*, AdeABC, efluxové systémy, RND, rezistence, aminoglykozidy, netilmicin, qRT-PCR.

## Abstract

*Acinetobacter baumannii* is an important nosocomial pathogen characterized by the ability to acquire and develop complex resistance to antimicrobial agents. This capability is caused by efflux systems removing molecules of antibiotics from bacterial intracellular space. AdeABC is an RND-type chromosomal efflux system specific for *A. baumannii* which has a broad substrate spectrum. In this work, we focused on functional analysis of AdeABC to define its role in the resistance development to aminoglycosides in genetically different strains. We studied a set of 15 epidemiologically and genotypically well characterized strains of *A. baumannii* which were fully susceptible to aminoglycosides and other antibiotics primarily effective against this species. We determined genotyp of AdeABC for these strains and performed a selection for resistant variants in the presence of netilmicin. Using real-time qRT-PCR we compared the expression of the transporter gene *adeB* in originally sensitive strains and selected variants. The obtained results confirmed that the increased expression of AdeABC significantly reduces susceptibility to aminoglycosides and other antibiotics. The results also suggest that the efflux system provides a significant selective advantage for nosocomial strains of *A. baumannii*.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, AdeABC, efflux systems, RND, resistance, aminoglycosides, netilmicin, real-time qRT-PCR.

## Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah .....	6
Seznam použitých zkratk .....	9
1. Úvod.....	10
2. Cíle práce .....	11
3. Přehled literatury.....	12
3.1. Charakteristika rodu <i>Acinetobacter</i> .....	12
3.2. Rezistence <i>Acinetobacter baumannii</i> k antibiotikům.....	12
3.3. Efluxové systémy u <i>A. baumannii</i> .....	13
3.3.1. ABC.....	15
3.3.2. MATE.....	15
3.3.3. SMR.....	15
3.3.4. MFS .....	15
3.3.5. RND .....	16
3.3.5.1. AdeABC .....	17
3.3.5.2. Struktura AdeABC .....	18
3.3.5.3. Geny AdeABC.....	19
3.3.5.4. Regulace AdeABC.....	19
3.3.5.5 Další efluxové systémy RND .....	20
4. Materiál a přístroje .....	22
4.1. Bakteriální kmeny .....	22
4.2. Bakteriologické půdy .....	22
4.3. Antimikrobní látky .....	22
4.4. Roztoky a ingredience pro analýzu DNA.....	23

4.5. Firemní kity .....	23
4.6. Primery.....	24
4.7. Přístroje a software.....	24
5. Metody.....	25
5.1. Selektce rezistených variant .....	25
5.2. Vyšetření citlivosti k antimikrobním látkám.....	25
5.2.1. Diskový difuzní test.....	25
5.2.2. Diluční agarový test .....	26
5.2.3. Etest .....	27
5.3. Makrorestriční analýza genomové DNA.....	27
5.3.1. Příprava agarózových bločků.....	28
5.3.2. Lýza DNA.....	28
5.3.3. Restrikční štěpení DNA .....	28
5.3.4. Pulzní elektroforéza (PFGE) .....	28
5.4. Průkaz genů pomocí PCR .....	29
5.4.1. Příprava buněčných alkalických lyzátů .....	29
5.4.2. PCR.....	29
5.4.3. Elektroforéza.....	30
5.5. Real-time qRT-PCR.....	30
5.5.1. Příprava standardů pro qRT-PCR .....	30
5.5.2. Izolace RNA .....	31
5.5.3. Eliminace DNA .....	32
5.5.4. Reverzní transkripce .....	32
5.5.5. Kvantifikace cDNA.....	32
5.5.6. Výpočty .....	33
6. Výsledky .....	34

6.1. Výběr a charakterizace kmenů .....	34
6.2. Selektce variant rezistentních na netilmicin .....	37
6.3. Antimikrobní citlivost donorových kmenů a z nich odvozených variant.....	41
6.4. Genotypizace donorových kmenů a z nich odvozených variant .....	44
6.5. Průkaz genu <i>adeB</i> pomocí PCR s novou sestavou primerů .....	45
6.6. Exprese genu <i>adeB</i> .....	46
7. Diskuze .....	48
8. Souhrn.....	51
9. Seznam literatury .....	52



## Seznam použitých zkratek

<b>ABC</b>	skupina efluxových systémů, z angl. <i>ATP-binding cassette superfamily</i>
<b>AFLP</b>	fingerpintová metoda pro detekci polymorfizmů v DNA, z angl. <i>amplified fragment length polymorphism</i>
<b>CFU</b>	životaschopné bakteriální jednotky, z angl. <i>colony forming unit</i>
<b>C<sub>t</sub></b>	prahový cyklus, cyklus v RT-PCR, ve kterém se fluorescenční signál stane detekovatelným, z angl. <i>threshold cycle</i>
<b>IMP</b>	protein vnitřní membrány, z angl. <i>inner membrane protein</i>
<b>LB</b>	Médium Luria-Bertani, tekutá kultivační půda
<b>MATE</b>	skupina efluxových systémů, z angl. <i>multidrug and toxic compound extrusion superfamily</i>
<b>MHA</b>	<i>Mueller Hinton agar</i> , agarová kultivační půda s nízkým obsahem antagonistů antibiotik
<b>MFP</b>	fúzní membránový protein, z angl. <i>membrane fusion protein</i>
<b>MFS</b>	skupina efluxových systémů, z angl. <i>major facilitator superfamily</i>
<b>MIK</b>	minimální inhibiční koncentrace, nejnižší koncentrace antibiotika, která inhibuje vizuální růst bakterie
<b>MLST</b>	multilokusová sekvenční typizace, z angl. <i>multilocus sequence typing</i>
<b>NA</b>	<i>nutrient agar</i> , pevná víceúčelová kultivační půda
<b>OMP</b>	protein vnější membrány, z angl. <i>outer membrane protein</i>
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce, z angl. <i>polymerase chain reaction</i>
<b>PFGE</b>	pulzní elektroforéza, z angl. <i>pulsed-field gel electrophoresis</i>
<b>Real-Time qRT-PCR</b>	kvantitativní PCR v reálném čase spojená s reverzní transkripcí
<b>RND</b>	skupina efluxových systémů, z angl. <i>resistance-nodulation-cell division</i>
<b>SMR</b>	skupina efluxových systémů, z angl. <i>small multidrug resistance superfamily</i>
<b>TMS</b>	transmembránový segment

## 1. Úvod

Efluxové systémy hrají důležitou roli u všech organizmů bakterie nevyjímaje. Jejich funkce jsou velmi rozmanité, nicméně jejich přirozená role v bakteriích je stále diskutovaným tématem. Nejznámější rolí transportéru v bakteriální buňce je odstraňování toxických látek, které pocházejí z vnějšího prostředí, nebo export produktů metabolismu, ať už produktů fermentace, látek mířených proti jiným organizmům (Helling *et al.*, 2002) či signálních molekul uplatňujících se v mezibuněčné komunikaci typu *quorum sensing* (Rahmati *et al.*, 2002). Transportérové systémy se uplatňují i v invazi, adherenci a kolonizaci eukaryotické buňky patogenními bakteriemi (Hirakata *et al.*, 2002). Efluxové systémy typu AcrAB například chrání *Escherichia coli* před žlučovými kyselinami (Thanassi *et al.*, 1997) nebo steroidními hormony (Elkins a Mullis, 2006) případně se mohou uplatňovat při homeostázi  $\text{Ca}^{2+}$  (Jones *et al.*, 2003).

Přirozené funkce efluxových systémů, které se podílejí při vzniku antimikrobních rezistencí, jsou nicméně většinou málo známé. Efluxový systém AdeABC bakterie *Acinetobacter baumannii* patřící do skupiny RND (z angl. *resistance-nodulation-cell division*) toho není výjimkou. Byl objeven v souvislosti se sníženou citlivostí tohoto mikroorganismu k širokému spektru antimikrobních látek jako aminoglykozidy, tetracykliny, fluorochinolony,  $\beta$ -laktamy atd. (Magnet *et al.*, 2001). Cílem této práce bylo definovat roli systému AdeABC při vzniku rezistence k aminoglykozidům u souboru genotypově a epidemiologicky odlišných kmenů *A. baumannii*. Kmeny, které byly plně citlivé ke studovaným antibiotikům a u nichž byl charakterizován genotyp pro AdeABC, byly vystaveny selekci v přítomnosti netilmicinu. Získané rezistentní varianty byly poté porovnány s rodičovskými kulturami s ohledem na kvantitativní citlivost *in vitro* a expresi transportérového genu *adeB*.

## 2. Cíle práce

Cílem bylo definovat roli systému AdeABC při vzniku rezistence k aminoglykozidům u genotypově odlišných kmenů *A. baumannii*. Dílčí cíle byly:

1. Výběr genotypově heterogenního souboru kmenů *A. baumannii*.
2. Pomocí netilmicinu selektovat varianty s rezistencí nebo sníženou citlivostí k tomuto antibiotiku a dalším aminoglykozidům a antibakteriálním látkám.
3. Porovnat kvantitativní citlivost *in vitro* u vybraných kmenů a jejich rezistentních variant na antimikrobní látky a určit míru vzniklé rezistence.
4. Kvantifikovat expresi *adeB* u rodičovských kmenů a rezistentních variant.
5. Posoudit význam systému AdeABC pro vznik rezistence porovnáním změn exprese *adeB* a citlivosti k substrátům efluxu u selektovaných variant.

### 3. Přehled literatury

#### 3.1. Charakteristika rodu *Acinetobacter*

Bakterie rodu *Acinetobacter* patří do třídy *Gammaproteobacteria*, která zahrnuje řadu významných patogenů. Jde o nefermentující, nepohyblivé, striktně aerobní a gramnegativní bakterie tyčinkovitého nebo kokovitého tvaru, obvykle uspořádané ve dvojicích. Jsou rozšířené zejména v půdních a vodních ekosystémech, ale izolují se též z potravin a kůže nebo sliznic zdravých lidí. Vyskytují se přirozeně ve vlhkém prostředí, ale na rozdíl od ostatních gramnegativních bakterií mohou přežívat dny až týdny v suchých podmínkách (Jawad *et al.*, 1998). Významným místem jejich výskytu je nemocniční prostředí, zejména oddělení intenzivní péče, kde mohou kolonizovat a infikovat pacienty se závažným základním onemocněním. *Acinetobacter baumannii* je klinicky nejvýznamnější druh rodu a zároveň jedním z nejvýznamnějších bakteriálních původců nemocničních infekcí. Tento podmíněný patogen způsobuje ventilační pneumonie, septikémie, endokarditidy, meningitidy a infekce močového ústrojí a měkkých tkání (Bergogne-Bérézin, 1996). V průběhu posledních tří desetiletí dramaticky vzrostl klinický a epidemiologický význam acinetobakterů a infekce způsobené těmito organizmy, zvláště *A. baumannii*, bývají obtížně léčitelné a to v důsledku vysoké proporce kmenů, které jsou rezistentní k většině nebo ke všem terapeuticky dostupným antimikrobiálními látkám (Dijkshoorn *et al.*, 2007; Boucher *et al.*, 2009).

#### 3.2. Rezistence *Acinetobacter baumannii* k antibiotikům

*A. baumannii* je přirozeně rezistentní k řadě antibiotik účinných na jiné gramnegativní patogeny i ostatní druhy acinetobakterů, např. k ampicilinu, cefalosporinům první a druhé generace nebo chloramfenikolu. Antimikrobní látky primárně účinné proti *A. baumannii* zahrnují aminoglykozidy, ureidopeniciliny, cefalosporiny třetí a čtvrté generace, sulbaktam, karbapenemy, fluorochinolony, tetracykliny, glycylycykliny a polymyxiny. Se zaváděním těchto antibiotik do klinické praxe se však u *A. baumannii* postupně objevily mechanismy rezistence ke všem těmito antimikrobiálními látkám. Tyto mechanismy se mohou různě kombinovat, což vede k multirezistenci až panrezistenci některých kmenů. Léčba infekcí vyvolaných těmito

kmeny je obtížná a další epidemické šíření multirezistence až panrezistence *A. baumannii* tak vyvolává oprávněné obavy (Boucher *et al.*, 2009).

Na multirezistenci *A. baumannii* se podílejí všechny obecné mechanismy rezistence známé u gramnegativních bakterií. Většina genů kódujících enzymy způsobující rezistentní fenotyp bakterie je získána horizontálním přenosem. Nejpočetnější skupinou mechanismů rezistence jsou  $\beta$ -laktamázy, jichž bylo u *A. baumannii* popsáno více než 50 (Dijkshoorn *et al.*, 2007; Roca *et al.*, 2012). Rozmanité jsou také mechanismy aminoglykozidové rezistence, jimiž jsou většinou modifikujícími enzymy ze skupin fosfotransferáz, nukleotidyltransferáz nebo acetyltransferáz (Nemec *et al.*, 2004; Seward *et al.*, 1998). Bodové mutace v genech kódujících DNA gyrázu a topoizomerázu IV způsobují rezistenci k fluorochinolonům (Vila *et al.*, 1997). Konstitutivní nadprodukce chromozomálních druhově specifických  $\beta$ -laktamáz typu AmpC nebo OXA-51 může být způsobena inzercí sekvence IS*Aba1* obsahující silný promotor do promotorových oblastí těchto genů (Heritier *et al.*, 2005). V případě AmpC způsobuje tato aktivace rezistenci k cefalosporinům třetí generace, u OXA-51 pak snížení citlivosti ke karbapenemům (Turton *et al.*, 2006). Mezi chromozomálně kódované a pravděpodobně pouze vertikálně přenosné systémy rezistence *A. baumannii* patří efluxové systémy, o kterých se pojednává dále. Výjimku tvoří efluxy kódované horizontálně přenášenými geny *tet* a *cmIA* patřící do skupiny MFS (z angl. *major facilitator superfamily*).

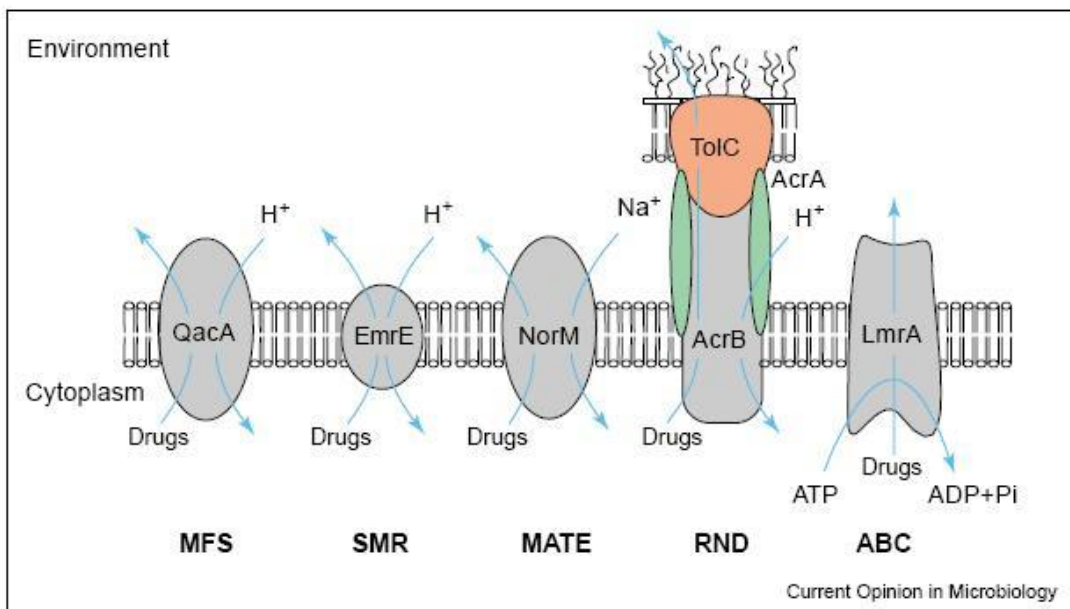
### 3.3. Efluxové systémy u *A. baumannii*

Efluxové systémy jsou součástí cytoplazmatické membrány bakterií. Jejich hlavní funkcí je odstraňování toxických látek, které vstoupily do buňky z vnějšího prostředí, produktů metabolismu (Helling *et al.*, 2002) či export signálních molekul potřebných pro *quorum sensing* (Kohler *et al.*, 2001; Rahmati *et al.*, 2002). Tyto pumpy se také mohou tvořit v raných stádiích infekce a uplatňovat se při kolonizaci a invazi eukaryotické hostitelské buňky bakteriemi (Hirakata *et al.*, 2002), kde kromě virulenčních faktorů mohou z buňky transportovat i běžně používaná antibiotika. Antibiotická rezistence je v mnoha případech dána souhrou mezi sníženým příjmem antibiotika do buňky, většinou kvůli nízké permeabilitě vnější membrány, a aktivním exportem antibiotika skrze efluxové systémy (Nikaido, 2003).

Celogenomové sekvenční analýzy ukázaly, že geny efluxových systémů tvoří u různých bakteriálních druhů v průměru 10 % transporterů (Paulsen, 2003). Tyto systémy jsou schop-

ny transportovat široké spektrum strukturálně odlišných substrátů včetně antibiotik ven z buňky (Paulsen, 2003). Jde tak o situaci odlišnou od inaktivačních enzymových systémů, jež způsobují rezistenci pouze k chemicky příbuzným látkám téže třídy antibiotik. Prvním popsaným efluxovým systémem u acinetobakterů byl systém exportující fosfoniové ionty (Midgley *et al.*, 1986).

Členění transportérů do skupin je založeno na sekvenční homologii, zdroji energie pro eflux, počtu komponent efluxu (jeden nebo více), počtu oblastí procházejících membránou a typu exportovaných substrátů (Piddock, 2006). Transportéry používající energii z ATP patří do skupiny **ABC** (z angl. *ATP-binding cassette superfamily*; van Veen a Konings, 1998). U sekundárních transportérů citlivých k látkám, které ruší protonový gradient, je transport spojen s výměnou protonů. K nim patří skupiny **MFS** (Piddock, 2006), **SMR** (z angl. *small multi-drug resistance superfamily*; Paulsen *et al.*, 1996) a **RND** (Putman *et al.*, 2000). Zdrojem energie pro sekundární aktivní transport v případě skupiny **MATE** (z angl. *mutlidrug and toxic compound extrusion superfamily*; Brown *et al.*, 1999) je antiport  $\text{Na}^+$ /substrát nebo výjimečně protonový gradient (Su *et al.*, 2005). Přehled jednotlivých skupin efluxových systémů a jejich zástupců se znázorněním zdroje energie je na obr. 1.



**Obr. 1.** Skupiny efluxových pump. Skupinu MFS tvoří sekundární transportéry poháněné chemiosmotickou energií (antiportér  $\text{H}^+$ /antibiotikum); příkladem je QacA u *Staphylococcus aureus*. Skupiny SMR a RND obsahují protonovou efluxovou pumpu, např. AcrB a EmrE u *E. coli*. AcrB je několikajednotkový komplex funkčně spojený s kanálem vnější membrány TolC a membránovým fúzním proteinem AcrA. Skupinu MATE tvoří efluxové pumpy poháněné sodíkovými ionty, příkladem je NorM z *Vibrio parahaemolyticus*. Eflux skupiny ABC je poháněn energií ze štěpení ATP, příkladem je LmrA u *Lactococcus lactis*. Převzato z Paulsen (2003).

### 3.3.1. ABC

Transportéry skupiny ABC využívají energii uvolněnou při hydrolýze ATP. Transportér ABC se obvykle skládá z membránového proteinu se šesti transmembránovými segmenty a z ATP vážící podjednotky. Často dimerizuje. Systémy ABC transportují mnoho substrátů včetně cukrů, aminokyselin, iontů, toxických látek, komplexů železa, polysacharidů a proteinů (Fath a Kolter, 1993). Příkladem je pumpa LmrA bakterie *Lactococcus lactis* (Bolhuis *et al.*, 1996) a MacAB u *E. coli* (Kobayashi *et al.*, 2001). U rodu *Acinetobacter* nebyl transportér typu ABC dosud popsán.

### 3.3.2. MATE

Skupina efluxových systémů MATE je u *A. baumannii* zastoupena efluxovým proteinem AbeM tvořeným 448 aminokyselinami. Molekula AbeM obsahuje 12 hydrofóbních oblastí. AbeM snižuje citlivost na norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, gentamicin, 4,6-diamino-2-fenylindol, triklosan, akriflavin, daunorubicin, doxorubicin, rhodamin 6G a ethidium bromid, v menší míře pak i na kanamycin, erytromycin, chloramfenikol, tetrafenylfosfonium chlorid a trimetoprim (Su *et al.*, 2005). Oproti většině známých systémů MATE je však AbeM poháněn proteinovým gradientem (Su *et al.*, 2005).

### 3.3.3. SMR

Pumpy skupiny SMR tvoří transportní protein cytoplazmatické membrány (Paulsen *et al.*, 1996), který obsahuje 110 aminokyselinových zbytků a čtyři transmembránové podjednotky (Schuldiner, 2007). Příkladem této skupiny u *A. baumannii* je systém AbeS, který způsobuje rezistenci k antibiotikům erytromycinu, chloramfenikolu a novobiocinu, barvivům akridin oranž, akriflavinu a benzalkonium chloridu, detergentům deoxycholátu a dodecylsírany sodnému a desinfekčním prostředkům (Srinivasan *et al.*, 2009).

### 3.3.4. MFS

Skupina MFS se podílí na transportu cukrů, metabolitů, aniontů a malých toxických molekul. U *A. baumannii* byl popsán efluxový systém s vysokou sekvenční podobností s proteinem MFS u *E. coli*. Tento systém je odpovědný za přirozenou chloramfenikolovou

rezistenci *A. baumannii* a byl proto nazván CraA (Roca *et al.*, 2009). CraA je tvořen 409 aminokyselinovými zbytky a obsahuje 12 transmembránových domén.

K horizontálně přenosným genům pro efluxové systémy MFS patří geny *tet* zodpovědné za rezistenci k tetracyklinu. U *A. baumannii* byly popsány geny *tet(A)* a *tet(B)*. Tet(B) oproti Tet(A) uděluje rezistenci také k minocyklinu a doxycyklinu (Huys *et al.*, 2005b).

V genomovém ostrově AbaR1 u multirezistentního kmene *A. baumannii* byl navíc nalezen horizontálně přenosný gen *cmlA*, který kóduje efluxový systém skupiny MFS způsobující rezistenci k chloramfenikolu (Fournier *et al.*, 2006). U *A. baumannii* byla dále popsána efluxová pumpa typu MFS nazvaná AmvA (Rajamohan *et al.*, 2010). Ta snižuje citlivost na široké spektrum substrátů, např. fluorochinolony, erytromycin, akriflavin a ethidium bromid.

### 3.3.5. RND

Efluxy RND jsou protonové antiportéry, které vyměňují jeden H<sup>+</sup> iont za jednu molekulu substrátu (Eswaran *et al.*, 2004). Do skupiny RND patří hlavní efluxové systémy, které přispívají k multirezistentnímu fenotypu gramnegativních bakterií. Za tímto fenotypem obvykle stojí nadměrná exprese pump RND způsobená mutacemi v regulačních genech. Často je ale úroveň vyvolané rezistence natolik nízká, že nedosahuje klinicky významných hodnot. Nicméně snížení koncentrace antibiotika v buňce může bakterii poskytnout čas pro získání kvantitativně vyššího stupně rezistence, např. získání inaktivujících mechanismů či mutace cílové struktury. Zvýšená exprese efluxu tak může být mezistupněm při vzniku kvantitativně vysoké rezistence u plně citlivých kmenů (Poole, 2004).

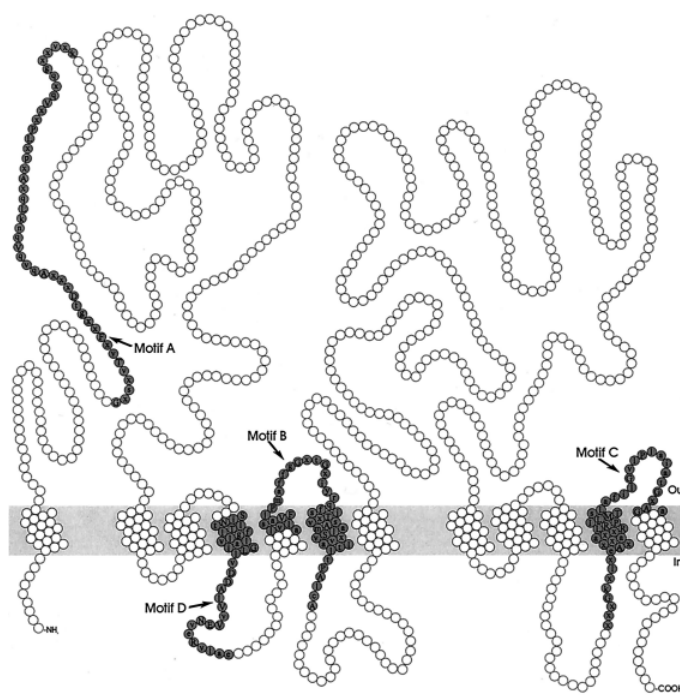
Vlastními transportéry RND jsou proteiny vnitřní membrány (IMP, z angl. *inner membrane protein*), jež aktivně vylučují určité látky vně buňky. IMP funkčně interaguje s fúzním membránovým proteinem (MFP, z angl. *membrane fusion protein family*) a proteinem vnější membrány (OMP, z angl. *outer membrane protein*), což umožňuje transport substrátu skrze vnitřní i vnější membránu gramnegativní bakterie (Zgurskaya a Nikaido, 2000). Pro funkci efluxového systému jsou všechny tři komponenty esenciální a jejich geny jsou obvykle uspořádány v operonu, jak je tomu u systému AdeABC (Magnet *et al.*, 2001). Avšak v některých případech gen pro OMP nemusí být součástí genového klastru (Chau *et al.*, 2004) a může být funkčně nahrazen jiným OMP (Lopes a Amyes, 2013; Marchand *et al.*, 2004).

Sekundární struktura efluxových systémů RND skupiny je tvořena 12 transmembránovými segmenty (TMS) se dvěma dlouhými smyčkami mezi TMS 1 a 2 a mezi TMS 7 a 8



(Putman *et al.*, 2000). Terciální struktura OMP je tvořena kontinuálním kanálem, který spojuje vnější membránu a periplazmatický prostor (Wong *et al.*, 2001). Terciální strukturu transportéru RND znázorňuje obr. 2.

Dosud byly popsány čtyři efluxové systémy typu RND spojené s rezistencí k aminoglykozidům: AmrAB-OprA způsobující přirozenou aminoglykozidovou a makrolidovou rezistenci u bakterie *Burkholderia pseudomallei* (Moore *et al.*, 1999), MexXY exportující aminoglykozidy, tetracyklin a erytromycin u *Pseudomonas aeruginosa* (Mine *et al.*, 1999), AcrD v *E. coli* (Rosenberg *et al.*, 2000) a AdeABC u *A. baumannii* (Magnet *et al.*, 2001).



**Obr. 2.** Strukturální model transportéru skupiny RND. Zvýrazněné jsou sekvenčně konzervované úseky. Převzato z Putman *et al.* (2000).

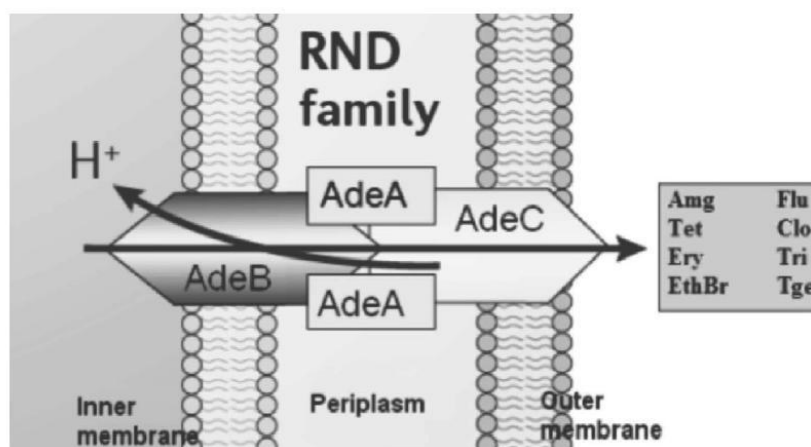
### 3.3.5.1. AdeABC

Efluxový systém AdeABC náležející do skupiny RND se vyskytuje u většiny kmenů *A. baumannii* (Nemec *et al.*, 2007). Má široké substrátové spektrum, jež zahrnuje látky hydrofobní, amfifilní, hydrofilní, pozitivně nabitě či neutrální. Inaktivační experimenty u klinických izolátů s nadměrnou expresí systému odhalily, že vede k rezistenci či snížené citlivosti k aminoglykozidům, cefotaximu, tetracyklinům, erytromycinu, chloramfenikolu, trimetoprimu, fluorochinolonům, minocyklinu ale i k ethidium bromidu (Magnet *et al.*, 2001). Novější práce ukázaly, že substrátem pro AdeABC je i tigecyklin, nové glycylycyklinové antibiotikum se slibným účinkem na citlivé i některé multirezistentní kmeny *A. baumannii* (Peleg *et al.*, 2007;

Ruzin *et al.*, 2007). Nadměrná exprese systému AdeABC může vést k multirezistentnímu fenotypu (Magnet *et al.*, 2001). Zvýšená exprese AdeABC kombinovaná s dalšími mechanizmy rezistence vede ke kvantitativně vysoké rezistenci k některým antibiotikům. Příkladem je synergický účinek AdeABC a oxacilináz na rezistenci k  $\beta$ -laktamům včetně karbapenemů (Heritier *et al.*, 2005). Jiným příkladem je rezistence k fluorochinolonům způsobená mutacemi v *gyrA* a *parC* a současnou nadměrnou expresí pumpy AdeB (Higgins *et al.*, 2004).

### 3.3.5.2. Struktura AdeABC

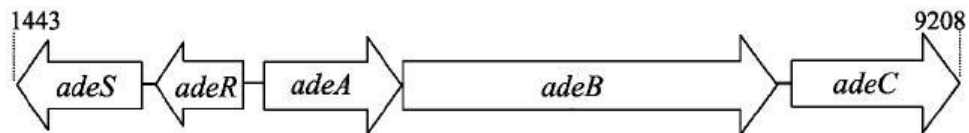
Systém AdeABC je tvořen třemi komponentami (obr. 3). AdeA je MFP. Vlastní transportér AdeB je umístěný v cytoplazmatické membráně. Obsahuje 1035 aminokyselinových zbytků a 12 transmembránových podjednotek (Magnet *et al.*, 2001) a je sekvenčně polymorfní (Huys *et al.*, 2005a). AdeC je OMP umožňující export skrze vnější membránu. Jeho přítomnost není pro funkci systému nezbytná, neboť může být pravděpodobně nahrazena jiným OMP (Marchand *et al.*, 2004), např. proteinem AdeK spojeným s efluxovým systémem AdeIJK (Damier-Piolle *et al.*, 2008; Lopes a Amyes, 2013). Efluxový protein AdeB zachycuje substrát z vnitřní fosfolipidové dvojvrstvy cytoplazmatické membrány nebo cytoplazmy a transportuje jej vně buňky prostřednictvím AdeC (Wieczorek *et al.*, 2008). Periplazmatický protein AdeA hraje roli v kooperaci mezi AdeB a AdeC a pravděpodobně v přiblížení obou membrán pro usnadnění transportu a stabilizaci struktury OMP (Zgurskaya a Nikaido, 2000).



**Obr. 3.** Uspořádání efluxového systému AdeABC v buněčné stěně *A. baumannii*. Vyznačen je antiport protonu a antibiotika skrze membránu. Amg, aminoglykozidy; Flu, fluorochinolony; Tet, tetracykliny; Clo, chloramfenikol; Ery, erytromycin; Tri, trimetoprim; EthBr, ethidium bromid; Tge, tigecyklin. Převzato z Wieczorek *et al.* (2008).

### 3.3.5.3. Geny AdeABC

Geny pro proteiny AdeA, AdeB a AdeC a pro regulační systém AdeRS jsou umístěny na bakteriálním chromozomu (Magnet *et al.*, 2001). Strukturní geny *adeA*, *adeB* a *adeC* umístěné za sebou tvoří operon (Marchand *et al.*, 2004). Nedávná studie (Lopes a Amyes, 2013) nicméně naznačuje, že gen *adeB* může být exprimován nezávisle na *adeA*. Geny kódující regulační proteiny AdeR a AdeS předcházejí genu *adeA* (Marchand *et al.*, 2004). Gen kódující transportérový protein AdeB nebyl nalezen u žádného jiného druhu než *A. baumannii*, což naznačuje, že tento transportér je druhově specifický (Chu *et al.*, 2006). Uspořádání genů systému AdeABC znázorňuje obr. 4.



**Obr. 4.** Uspořádání strukturních a regulačních genů systému AdeABC u *A. baumannii* BM4454. Šipky odpovídají kódujícím sekvencím a ukazují směr transkripce. Upraveno podle Marchand *et al.* (2004).

### 3.3.5.4. Regulace AdeABC

Regulační systém efluxu AdeABC je dvousložkový (Magnet *et al.*, 2001), jenž obecně umožňuje adaptaci bakterie ke změnám v prostředí změnou genové exprese (Szurmant *et al.*, 2007). Geny pro dvousložkový regulační systém u *A. baumannii* (*adeR* a *adeS*) jsou součástí operonu přepisovaného oproti strukturním genům AdeABC v opačném směru (Marchand *et al.*, 2004). Ve dvousložkových systémech je odpovědí na podnět autofosforylace senzoru (kinázy) na vnitřním histidinu (box H). Fosfátová skupina je poté přenesena na aspartátový zbytek regulátoru. Fosforylace a přenos fosfátové skupiny mezi těmito doménami je vratný defosforylační aktivitou senzoru. Přepínáním mezi fosforylací a defosforylací moduluje histidinkináza stav regulátorů a následně tak reguluje expresi strukturních genů (Koretke *et al.*, 2000). Transkripčním regulátorem systému AdeRS je AdeR, který je tvořen 228 aminokyselinami. Histidinkináza AdeS je o 100 aminokyselin kratší a je esenciální pro expresi operonu AdeABC (Marchand *et al.*, 2004).

Mutace v regulačních genech mohou vést k nadprodukcí AdeABC, jejímž následkem je snížení citlivosti k řadě látek (Marchand *et al.*, 2004). Jde např. o bodové mutace v *adeR* (Pro116→Leu) a *adeS* (Thr153→Met) (Marchand *et al.*, 2004). Nadměrnou expresi AdeABC

může vyvolat také inserce sekvence *ISAbal1* do oblasti předcházející operon *adeABC* (Ruzin *et al.*, 2007). Nedávné studie nicméně naznačují, že regulace AdeABC je komplexnější a zahrnuje dosud neznámé regulační složky (Hornsey *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010; Lopes a Amyes, 2013).

### 3.3.5.5 Další efluxové systémy RND

Vedle AdeABC se u acinetobakterů vyskytují další exfluxové systémy patřící do skupiny RND, např. AdeDE, AdeIJK, AdeFGH a AdeXYZ. Zatímco AdeIJK a AdeFGH jsou charakteristické pro *A. baumannii* (Coyne *et al.*, 2010 b; Damier-Piolle *et al.*, 2008), transportéry AdeE a AdeY byly zjištěny u *Acinetobacter pittii* (Chu *et al.*, 2006), klinicky významného druhu, jenž je příbuzný *A. baumannii*. Strukturální proteiny různých systémů RND jsou sekvenčně příbuzné. Mezi vlastními transportéry mají nejvyšší sekvenční identitu AdeB a MexD (53 %; Magnet *et al.*, 2001). Vysoká identita (67 %) byla nalezena také mezi AdeZ a AdeC (Chu *et al.*, 2006; Piddock 2006).

Systém AdeIJK přispívá k rezistenci *A. baumannii* na  $\beta$ -laktamy, chloramfenikol, tetracyklin, erytromycin, linkosamidy, fluorochinolony, kyselinu fusidovou, novobiocin, rifampin a trimetoprim (Damier-Piolle *et al.*, 2008). AdeIJK navíc vylučuje aktidin, pyronin, safranin a dodecylsírán sodný, avšak nikoli ethidium bromid (Damier-Piolle *et al.*, 2008). Chemická struktura těchto molekul naznačuje, že amfipatické látky jsou preferovanými substráty. AdeIJK spolu s AdeABC významně přispívá k rezistenci k tetracyklinu, minocyklinu a tigecyklinu a uplatňuje se při primárně snížené (nezískané) citlivosti *A. baumannii* k různým antibiotikům (Damier-Piolle *et al.*, 2008). Exprese AdeIJK je striktně regulovaná a nadprodukce systému je omezená. Hladina exprese *adeIJK* je nižší než u *adeABC* (Coyne *et al.*, 2010 a). Nedávno byl popsán transkripční regulátor *adeN*, který reprimuje expresi systému (Rosenfeld *et al.*, 2012).

Coyne *et al.* (2010 b) popsali u *A. baumannii* systém AdeFGH, který byl objeven při selekci chloramfenikolem a norfloxacinem. Jeho nadměrná exprese vede k vysokému stupni rezistence k většině antibiotik kromě  $\beta$ -laktamů a aminoglykozidů.

AdeDE je efluxový systém popsáný u *A. pittii* (Chau *et al.*, 2004). Podílí se na snížené citlivosti k amikacinu, ceftazidimu, chloramfenikolu, ciprofloxacinu, erytromycinu, ethidium bromidu, meropenemu, rifampinu a tetracyklinu. U AdeDE nebyl za geny *adeD* a *adeE* nalezen čtecí rámec pro protein vnější membrány. Je možné, že se nachází jinde v genomu a není

regulován spolu s těmito geny nebo jeho funkci nahrazují jiné proteiny vnější membrány (Chau *et al.*, 2004). U *A. pittii* se vyskytuje též efluxový systém AdeYXZ, jenž se uplatňuje v esenciálních buněčných procesech spíše než v antimikrobní rezistenci (Chu *et al.*, 2006).

## 4. Materiál a přístroje

### 4.1. Bakteriální kmeny

**Kmeny *Acinetobacter baumannii*** použité ve studii a jejich charakterizace jsou uvedeny níže (viz kapitola 6.1).

**Kontrolní kmeny** pro vyšetření citlivosti na antibiotika: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a *A. baumannii* NIPH 56

### 4.2. Bakteriologické půdy

**LB (Luria-Bertani) médium.** Složení: trypton (10 g/l), kvasničný extrakt (5 g/l), chlorid sodný (10 g/l), pH 7,0

**Konzervační médium Caso Bouillon** (Merck, Německo). Složení: Pepton z kaseinu (17 g/l), pepton ze sóji (3 g/l), chlorid sodný (5 g/l), hydrogenfosforečnan draselný (2,5 g/l), monohydrát glukózy (2,5 g/l), pH 7,3. Asepticky přidán **glycerol** p.a. (Lach-Ner, Česká republika) v poměru 1:1

**Mueller Hinton agar** (MHA, Oxoid, Velká Británie). Složení: Hovězí hydrolyzovaná infuze (300 g/l), hydrolyzát kaseinu (17,5 g/l), škrob (1,5 g/l), agar (17 g/l), pH 7,3

**Mueller Hinton II Agar** (MHA II, Becton, Dickinson and Company, USA). Složení: Hovězí buňečný extrakt (2 g/l), kyselý hydrolyzát kaseinu (17,5 g/l), škrob (1,5 g/l), agar (17 g/l), pH 7,3

**Nutrient agar** (NA, Oxoid, Velká Británie). Složení: kvasničný extrakt (4 g/l), trypton (5 g/l), glukóza (50 g/l), dihydrogenfosforečnan draselný (0,55 g/l), chlorid draselný (0,425 g/l), chlorid vápenatý (0,125 g/l), síran hořečnatý (0,125 g/l), chlorid železitý (0,0025 g/l), síran manganatý (0,0025 g/l), bromkresolová zeleň (0,022 g/l), agar (15 g/l), pH 5,5

### 4.3. Antimikrobní látky

**Disky s antimikrobními látkami** (Oxoid, Velká Británie) pro diskový difuzní test, obsah těchto látek v discích uvádí tab. 1

**Etest tobramycin a netilmicin** (bioMérieux, Francie). Rozmezí koncentrace: 0,16-256 mg/l

**Netilmicin** (ADATAB Mast Group, Velká Británie) pro agarovou diluční metodu vyšetření citlivosti. Koncentrace: 3,2 mg na disk

**Tab. 1.** Disky s antimikrobními látkami.

<b>Antimikrobní látka</b>	<b>µg/disk</b>	<b>Antimikrobní látka</b>	<b>µg/disk</b>
Amikacin	30	Netilmicin	30
Cefepim	30	Ofloxacin	5
Cefotaxim	30	Piperacilin	100
Ceftazidim	30	Sulfametoxazol	100
Ciprofloxacin	5	Tetracyklin	30
Doxycyklin	30	Tigecyklin	15
Gentamicin	10	Tobramycin	10
Kanamycin	30	Trimethoprim	5
Nalidixová kyselina	30		

#### **4.4. Roztoky a ingredience pro analýzu DNA**

**Agaróza** (Serva, Německo)

**Agaróza s nízkým bodem tání** (Bio-Rad, USA)

**Agaróza SeaKem LE** (Lonza Group, Švýcarsko)

**H<sub>2</sub>O** pro molekulární analýzu (Bio-Rad, USA)

**Lysozym** (Merck, Německo). Aktivita >100000 U/mg

**Lyzující roztok.** Složení: dodecylsírán sodný (2,5 g/l), hydroxid sodný (2 g/l), H<sub>2</sub>O

**Lyzující roztok EC.** Složení: Tris (7,3 g/l), NaCl (0,06 g/l), EDTA (29,2 g/l), Brij 58 (5 g/l), deoxycholát (2 g/l), sarkosyl (5 g/l), lysozym (1 g/l), RNázy (0,02 g/l), H<sub>2</sub>O, pH 7,6

**Marker lambda** (Bio-Rad, USA). Standard molekulových hmotností pro PFGE (0,05–1 Mb)

**Proteináza K** (Roche, Švýcarsko). PCR grade

**Pufr ESP.** Složení: EDTA (146,1 g/l), sarkozyl (1 g/l), proteináza K (0,05 g/l), H<sub>2</sub>O, pH 9,0-9,5

**Pufr TBE.** Složení: kyselina boritá (5,5 g/l), Tris (10,8 g/l), EDTA (5,9 g/l), H<sub>2</sub>O, pH 8,0

**Pufr TE.** Složení: Tris (1,21 g/l), EDTA (0,29 g/l), H<sub>2</sub>O, pH 7,5

**Roztok PIV.** Složení: Chlorid sodný (58,4 g/l), Tris (1,2 g/l), H<sub>2</sub>O, pH 7,6

**Roztok pro restrikční štěpení.** Složení: bovinní sérový albumin (2 µl), pufr NE4 (New England Biolabs, Velká Británie; 20 µl), Apal (0,6 µl, aktivita 50 U/µl), H<sub>2</sub>O (178 µl)

#### **4.5. Firemní kity**

**Master PCR mix** (Qiagen, Německo)

**QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix** (Qiagen, Německo)

**QuantiTect Reverse Transcription Kit** (Qiagen, Německo): pufr gDNA Wipeout, Quantiscript Reverse Transcriptase, pufr Quantiscript RT, RT Primer Mix, RNase free H<sub>2</sub>O

**QIAquick PCR purification kit** (Qiagen, Německo): pufr PB, pufr PE, pufr EB (Tris 0,001 g/l, pH 8,5)

**RNeasy Protect Bacteria Mini Kit** (Qiagen, Německo): RNAProtect Bacteria Reagent, činidlo RLT, činidlo RW1, RPE + 80 % 96% etanolu, RNase-free H<sub>2</sub>O

#### 4.6. Primery

Dodavatel: Generi Biotech, Česká republika

**O3** (5'→3'): GTATGAATTTGATGCTGC

**O4** (5'→3'): CACTCGTAGCCAATACC

**adeB\_rtR** (5'→3'): TTTCGCAATCAGTTGTTCCA

**adeB\_rtF** (5'→3'): GAATAAGGCACCGCAACAAT

**rpoB\_rtR** (5'→3'): ATTGCTTCATCTGCTGGTTG

**rpoB\_rtF** (5'→3'): GAGTCTAATGGCGGTGGTTC

#### 4.7. Přístroje a software

**Centrifuga Mikro 120** (Hettich, Německo)

**Centrifuga Universal 320R** (Hettich, Německo)

**Elektroforetická vana DNA Sub-Cell + zdroj 3000Xi** (Bio-Rad, USA)

**Pulzní elektroforéza Chef-DR III System** (Bio-Rad, USA)

**Spektrofotometr WPA S800** (Biochrom, Velká Británie)

**Termoblok Termomixer Comfort** (Eppendorf, Německo)

**Stolní třepačka** (Gilson, Německo)

**Spektrofotometr NanoDrop 1000 V.3.8** (Thermo-Scientific, USA)

**Termální gradientový cykler** (Sensoquest GmbH, Německo)

**Termální cykler C1000™ a optický reakční modul CFX96** (Bio-Rad, USA)

**Třepací lázeň s teplotní regulací** (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Německo)

**Program Bio-Rad CFX Manager** (Bio-Rad, USA), verze 1.6.541.1028.



## 5. Metody

### 5.1. Selektce rezistentních variant

Z vybraných kmenů *A. baumannii* jsme selektovali varianty se sníženou citlivostí k netilmicinu. Pro tento účel jsme připravili plotny s dvojnásobně se zvyšující koncentrací netilmicinu (0,5 až 16 mg/l) smísením 2 ml roztoku antimikrobní látky příslušné koncentrace a 18 ml rozehráté agarové půdy MHA II. Na předsušené plotny jsme rozetřeli po 200  $\mu$ l inokula obsahujícího přibližně  $10^9$  CFU. Zároveň jsme pro každé inokulum určili CFU dle vzorce 1. Naočkované plotny jsme inkubovali 48 hod. při 35°C. K další práci jsme vybírali kolonie narostlé v nejvyšších koncentracích antibiotika a takové, které se na téže plotně lišily svojí velikostí. Izoláty jsme přečistili pasáží na NA a uchovali v konzervačním médiu při -20°C.

$$(1) \quad \frac{\text{CFU}}{\text{ml}} = \frac{\text{počet kolonií} \times \text{diluční faktor}}{\text{počet ploten}}$$

### 5.2. Vyšetření citlivosti k antimikrobním látkám

Pro vyšetření citlivosti bakteriálních kmenů a získaných variant na antimikrobní látky jsme použili tři metody: semikvantitativní diskový difuzní test, kvantitativní agarový diluční test a kvantitativní Etest. Kontrolními kmeny se známými hodnotami citlivosti byly *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853 a *A. baumannii* NIPH 56. V tab. 2 jsou uvedeny námi použité hraniční hodnoty pro necitlivost (rezistenci nebo intermediární citlivost) k dané antimikrobní látce.

#### 5.2.1. Diskový difuzní test

Diskový difuzní test je založen na difuzi antimikrobní látky obsažené v disku do agarové půdy a následném potlačení růstu bakteriální kultury. Výsledkem je vznik inhibiční zóny, jejíž průměr je semikvantitativním ukazatelem míry citlivosti testované bakterie. K provedení tohoto testu jsme použili standardní půdu MHA, jež obsahuje nízké koncentrace antagonistů účinku antibiotik. Plotny s MHA jsme předsušili při 35°C a přelili jsme je 2 ml bakteriálního inokula ve fyziologickém roztoku o koncentraci  $\sim 10^6$  CFU/ml. Přebytkovou tekutinu jsme odsáli Pasteurovou pipetou. Disky s antimikrobními látkami jsme po několika minutách umís-

tili na plotny s pomocí dispenzoru a po zaschnutí inokula jsme otočili plotny dnem vzhůru a inkubovali 24 h při 35°C. Výsledné inhibiční zóny jsme měřili posuvným měřítkem.

**Tab. 2.** Hraniční hodnoty pro necitlivost k antimikrobním látkám pro *A. baumannii*.

<b>Diskový difuzní test</b>			
<b>Antimikrobní látka</b>	<b>µg/disk</b>	<b>IZ (mm)</b>	<b>Reference</b>
Amikacin	30	≤ 16	CLSI (2011)
Cefepim	30	≤ 17	CLSI (2011)
Cefotaxim	30	≤ 22	CLSI (2011)
Ceftazidim	30	≤ 17	CLSI (2011)
Ciprofloxacin	5	≤ 20	CLSI (2011)
Doxycyklin	30	≤ 12	CLSI (2011)
Gentamicin	10	≤ 14	CLSI (2011)
Kanamycin	30	≤ 17	CLSI (2011)*
Nalidixová kyselina	40	≤ 18	CLSI (2011)*
Netilmicin	30	≤ 14	CLSI (2011)*
Ofloxacin	5	≤ 15	CLSI (2011)*
Piperacilin	100	≤ 20	CLSI (2011)
Sulfametoxazol	100	≤ 16	CLSI (2011)*
Tetracyklin	30	≤ 14	CLSI (2011)
Tigecyklin	15	≤ 19	Navon-Venezia <i>et al.</i> (2007)
Tobramycin	10	≤ 14	CLSI (2011)
Trimethoprim	5	≤ 15	CLSI (2011)*
<b>Agarový diluční test a Etest</b>			
<b>Antimikrobní látka</b>	<b>MIK (mg/l)</b>		<b>Reference</b>
Netilmicin	≤ 16		CLSI (2011)
Tobramycin	≤ 8		CLSI (2011)

**Vysvětlivky:** IZ, inhibiční zóna ; MIK, minimální inhibiční koncentrace; \*, převzaty hodnoty pro *Enterobacteriaceae*.

### 5.2.2. Diluční agarový test

Agarový diluční test slouží k určení minimální inhibiční koncentrace (MIK) na základě inhibice růstu bakterie na pevném médiu s dvojnásobně rostoucí koncentrací antimikrobní látky. Nejnižší koncentrace látky, při níž bakterie vizuálně neroste, se označuje jako MIK. Pro vyšetření MIK bakterií tímto testem jsme použili rozmezí koncentrací látek uvedené v tab. 3. 2 ml roztoku antimikrobní látky o příslušné koncentraci jsme smíchali s 18 ml rozeřáté agarové půdy MHA II. Připravené plotny jsme sušili několik min. při 35°C. Inokulum o koncentraci  $\sim 10^6$  CFU/ml jsme očkovali replikátorem. Po zaschnutí inokula jsme plotny umístili dnem

vzhůru do termostatu a inkubovali 24 hod. při teplotě 35°C. Poté jsme odečítali hodnoty MIK.

**Tab. 3.** Rozmezí koncentrací antimikrobních látek použitých pro vyšetření citlivosti agarovou diluční metodou.

<b>Antimikrobní látka</b>	<b>Rozmezí koncentrací (mg/l)</b>
Amikacin	0,25-128
Cefotaxim	0,125-64
Ceftazidim	0,25-128
Ciprofloxacin	0,125-32
Gentamicin	0,125-32
Kanamycin	0,125-32
Netilmicin	0,125-64
Tetracyklin	0,125-32
Tigecyklin	0,125-64
Tobramycin	0,064-16
Trimethoprim	0,125-32

### 5.2.3. Etest

Etest kombinuje principy diskového difuzního a agarového dilučního testu za použití proužku, jenž obsahuje gradient antimikrobní látky a je opatřen stupnicí pro odečet MIK. Hodnota MIK se odečítá v místě, kde se inhibiční zóna bakteriálního růstu dotýká proužku Etestu. Předsušené plotny s 20 ml půdy MHA II jsme zaočkovali přelitím 2 ml inokula o koncentraci  $\sim 10^6$  CFU/ml a přebytečnou tekutinu jsme odsáli Pasteurovou pipetou. Po zaschnutí inokula jsme položili na plotny pinzetou proužky Etestu. Plotny jsme inkubovali 24 hod. při teplotě 35°C a poté jsme odečítali hodnoty MIK.

### 5.3. Makrorestriční analýza genomové DNA

Tato metoda umožňuje separaci fragmentů DNA větších než 20 kb. Je založena na přípravě intaktní genomové DNA v agarozových bločcích, jejím štěpení pomocí restričních endonukleáz rozeznávajících malý počet cílových sekvencí a separaci vzniklých fragmentů DNA pomocí pulzní elektroforézy. Pulzní elektroforéza je založena na změnách orientace elektric-

kého pole, kdy na rozdíl od konvenční elektroforézy dochází ke střídání jeho směru v úhlu 60°.

### **5.3.1. Příprava agarózových bločků**

Bakterie uchované při -20°C jsme vyočkovali na NA a kultivovali 24 hod. při 30°C. Narostlou kulturu jsme přeočkovali na MHA a 10 mg narostlé biomasy jsme navážili do mikroskopické zkušební zkumavky, do které jsme přidali 0,5 ml roztoku PIV. Vzorek v mikroskopické zkušební zkumavce jsme homogenizovali na stolní míchačce a centrifugovali 2 min. při 13 000 ot./min. Odstranili jsme supernatant a pelet resuspendovali ve 200 ml PIV. Do důlků mikrotitrační destičky jsme vnesli 200 µl PIV a 2 µl resuspendované pelety a promíchali. Spektrofotometrem jsme změřili optickou densitu při 590 nm. Poté jsme peletovou suspenzi naředili PIV, jehož množství jsme vypočetali podle vzorce (2).

$$(2) \quad (40 \times OD_{590} \times 210) - 410$$

Poté jsme odebrali 150 µl naředěného vzorku do mikroskopické zkušební zkumavky a inkubovali 10 min. při 42°C v termobloku. Dále jsme připravili 150 µl 1,5% agarózy smísením agarózy s nízkým bodem tání s PIV a inkubovali 10 min. při 42°C. Do mikroskopické zkušební zkumavky se 150 µl naředěného vzorku jsme přidali 150 µl 1,5% agarózy, směs promíchali na stolní míchačce a nalili do forem na bločky, které jsme poté umístili na 5 min. do -20°C.

### **5.3.2. Lýza DNA**

Do uzavíratelné plastové zkušební zkumavky o objemu 15 ml jsme vnesli 1 ml lyzujícího roztoku EC, přidali připravené agarózové bločky a inkubovali ve vodní lázni 5 hod. při 37°C. Poté jsme EC slili přes gázu, přidali 1 ml ESP, inkubovali 24 hod. ve vodní lázni při 50°C. ESP jsme slili přes gázu a vzorek pětkrát promyli v 13 ml TE pomocí stolní třepačky po dobu 30 min.

### **5.3.3. Restrikční štěpení DNA**

Pomocí žiletky jsme odřízli z agarózového bločku tenký proužek a přenesli jej do mikroskopické zkušební zkumavky s 200 µl restrikční směsi a inkubovali 2 hod. při 25°C. Jako standard jsme použili marker lambda, který jsme inkubovali v TE 2 hod. při 37°C.

### **5.3.4. Pulzní elektroforéza (PFGE)**

Připravili jsme 1% agarózu SeaKem LE a rozehřátou na 50°C ji zalili do formy s připravenými agarózovými bločky přilnutými k elektroforetickému hřebenu. Po ztuhnutí

agarózy jsme vzniklé otvory zalili rozeřátou agarózou. Gel jsme umístili do elektroforetické vany vychlazené na 14°C a obsahující 2 l 2× ředěného TBE. PFGE probíhala za následujících podmínek: rozmezí změn směru elektrického pole bylo 5-20 s při napětí 6 V/cm, teplotě 14°C a úhlu mezi směry elektrického pole 120°C; doba separace byla 19 hod. Výsledný gel jsme barvili 45 min. v roztoku ethidium bromidu, 30 min. odbarvovali v destilované vodě a následně fotografovali.

#### 5.4. Průkaz genů pomocí PCR

Pomocí dvou sad primerů (O3 a O4, *adeB\_rtR* a *adeB\_rtF*) jsme testovali přítomnost genu *adeB* u mateřských kmenů.

##### 5.4.1. Příprava buněčných alkalických lyzátů

Kmeny jsme naočkovali na MHA a kultivovali 24 hod. při 30°C. Následně jsme do 1,5 ml mikrozkmavek rozplnili po 20 µl lyzujícího roztoku, v němž jsme plastovou kličkou resuspendovali po jedné kolonii. Po inkubaci 15 min. v termobloku při 95°C jsme vzorky krátce centrifugovali při 13000 ot./min. Následně jsme přidali 180 µl H<sub>2</sub>O pro molekulární analýzu. Takto připravený lyzát jsme homogenizovali na stolní třepačce a centrifugovali 5 min. při 13000 ot./min. Pro PCR jsme použili supernatant. Lyzát jsme uschovali v -20°C.

##### 5.4.2. PCR

Celkem 10 µl Master PCR mixu jsme smísili s 6 µl H<sub>2</sub>O pro molekulární analýzu, 1 µl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 1,6 µl 2,5µM primerů a 1,4 µl roztoku DNA. Podmínky PCR jsou uvedeny v tab. 4. Počet cyklů byl 35.

Tab. 4. Podmínky PCR.

Fáze cyklu PCR	Teplota	Čas
Iniciální denaturace	94°C	3 min.
Denaturace	94°C	50 s
Annealing	53°C	30 s
Elongace	72°C	2 min.
Terminální elongace	72°C	5 min.

### 5.4.3. Elektroforéza

Smísením 1,2 g agarózy (Serva) s 60 ml TBE, následným povařením a vylitím do elektroforetické formy s hřebenem jsme připravili ~2% agarózový gel. Separace probíhala 30 min. při 110 V. Poté jsme gel obarvili v roztoku ethidium bromidu, promyli v destilované vodě a fotografovali.

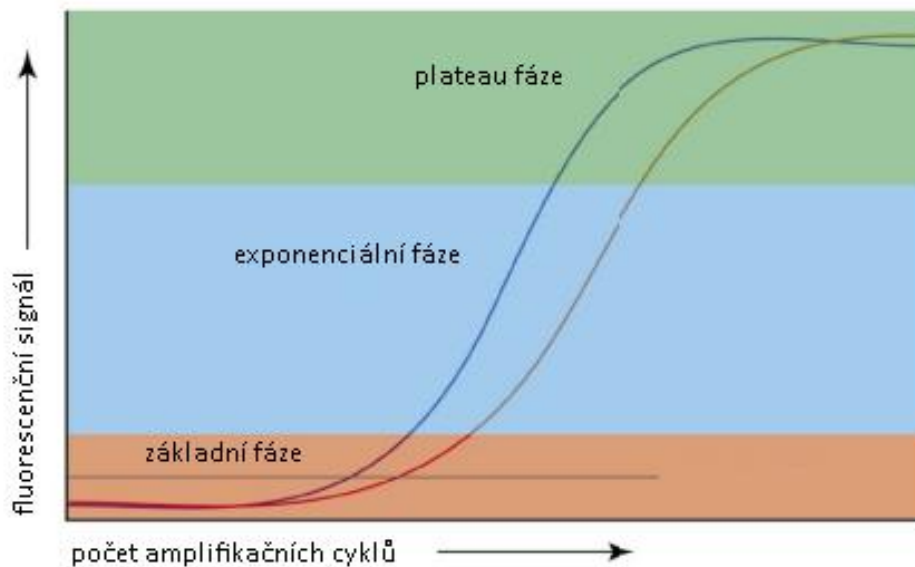
### 5.5. Real-time qRT-PCR

Kvantitativní PCR v reálném čase spojená s reverzní transkripcí (Real-time qRT-PCR) slouží ke kvantifikaci templátové nukleové kyseliny a umožňuje průběžně monitorovat přírůstky DNA během amplifikace. Využívá signál vyvolaný fluorescenčním značením dvoušroubovicové DNA (dsDNA) pomocí SYBR Green v každém amplifikačním cyklu. Metoda umožňuje přímou kvantifikaci počtu kopií sekvencí DNA, respektive cDNA (DNA připravená reverzní transkripcí RNA). Zjištění absolutní kvantity cDNA (copy number) v daném vzorku je dosaženo interpolací hodnoty  $C_t$  (prahový cyklus, ve kterém se fluorescenční signál stane detekovatelným, z angl. threshold cycle) testovaného vzorku vůči hodnotám  $C_t$  tzv. standardů o známém množství DNA. Při relativní kvantifikaci je výsledek dán poměrem relativního množství testované cDNA (v našem případě selektovaná varianta) a cDNA kontrolního vzorku (mateřský kmen). Obě tyto metody jsou normalizovány pomocí referenčního provozního genu (*rpoB*), jehož exprese je konstantní. Pro náš účel jsme použili absolutní i relativní kvantifikaci. Princip kvantifikace templátové DNA pomocí Real-Time qRT-PCR znázorňuje obr. 5. SYBR Green je fluorescenční barvivo, které se nespecificky váže na dsDNA, kdy je jeho signál až 1000× větší oproti volné formě v roztoku. Proto je celkový fluorescenční signál v reakci přímo úměrný množství dsDNA.

#### 5.5.1. Příprava standardů pro qRT-PCR

10  $\mu$ l Master PCR mixu jsme smísili se 7  $\mu$ l vody, 1,6  $\mu$ l 2,5  $\mu$ M primerů (*adeB\_rtR*, *adeB\_rtF*) a 1,4  $\mu$ l roztoku templátové DNA. Podmínky PCR jsou uvedeny v tab. 5. Pro přečištění PCR amplikonu jsme použili QIAquick PCR purification kit. K amplikonu jsme přidali pufr PB v poměru 1:5. Do 2ml mikrozkušavky jsme vložili filtr, na který jsme nanесли celý vzorek a takto připravené vzorky jsme centrifugovali 60 s při 13000 ot./min. Po vylití obsahu centrifugační zkušavky jsme na filtr napipetovali 750  $\mu$ l pufru PE a vzorky jsme centrifugovali za

stejných podmínek. Tento proces jsme ještě jednou opakovali. Filtr s DNA jsme poté vložili do nové 1,5ml mikrozkušavky a přidali 50  $\mu$ l pufru EB. Takto připravené vzorky DNA jsme ponechali stát 1 min. při laboratorní teplotě a poté znovu centrifugovali 1 min. při 13000 ot./min. Pro další experimenty jsme změřili koncentraci DNA a vzorek naředili desítkovou ředící řadou. Vzorek jsme uchovali při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**Obr. 5.** Princip Real-Time qRT-PCR. Na ose x je počet cyklů, na ose y intenzita fluorescenčního signálu. Signál je úměrný množství amplifikovaného produktu. Zpočátku nejsou přírůstky signálu měřitelné, přestože dochází v čase k exponenciální amplifikaci DNA. Hodnota na ose x se v okamžiku, kdy se signál stane měřitelným, nazývá prahový cyklus ( $C_t$ ), který je úměrný množství počátečního templátu. Následuje exponenciální fáze, kdy množství DNA ve vzorku exponenciálně přibývá. Poslední je fáze *plateau*, v níž akumulace produktu DNA ustane v důsledku limitace množství reakčních komponent. Převzato a upraveno z VanGuilder *et al.* (2008).

### 5.5.2. Izolace RNA

Kulturu jsme vyočkovali na NA a následně kultivovali 24 hod. při  $35^{\circ}\text{C}$ . Poté jsme tři narostlé kolonie inokulovali do 5 ml LB v Erlenmayerových baňkách a kultivovali v třepací lázni 24 hod. při  $35^{\circ}\text{C}$ . Poté jsme 100  $\mu$ l této kultury přenesli do Erlenmayerovy baňky s 10 ml LB. Zaočkované médium jsme kultivovali v třepací vodní lázni, dokud optická denzita při 600 nm nedosáhla  $\sim 0,5$ . Odebraných 0,25 ml kultury jsme ředili desítkovou řadou ve fyziologickém roztoku a vzorky o koncentraci  $10^{-5}$  až  $10^{-8}$  jsme použili pro určení CFU. Za tímto účelem jsme 100  $\mu$ l naředěného vzorku rozetřeli na NA a inkubovali 24 hod. při  $30^{\circ}\text{C}$ . 0,5 ml zbylé kultury jsme smísili s 1 ml činidla RNeasy Protect Bacteria Reagent, vzniklou směs následně homogenizovali na stolní třepačce a poté inkubovali 5 min. při laboratorní teplotě. Kulturu jsme poté

centrifugovali 10 min. při 9000 ot./min. Neřaděné vzorky zbavené supernatantu jsme uchovávali při -20°C. K jednotlivým vzorkům kultury jsme přidali 200 µl TE s lysozymem a proteinázou K, homogenizovali 10 s na stolní míchačce a poté 10 min. inkubovali při laboratorní teplotě za opakované homogenizace po dobu 2 min. Po skončení inkubace jsme ke kultuře přidali 700 µl činidla RLT s β-merkapt ethanolom o koncentraci 10 µl/ml. Po následné homogenizaci na stolní míchačce jsme přidali 500 µl etanolu (96%) a důkladně resuspendovali pipetou.

Lyzát se vzniklou sraženinou jsme přenesli do 2ml mikrozkušavky, přidali 700 µl činidla RW1 a vzniklý roztok centrifugovali 15 s při 10000 ot./min. Po odstředění jsme filtrát vylili a sběrnou zkumavku jsme vyměnili za novou. Ke vzorku jsme dále přidali 500 µl roztoku činidla RPE a opětovně centrifugovali. Vzniklý filtrát jsme vylili a ke vzorku přidali 500 µl činidla RPE a následně po dobu 2 min. centrifugovali při 10000 ot./min. Poté jsme vzniklý filtrát vylili a sběrnou zkumavku vyměnili za novou. Nakonec jsme ke vzorku přidali 50 µl RNase-free H<sub>2</sub>O a po 10 min. inkubace při laboratorní teplotě jsme vzorek odstředili 1 min. při 10000 ot./min. Pro další experimenty jsme změřili koncentraci RNA a naředili ji na koncentraci 1000 mg/l.

### **5.5.3. Eliminace DNA**

K získání RNA zbavené příměsí genomové DNA jsme vzorek 1 µg izolované RNA (o koncentraci 1 g/l) smíchali se 7 µl pufru gDNA Wipeout a RNase-free H<sub>2</sub>O tak, aby výsledný objem byl 14 µl. Směs jsme homogenizovali a inkubovali 6 min. při 42°C. Vzorky jsme následně použili pro Real-time qRT-PCR.

### **5.5.4. Reverzní transkripce**

Reakční směs pro reverzní transkripci jsme si připravili smísením 1 µl roztoku Quantiscript Reverse Transcriptase, 4 µl pufru Quantiscript RT a 1 µl RT Primer Mixu. Směs jsme důkladně homogenizovali a smísili se vzorkem přečištěné RNA (5.5.2.). Reverzní transkripce probíhala 20 min. při 42°C následovaná inaktivací 3 min. při 95°C.

### **5.5.5. Kvantifikace cDNA**

Reakční směs pro kvantifikaci cDNA jsme si připravili smísením 12,5 µl QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mixu, 1 µl 25 µM primerů (adeB\_rtR a adeB\_rtF, rpoB\_rtR a rpoB\_rtF), 1 µl cDNA, případně RNA (negativní kontrola) či DNA (standardy), a 10,5 µl RNase-free H<sub>2</sub>O.



Samotná kvantifikace cDNA probíhala v 8mi jamkovém stripu za podmínek uvedených v tab. 5. Každou reakci jsme prováděli duplicitně v počtu cyklů 40.

**Tab. 5.** Podmínky Real-Time qRT-PCR pro kvantifikaci cDNA.

Fáze cyklu PCR	Teplota	Čas
Iniciální denaturace	95°C	5 min.
Denaturace	95°C	10 s
Annealing/elongace	60°C	30 s

### 5.5.6. Výpočty

Real-time qRT-PCR jsme prováděli dvěma přístupy pro získání větší přesnosti měření.

První z nich, relativní kvantifikace, umožňuje zjištění změny v expresi selektované varianty vůči mateřskému kmeni za použití referenčního provozního genu (*rpoB*) jako vnitřní kontroly. Jde o metodu, jež zohledňuje možný rozdíl mezi rychlostí (efektivitou) amplifikace u jednotlivých genů, a tedy umožňuje korekci této efektivity. Pro výpočet jsme použili vzorce podle Pfaffl (2001). Efektivitu jsme vypočítali ze směrnice přímky (3).

$$(3) \quad E = 10^{(-1/\text{směrnice})}$$

Samotný výpočet poměru exprese genu *adeB* mateřského kmene a jeho varianty jsme vypočítali podle následujícího vzorce (4),

$$(4) \quad Pf = \frac{(E_c)^{\Delta Ct_c(k-t)}}{(E_r)^{\Delta Ct_r(k-t)}}$$

kde Pf je poměr exprese genu *adeB* mateřského kmene a jeho varianty dle metody podle Pfaffl (2001), E efektivita genu, c cílový gen *adeB*, r referenční gen *rpoB*, Ct prahový cyklus, k kalibrační (mateřský) kmen a t testovaný kmen (selektovaná varianta).

Druhý přístup je založen na použití absolutní kvantifikace PCR. Pomocí programu CFX Manager™ (Bio-Rad) se vypočítá počáteční množství templátu interpolací  $C_t$  do křivky standardů. Toto počáteční množství jsme vztáhli k provoznímu genu dle následujícího vzorce (5),

$$(5) \quad P = \frac{PM_{ct} \times PM_{rk}}{PM_{rt} \times PM_{ck}}$$

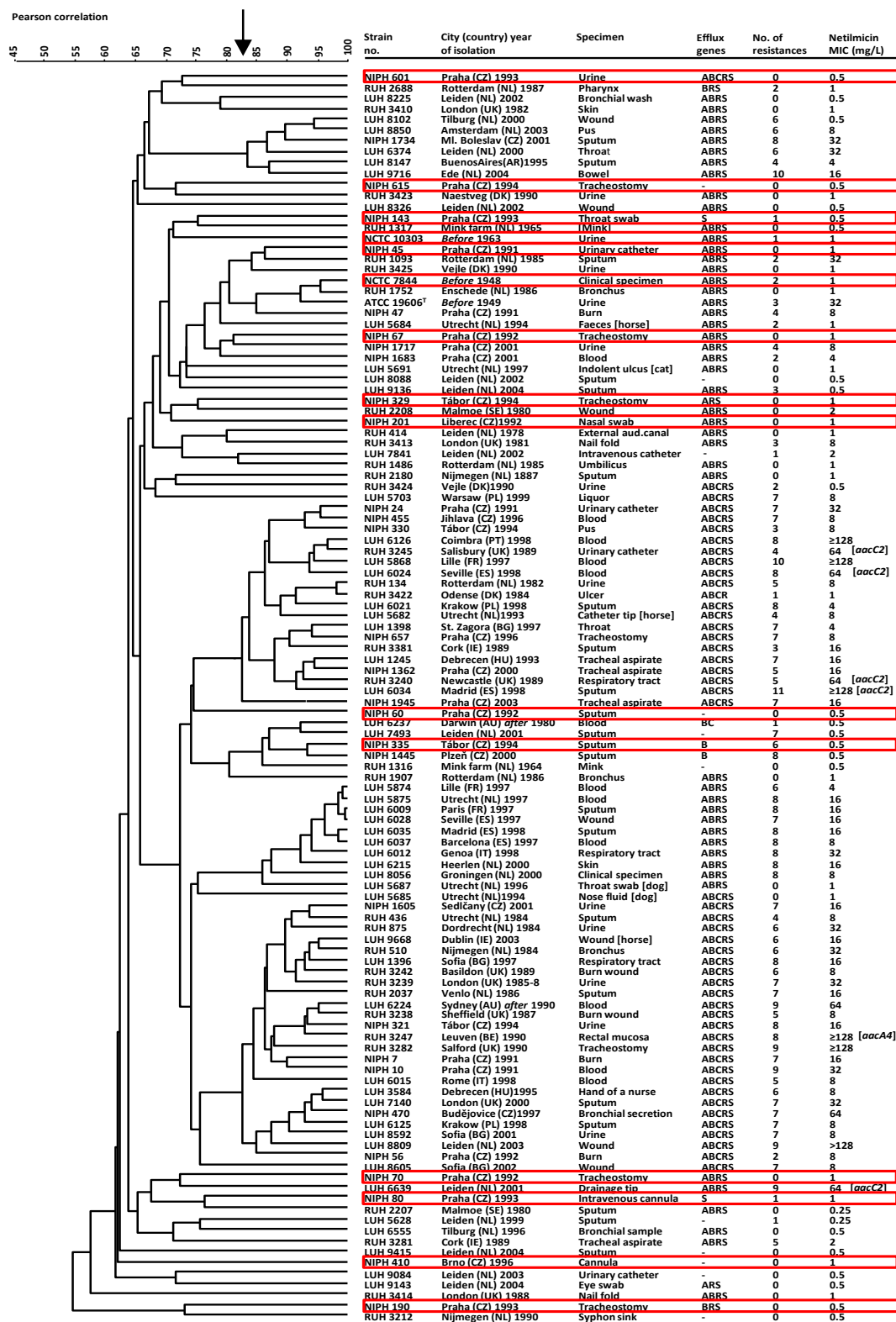
kde P je poměr exprese genu *adeB* selektované varianty vztažený k referenčnímu (provoznímu) genu, PM počáteční množství molekul, c cílový gen *adeB*, t testovaný kmen (selektovaná varianta), r referenční gen *rpoB* a k kalibrační (mateřský) kmen.

## 6. Výsledky

### 6.1. Výběr a charakterizace kmenů

První fází studie byl výběr souboru genotypově a epidemiologicky odlišných kmenů *A. baumannii* s úplně nebo částečně zachovanou citlivostí k antimikrobním látkám, jež jsou primárně účinné na tento mikroorganismus. Zdrojem těchto kmenů byla studie Nemeč *et al.* (2007) zaměřená na výskyt genů systému AdeABC u souboru genotypově a epidemiologicky precizně charakterizovaných 116 kmenů *A. baumannii*. Kritéria pro náš výběr byla následující: (1) kmeny bez zjevné nadprodukce systému AdeABC, tj. kmeny s hodnotami MIK k netilmicinu (0,5–1 mg/l) charakteristické pro přirozenou (*wild-type*) populaci *A. baumannii*; (2) kmeny s kvantitativní citlivostí ke všem nebo většině dalších antimikrobních látek odpovídající hodnotám přirozeně citlivé populace *A. baumannii*; (3) kmeny vzájemně genotypově odlišné na základě analýzy metodou AFLP (Nemeč *et al.*, 2007), tj. kmeny, jejichž podobnost podle profilů AFLP byla nižší než 83 % (obr. 6); (4) různé kombinace přítomnosti strukturních a regulačních genů systému AdeABC. Na základě těchto kritérií bylo vybráno 15 kmenů uvedených v tab. 6.

Podle údajů studie Nemeč *et al.* (2007) mělo kompletní sestavu genů pro funkční efluxový systém AdeABC (tj. *adeA*, *adeB*, *adeR* a *adeS*) celkem sedm kmenů (NIPH 45, NIPH 67, NIPH 70, NIPH 201, NIPH 601, NIPH 2165 a NIPH 2264). NIPH 601 navíc nesl gen *adeC* pro OMP. Gen *adeB* obsahovaly další dva kmeny: NIPH 335, který neobsahoval žádný další gen efluxu, a NIPH 190 s oběma regulačními geny ale s negativním výsledkem pro *adeA*. MIK pro netilmicin byla u všech kmenů v rozmezí 0,5-1 mg/l. Deset kmenů bylo plně citlivých ke všem 11 testovaným antimikrobním látkám (tab. 6), tři kmeny byly rezistentní k jednomu a jeden kmen ke dvěma z těchto látek. U těchto 14 kmenů odpovídala kvantitativní citlivost vždy hodnotám přirozeně citlivé populace *A. baumannii* pro danou antimikrobní látku (kromě uvedených rezistencí). Jediný kmen (NIPH 335) byl multirezistentní (rezistentní k šesti antibiotikům), ale MIK k netilmicinu u tohoto kmene byla 0,5 mg/l.



**Obř. 6.** Dendrogram AFLP fingerprintů 116 izolátů *A. baumannii*, který byl východiskem pro výběř kmenů pro tuto studii. Šipka označuje 83% úroveň podobnosti, na níž se kmeny rozděľují do skupin zahrnujících klonálně příbuzné kmeny. Uvedeno je místo a rok izolace, charakter a původ klinického vzorku, přítomné geny systému AdeABC, počet zjištěných rezistencí u 11 testovaných antimikrobních látek a MIK netilmicinu, za jejíž hodnotou je v případě přítomnosti genu pro enzymy modifikující netilmicin uveden název tohoto genu. Převzato z Nemeč *et al.* (2007). Červeně jsou označeny kmeny vybrané pro tuto studii. A, *adeA*; B, *adeB*; C, *adeC*; R, *adeR*; S, *adeS*; —, žádný gen nezjištěn.

**Tab. 6.** Vybrané kmeny *A. baumannii* a jejich charakterizace.

Kmen	ST	Alelický profil MLST	Místo, rok izolace	Materiál	Přítomné geny	Počet rezistencí	MIK (netilmicin)
<b>NIPH 45</b>	N.T.	N.T.	Praha, 1991	Močový katétr	ABRS	0	1
<b>NIPH 60</b>	34	9-3-2-2-5-4-14	Praha, 1992	Sputum	-	0	0,5
<b>NIPH 67</b>	35	1-2-2-2-3-1-2	Praha, 1992	Tracheostomie	ABRS	0	1
<b>NIPH 70</b>	36	3-2-2-2-7-1-2	Praha, 1992	Tracheostomie	ABRS	0	1
<b>NIPH 80</b>	37	3-2-15-6-6-4-5	Praha, 1993	Intravenózní kanyla	S	1	1
<b>NIPH 143</b>	N.T.	N.T.	Praha, 1993	Krční výtěr	S	1	0,5
<b>NIPH 190</b>	9	3-1-5-3-6-1-3	Praha, 1993	Tracheostomie	BRS	0	0,5
<b>NIPH 201</b>	38	10-4-3-2-13-1-2	Liberec, 1992	Nosní výtěr	ABRS	0	1
<b>NIPH 329</b>	11	1-2-6-2-3-4-4	Tábor, 1994	Tracheostomie	ABRS*	0	1
<b>NIPH 335</b>	10	1-3-2-1-4-4-4	Tábor, 1994	Sputum	B	6	0,5
<b>NIPH 410</b>	39	1-2-2-2-5-1-14	Brno, 1996	Kanyla	-	0	1
<b>NIPH 601</b>	40	1-1-2-2-12-1-5	Praha, 1993	Moč	ABCRS	0	0,5
<b>NIPH 615</b>	12	3-5-7-1-7-2-6	Praha, 1994	Tracheostomie	-	0	0,5
<b>NIPH 2165</b>	52	3-2-2-7-9-1-5	před r. 1948	Klinický vzorek	ABRS	2	1
<b>NIPH 2264</b>	54	12-3-18-2-17-4-5	před r. 1963	Moč	ABRS	1	1

**Vysvětlivky:** Skvenční typ (ST) a odpovídající alelický profil jsou založeny na multilokusové sekvenční typizaci (MLST, z angl. *multilocus sequence typing*) podle sedmi provozních genů (Diancourt *et al.*, 2010). Ostatní údaje jsou převzaty z Nemeč *et al.* (2007). Testované antimikrobní látky byly: amikacin, ampicilin+sulbaktam, ceftazidim, imipenem, kotrimoxazol (sulfamethoxazol+trimethoprim), netilmicin, ofloxacin, piperacilin, tetracyclin a tobramycin. N.T., netestováno; \*, přítomnost genu *adeB* u kmene NIPH 329 byla prokázána v této studii pomocí nové dvojice primerů (kapitola 6.6).

## 6.2. Selekce variant rezistentních na netilmicin

Pro selekci variant s předpokládanou nadprodukcí systému AdeABC jsme zvolili netilmicin. Aminoglykozidy netilmicin a gentamicin jsou substráty, jež AdeABC exportuje s největší efektivitou (Magnet *et al.*, 2001). Výhodou netilmicinu oproti gentamicinu (a většině dalších substrátů systému jako např. fluorochinolonů) je skutečnost, že enzymatické modifikace netilmicinu jsou oproti gentamicinu vzácné a výskyt dalších mechanismů (tj. jiných než nadprodukce AdeABC nebo chemická modifikace) je velmi nepravděpodobný (Nemec *et al.*, 2004; 2007).

Při selekci jsme postupovali podle metodiky uvedené v odstavci 5.1. Na obr. 7 je tento postup znázorněn na příkladu kmene NIPH 45, který nese kompletní sestavu genů pro funkční systém AdeABC a jehož výchozí MIK k netilmicinu byla 1 mg/l. Kultura každého z kmenů byly vyseta na řadu ploten s MHA obsahující koncentrace netilmicinu 0,5, 1, 2, 4, 8 a 16 mg/l. Po inkubaci jsme u každého kmene vybrali 4 až 10 kolonií narostlých v miskách s nejvyššími koncentracemi antibiotika s tím, že pokud se kolonie na téže misce významně lišily velikostí, izolovali jsme zástupce těchto morfologických variant (velikost kolonií může odrážet různou míru exprese efluxového systému). Podrobnou informaci o výsledcích selekce shrnuje tab. 7 a konečný výběr selektovaných variant je uveden v tab. 8.

Jak uvádí tab. 8, pro další experimenty byly pro každý kmen vybrány dvě selektované varianty s nejvyššími hodnotami MIK k netilmicinu a to na základě vyšetření antimikrobní citlivosti a genotypizace všech izolovaných subkultur (výsledky neuvedeny). Tyto varianty byly získány z ploten s koncentracemi netilmicinu v rozmezí 4-8 mg/l. Citlivost u ostatních variant získaných od téhož donorového kmene se od vybraných variant lišila nevýznamně a u variant izolovaných z půd o koncentraci netilmicinu 4 mg/l a nižší obvykle nedocházelo k výraznému snížení citlivosti.

**Tab. 7.** Výsledky selekce variant na netilmicinu a CFU.

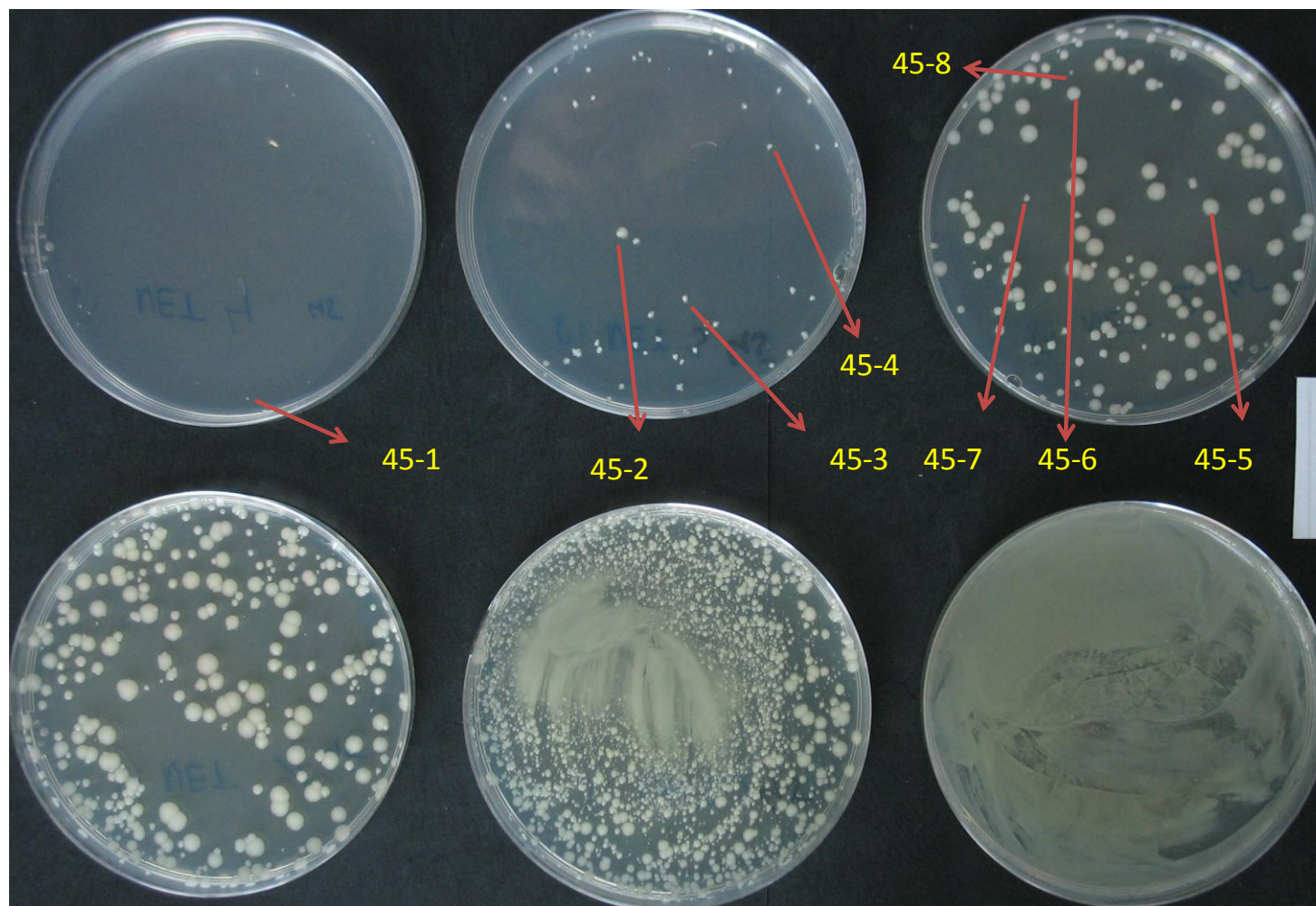
	Selektované varianty				Frekvence		
	CFU	4 mg/l	8 mg/l	16 mg/l	4 mg/l	8 mg/l	16 mg/l
<b>NIPH 45</b>	$2,8 \times 10^9$	90V +31M	1V+42S+1M	15M	$3,2 \times 10^{-8}$ (V) + $1,1 \times 10^{-8}$ (M)	$3,6 \times 10^{-10}$ (V) + $1,5 \times 10^{-8}$ (S) + $3,6 \times 10^{-10}$ (M)	$5,4 \times 10^{-9}$ (M)
<b>NIPH 60</b>	$1,3 \times 10^9$	nepočitatelné	3V+130M	1V	-	$2,3 \times 10^{-9}$ (V) + $10 \times 10^{-7}$ (M)	$7,7 \times 10^{-10}$ (V)
<b>NIPH 67</b>	$1,0 \times 10^8$	55V	1V+12M	2V	$5,5 \times 10^{-7}$ (V)	$10 \times 10^{-8}$ (V) + $1,2 \times 10^{-7}$ (M)	$2 \times 10^{-8}$ (V)
<b>NIPH 70</b>	$6,0 \times 10^9$	nepočitatelné	14V+27M+drť	7S	-	$2,3 \times 10^{-9}$ (V) + $4,5 \times 10^{-9}$ (M)	$1,2 \times 10^{-9}$ (S)
<b>NIPH 80</b>	$3,8 \times 10^9$	nepočitatelné	8V+40S+150M	0	-	$2,1^{-9}$ (V) + $1,1 \times 10^{-8}$ (S) + $3,9 \times 10^{-8}$ (S)	0
<b>NIPH 143</b>	$1,4 \times 10^9$	332	1	0	$2,4 \times 10^{-7}$ (V)	$7,1 \times 10^{-10}$	0
<b>NIPH 190</b>	$2,6 \times 10^9$	60V+100 M	1	0	$2,3 \times 10^{-8}$ (V) + $3,8 \times 10^{-8}$ (M)	$3,8 \times 10^{-10}$	0
<b>NIPH 201</b>	$1,1 \times 10^9$	18V+130M	18V+120M	1	$1,6 \times 10^{-8}$ (V) + $1,2 \times 10^{-7}$ (M)	$1,6 \times 10^{-8}$ (V) + $1,1 \times 10^{-7}$ (M)	$9,1 \times 10^{-10}$
<b>NIPH 329</b>	$1,7 \times 10^9$	7V+120M	6V+24M	0	$4,1 \times 10^{-9}$ (V) + $7,1 \times 10^{-8}$ (M)	$3,5 \times 10^{-9}$ (V) + $1,4 \times 10^{-8}$ (M)	0
<b>NIPH 335</b>	$5,0 \times 10^9$	8V+100M	3	0	$1,6 \times 10^{-9}$ (V) + $2 \times 10^{-8}$ (M)	$6,00 \times 10^{-10}$	0
<b>NIPH 410</b>	$2,0 \times 10^8$	74	4	0	$3,70 \times 10^{-7}$	$2,00 \times 10^{-8}$	0
<b>NIPH 601</b>	$1,0 \times 10^8$	50V+14M	4	0	$5 \times 10^{-7}$ (V) + $1,4 \times 10^{-7}$ (M)	$4,00 \times 10^{-08}$	0
<b>NIPH 615</b>	$2,0 \times 10^8$	150	1V+8M	0	$7,50 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-9}$ (V) + $4 \times 10^{-8}$ (M)	0
<b>NIPH 2165</b>	$2,7 \times 10^9$	150V+10M	20V+100M	16	$5,6 \times 10^{-8}$ (V) + $3,7 \times 10^{-9}$ (M)	$7,4 \times 10^{-9}$ (V) + $3,7 \times 10^{-8}$ (M)	$5,90 \times 10^{-9}$
<b>NIPH 2264</b>	$6,0 \times 10^8$	80V+50M	86	0	$1,5 \times 10^{-7}$ (V) + $9,1 \times 10^{-8}$ (M)	$1,60 \times 10^{-7}$	0

**Vysvětlivky:** CFU je vztaženo na objem inokula (200 µl) vyšetěho na miskú. Selektované varianty – počet vzniklých kolonií na miskách s koncentrací netilmicinu 4, 8 a 16 mg/l. Frekvence – vypočítaná frekvence vzniku kolonií na miskách o koncentraci netilmicinu 4, 8 a 16 mg/l. Velikost kolonií velké (V), střední (S) a malé (M).

**Tab. 8.** Výběr izolovaných variant.

Izolát	Koncentrace netilmicinu (mg/l)	Původní velikost kolonie	Izolát	Koncentrace netilmicinu (mg/l)	Původní velikost kolonie
NIPH 45-2	8	V	NIPH 45-3	8	S
NIPH 60-2	8	V	NIPH 60-3	8	M
NIPH 67-1	16	V	NIPH 67-3	8	M
NIPH 70-1	16	V	NIPH 70-4	8	V
NIPH 80-1	8	V	NIPH 80-3	8	M
NIPH 143-1	8	-	NIPH 143-2	4	V
NIPH 190-1	8	-	NIPH 190-2	4	S
NIPH 201-1	16	-	NIPH 201-4	8	M
NIPH 329-1	8	V	NIPH 329-2	8	V
NIPH 335-1	8	-	NIPH 335-2	4	V
NIPH 410-1	8	M	NIPH 410-2	4	M
NIPH 601-1	8	-	NIPH 601-2	4	V
NIPH 615-1	8	V	NIPH 615-2	8	M
NIPH 2165-2	16	M	NIPH 2165-3	8	V
NIPH 2264-1	8	-	NIPH 2264-3	4	M

**Vysvětlivky:** M, malá kolonie; V, velká kolonie; S, středně velká kolonie, -, kolonie shodné velikosti.



**Obr. 7.** Selektce kmene NIPH 45 na plotnách MHA s netilmicinem a izolace rezistentních kolonií. Koncentrace netilmicinu na miskách: nahoře z levé strany: 16 mg/l, 8 mg/l, 4 mg/l; dole z levé strany: 2 mg/l, 1 mg/l, 0,5 mg/l. Zaočkované plotny byly inkubovány 48 hod. při 35°C.



### 6.3. Antimikrobní citlivost donorových kmenů a z nich odvozených variant

Citlivost kmenů a vybraných variant na antimikrobní látky jsme vyšetřili diskovým difuzním testem (17 látek uvedených v tab. 2), agarovým dilučním testem (netilmicin) a Etestem (netilmicin a tobramycin). Cílem tohoto kroku bylo posoudit změnu citlivosti u selektovaných variant oproti původním (donorovým) kulturám kmenů s ohledem na předpokládané preferované substráty pro AdeABC.

Výsledky vyšetření citlivosti uvádí tab. 9, v níž jsou vyznačeny hodnoty citlivosti, jež překračují hranice pro sníženou citlivost až rezistenci uvedené v tab. 2. Téměř všechny mateřské kmeny (14) byly rezistentní na cefotaxim, jenž má obecně malou primární účinnost na *A. baumannii*. Podle výsledků diskového difuzního testu byly u kmenů s plnou funkční sestavou genů pro AdeABC izolovány varianty s novou rezistencí až pro 8 antimikrobních látek (NIPH 67-1). Na jednu izolovanou variantu u těchto kmenů v průměru připadalo 3,5 nové rezistence. U kmenů bez kompletní funkční sestavy genů pro AdeABC vznikly maximálně 4 nové rezistence (NIPH 80-3). Průměrně u těchto kmenů vzniklo 1,6 nových rezistencí na izolovanou variantu.

U 16 selektovaných variant kmenů obsahujících funkčně kompletní systém AdeABC vznikly nové rezistence zejména na netilmicin (14), trimethoprim (12), gentamicin (6), cefepim (6) a tigecyklin (7), tedy na typické substráty systému. U 17 selektovaných variant kmenů neobsahujících systém AdeABC vznikly nové rezistence nejčastěji na trimethoprim (10) a netilmicin (5), což ukazuje na jinou příčinu vzniklé rezistence. Varianty získané z těchto kmenů měly v případě vzniklých rezistencí kvantitativně vyšší hodnoty citlivosti ve srovnání s kmeny s kompletní sestavou systému AdeABC.

Výsledky různých testů pro netilmicin byly v celkové shodě. V souladu s publikovanými údaji jde většina rozdílů na vrub nižších hodnot MIK v Etestu (oproti dilučnímu agarovému testu).

**Tab. 9.** Citlivost původních a selektovaných variant.

Kmen	Geny*	AK	FEP	CTX	CAZ	CIP	DO	CN	K	NA	NET	OFX	PRL	RL	TE	TGC	TOB	W	MIK NET	Etest NET	Etest TOB	Selekcce**
NIPH 45	ABRS	24	27	19	24	32	31	23	25	25	25	30	26	6-22	22	21	22	15	1	1	1	
NIPH 45-2		23	23	19	23	25	27	18	21	22	11	27	24	25	21	19	19	12	32	32	1	V, 8
NIPH 45-3		21	22	18	20	26	25	19	21	20	15-18	26	21	20	18	18	18	11	8	8	1	S, 8
NIPH 60	-	21	24	19	25	33	31	23	23	27	23	29	23	23	22	21	21	18	1	1	1	
NIPH 60-2		21	25	19	22	29	26	18	21	24	16	27	22	24	21	20	19	15	32	8	0,25	V, 8
NIPH 60-3		21	23	18	22	29	27	18	20	23	16	27	24	24	21	19	17	14	8	4	2	M, 8
NIPH 67	ABRS	22	21	15	21	26	28	20	22	21	22	29	21	24	20	19	20	15	1	1	1	
NIPH 67-1		17	11	15	17	18	13	12	17	15	11	21	20	17	15	14	15	6	32	32	4	V, 16
NIPH 67-3		21	21	15	21	25	24	19	20	21	15-18	26	20	22	19	18	19	11	16	8	2	M, 8
NIPH 70	ABRS	21	22	18	24	29	30	20	21	26	21	28	23	26	21	20	20	17	1	2	1	
NIPH 70-1		17	16	19	22	21	24	14	19	22	13	24	25	24	17	16	15	10	32	16	2	V, 16
NIPH 70-4		17	16	19	22	23	24	14	20	20	13	22	22	24	17	15	16	11	16	16	2	V, 8
NIPH 80	S	21	22	14	22	27	24	20	22	20	22	25	22	6	20	19	19	17	1	1	1	
NIPH 80-1		20	21	15	20	23	24	19	21	18	13	22	21	6	17	18	18	10	32	8	1	V, 8
NIPH 80-3		16	23	17	22	28	27	13-16	19	20	9-14	26	22	6	20	19	16	6	64	8	2	V, 4
NIPH 143	S	21	24	14	20	27	18	21	22	18	22	26	22	23	6-13	17	20	9-15	1	1	1	
NIPH 143-1		22	21	13	20	26	17	19	21	20	16-19	25	20	22	6-13	17	19	8	16	4	0,5	8
NIPH 143-2		22	19	12	19	22	16	19	23	14	17	22	19	22	6-13	16	20	9	8	4	-	V, 4
NIPH 190	BRS	23	27	23	26	32	30	23	25	29	24	30	28	23	23	22	21	17	1	1	0,25	
NIPH 190-1		23	28	22	24	28	26	20	23	26	17	28	26	23	21	21	20	14	8	4	1	8
NIPH 190-2		20	26	22	24	30	28	18	20	27	18	30	25	22	22	21	19	13	8	2-3	-	S, 4
NIPH 201	ABRS	23	26	19	24	31	29	22	24	25	22	29	24	31	24	21	21	10-23	1	0,5	1	
NIPH 201-1		19	15	19	20	22	24	15	21	20	14	24	23	26	17	15	16	13	16	8	1	16
NIPH 201-4		21	24	19	22	28	28	18	20	23	14	28	22	27	22	22	18	15	32	8	2	M, 8
NIPH 329	ABRS	21	25	16	22	31	27	20	21	24	22	29	22	30	22	20	20	19	1	1	2	
NIPH 329-1		16	14	19	19	22	22	11	18	17	12	23	21	22	15	14	15	11	16	16	2	V, 8
NIPH 329-3		21	23	18	21	26	25	20	21	22	17	25	21	21	19	19	19	12	16	4	-	M, 8

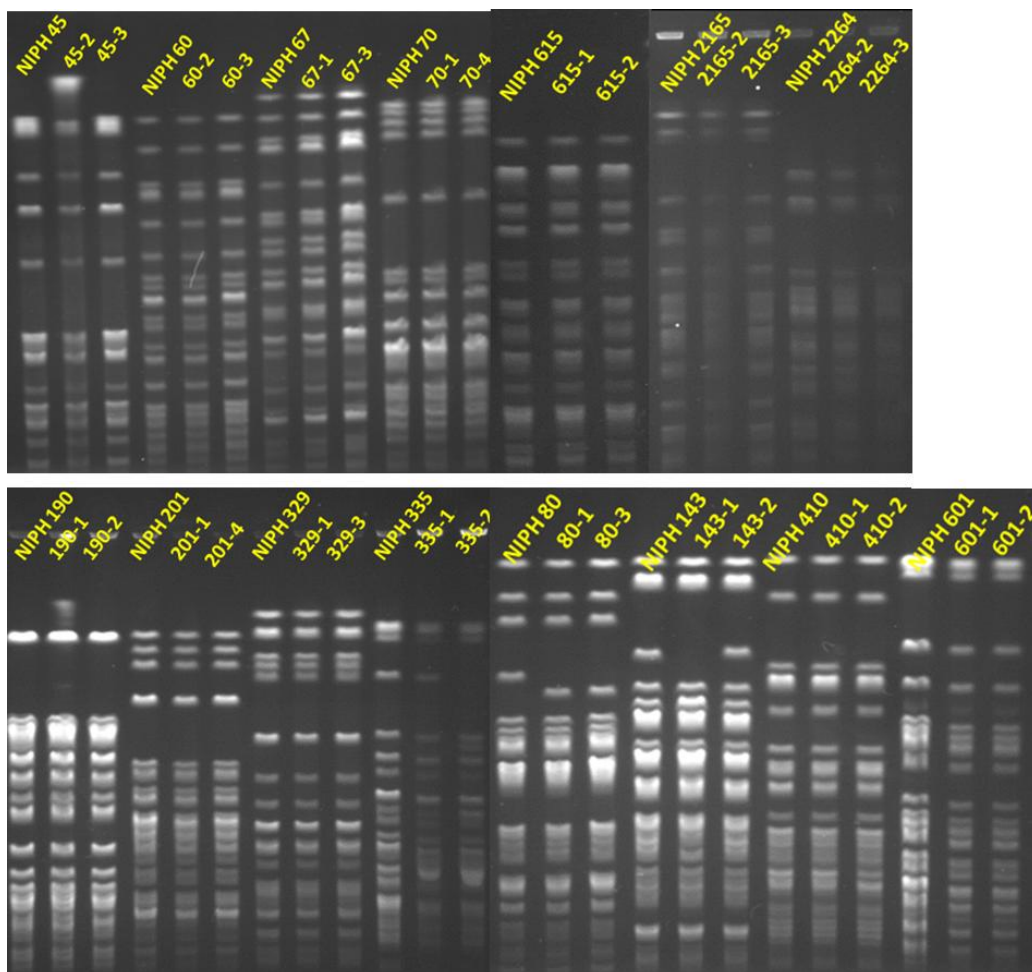
Tab. 9 – pokračování.

Kmen	Geny*	AK	FEP	CTX	CAZ	CIP	DO	CN	K	NA	NET	OFX	PRL	RL	TE	TGC	TOB	W	MIK NET	Etest NET	Etest TOB	Selekce**
NIPH 335	B	23	18	15	21	6	19	9	12	6	24	9	21	6	12	18	10	6-13	1	1	32	
NIPH 335-1		24	24	18	22	6	23	6	6	6	19	7	21	6	18	19	6	10	4	8	128	8
NIPH 335-2		23	22	16	21	6	23	6	6	6	18	7	21	6	18	18	6	9	4	4	-	V, 4
NIPH 410	-	23	27	22	25	34	29	22	23	26	23	31	27	28	22	21	21	15-20	1	1	1	
NIPH 410-1		20	24	21	23	29	26	18	21	23	19	26	23	20	23	21	19	10	4	2	1	M, 8
NIPH 410-2		21	24	22	22	28	26	19	22	22	20	26	23	21	23	21	19	10	4	2	-	M, 4
NIPH 601	ABCRS	23	29	22	27	32	30	22	23	27	24	32	27	29	24	22	21	18	1	1	1	
NIPH 601-1		19	25	19	23	27	29	17	20	24	17	27	22	25	22	21	17	12	16	4	0,5	8
NIPH 601-2		21	25	21	22	29	27	19	21	23	18	27	23	25	21	20	18	12-14	4	4	2	V, 4
NIPH 615	-	24	26	22	26	31	30	23	24	27	23	31	28	9-23	24	21	22	19	1	1	1	
NIPH 615-1		19	24	21	22	28	27	16	19	24	15	27	24	24	22	21	18	14	8	4	1	V, 8
NIPH 615-2		22	28	24	25	31	34	17	21	27	15	34	25	24	29	25	18	15	16	4	1	M, 8
NIPH 2165	ABRS	21	23	6-9	19	29	29	21	23	22	22	28	12	6	22	21	19	19	1	1	1	
NIPH 2165-2		17	15	13	18	23	25	12	19	20	12	22	14	6	19	17	15	11	32	16	2	M, 16
NIPH 2165-3		18	18	12	19	24	25	13	21	20	14	23	15	6	20	18	17	10	16	16	0,5	V, 8
NIPH 2264	ABRS	22	23	14	23	28	30	23	24	26	24	28	22	6	23	21	21	15-21	1	1	1	
NIPH 2264-1		21	20-26	16-19	22	29	30	18	20	27	15	28	20	6	23	22	18	6-11	16	4	-	8
NIPH 2264-3		22	20-29	15-20	25	30	40	18	23	28	11-14	36	20	6	32	32	21	6	16	-	-	V, 4

**Vysvětlivky:** Výsledky citlivosti diskového difuzního testu jsou uvedeny v mm průměru inhibiční zóny, hodnoty MIK pro agarový diluční test (MIK NET, netilmicin) a Etest (Etest NET, netilmicin ; Etest TOB, tobramycin) v mg/l. Zvýrazněny jsou hodnoty citlivosti v oblasti rezistence resp. snížené citlivosti (viz. tab. 2). Zkratky antimikrobních látek: AK, amikacin; FEP, cefepim; CTX, cefotaxim; CAZ, ceftazidim; CIP, ciprofloxacin; DO, doxycyklin; CN, gentamicin; K, kanamycin; NA, nalidixová kyselina; NET, netilmicin; OFX, ofloxacin; PRL, piperacilin; RL, sulfametoxazol; TE, tetracyklin; TGC, tigecyklin; TOB, tobramycin; W, trimethoprim. Velikost selekované kolonie velká (V), střední (S), malá (M). \*, přítomnost genů systému AdeABC: A, *adeA*; B, *adeB*; C, *adeC*; R, *adeR*; S, *adeS*. \*\*, M, malá kolonie; V, velká kolonie; S, středně velká kolonie.

#### 6.4. Genotypizace donorových kmenů a z nich odvozených variant

Cílem tohoto kroku bylo ověřit, že selektované varianty byly skutečně získány z daného donorového kmene a že tudíž pracujeme s izogenními liniemi izolátů (a nikoliv s kontaminací). K tomu účelu jsme použili makrorestrikční analýzu genomové DNA pomocí *Apal* spojenou se separací vzniklých fragmentů DNA v pulzním elektrickém poli (kapitola 5.3.). Tato metoda umožňuje velmi citlivé rozlišení genotypově neidentických izolátů *A. baumannii* (Nemec *et al.*, 2008). Využili jsme přitom zároveň fakt, že všechny vybrané kmeny se navzájem výrazně genotypově lišily (kapitola 6.1).



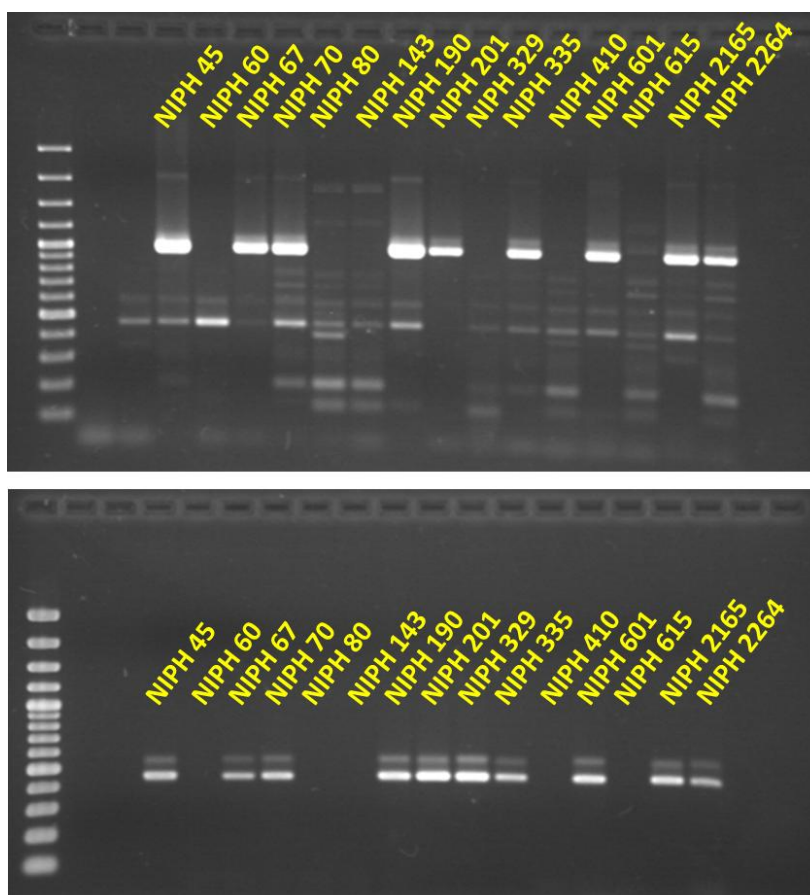
**Obr. 8.** Makrorestrikční analýza genomové DNA donorových kmenů a z nich selektovaných variant. Restrikční štěpení bylo provedeno enzymem *Apal* a elektroforetická separace metodou PFGE.

Na obr. 8 jsou zobrazeny výsledky makrorestrikční analýzy pro všech 15 donorových kmenů a 30 z nich odvozených variant (tab. 8). Výsledky jednoznačně potvrdily, že ve všech případech jde o izogenní izoláty. Variace v poloze jednoho restrikčního fragmentu zjištěné u

variant kmenů NIPH 80 a NIPH 143 nelze považovat z tohoto hlediska za významné, neboť podobné rozdíly se v izogenních populacích některých kmenů *A. baumannii* objevují. Tyto výsledky zároveň potvrdily vzájemnou genotypovou odlišnost všech donorových kmenů.

### 6.5. Průkaz genu *adeB* pomocí PCR s novou sestavou primerů

Důvodem pro tento krok byl známý fakt, že negativní výsledek PCR nemusí vždy znamenat nepřítomnost sledovaného genu a to především z důvodu neočekávaného polymorfizmu v cílových sekvencích pro primery. To platí zvláště v případech, kdy se studuje geneticky heterogenní populace kmenů a sledovaný gen je chromozomální a sekvenčně polymorfní jako je tomu v případě *adeB* (Huys *et al.*, 2005a).



**Obr. 9.** Srovnání dvou setů primerů pro gen *adeB* pomocí konvenční PCR. V horní části jsou výsledky amplifikace pomocí primerů O3 a O4 (Magnet *et al.*, 2001), v dolní části výsledky získané pomocí nové sestavy primerů *adeB*\_rtR a *adeB*\_rtF (Higgins *et al.*, 2004).

Pro detekci genu *adeB* jsme použili konvenční PCR (kapitola 5.4) se dvěma různými sestavami primerů (kapitola 4.6). Jak znázorňuje obr. 9, výsledky detekce *adeB* byly v obou případech shodné s výjimkou kmene NIPH 329, u něhož nové primery (*adeB*\_rtR a *adeB*\_rtF)

poskytly oproti primerům O3 a O4 použitým ve studii Nemeč *et al.* (2007) pozitivní výsledek. Dostupnost celogenomové sekvence kmene NIPH 329 (přístupové číslo sekvence v databázi NCBI je APQY00000000) nám umožnila prověřit tento rozdílný výsledek pomocí analýzy *in silico*. Pomocí známé sekvence *adeB* u *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup> (přístupové číslo JN646777) a prohledávacího algoritmu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) jsme v genomu NIPH 329 našli intaktní gen *adeB*. Výsledek detekční PCR pro *adeB* pomocí primerů O3 a O4 byl tak falešně negativní.

## 6.6. Exprese genu *adeB*

Cílem této části bylo pomocí Real-Time qRT-PCR kvantifikovat změnu exprese transportérového genu *adeB* na transkripční úrovni u variant selektovaných z donorových kmenů s plnou sestavou genů pro funkční systém AdeABC.

V experimentu jsme použili sedm donorových kmenů (NIPH 45, NIPH 67, NIPH 70, NIPH 201, NIPH 601, NIPH 2165 a NIPH 2264) a po jedné rezistentní variantě od každého z nich. Real-Time qRT-PCR jsme prováděli dvěma přístupy pro získání co největší přesnosti (kapitola 5.7.6). Tab. 10 shrnuje výsledky měření exprese získané ze dvou amplifikačních reakcí referenčního genu *rpoB* a transportérového genu *adeB* potřebné pro výpočet poměru exprese genu mateřského kmene a jeho varianty oběma metodami.

Zvýšení exprese genu *adeB* selektované varianty oproti donorovému kmeni bylo v rozmezí 0,3-88 násobku. Pro pět dvojic byla tato hodnota v rozmezí 29-88, což je v souladu s předpokladem nadprodukce systému AdeABC u testovaných variant. Ve všech těchto případech došlo k výraznému kvantitativnímu snížení citlivosti k látkám, jež jsou známými substráty systému AdeABC (aminoglykozidy, fluoroquinolony, trimethoprim, tetracykliny a tigecyklin). U NIPH 2264/2264-3 bylo zjištěno pouze trojnásobné zvýšení exprese, což je obtížně interpretovatelná hodnota s ohledem na možnou nadprodukcí systému vedoucí k fenotypové rezistenci. Nutno však uvést, že profil změny citlivosti u NIPH 2264-3 plně neodpovídá očekávanému fenotypu (např. chybí snížení citlivosti k fluoroquinolonům). U dvojici NIPH 601/601-1 nebylo zjištěno žádné zvýšení exprese a příčina získané snížené citlivosti NIPH 601-1 k netilmicinu tak zůstává neznámá. I v tomto případě byl kvantitativní posun hodnot citlivosti vůči donorovému kmenu poměrně nevýrazný.

**Tab. 10.** Výsledky Real-Time qRT-PCR.

Izolát	gen <i>adeB</i>			gen <i>rpoB</i>			Pf	P	Relativní exprese <i>adeB</i>
	Efektivita amplifikace	Průměr C <sub>t</sub>	Průměr PM	Efektivita amplifikace	Průměr C <sub>t</sub>	Průměr PM			
<b>NIPH 45</b>	1,808	28,57	1,11×10 <sup>4</sup>	1,827	18,22	4,50×10 <sup>6</sup>	29	29,61	<b>29</b>
<b>NIPH 45-2</b>	1,808	22,35	4,55×10 <sup>5</sup>	1,827	17,68	6,23×10 <sup>6</sup>			
NIPH 67	1,808	29,57	1,050×10 <sup>4</sup>	1,820	20,42	1,11×10 <sup>6</sup>	76	69,59	73
NIPH 67-1	1,808	22,91	4,970×10 <sup>5</sup>	1,820	21,06	7,55×10 <sup>5</sup>			
NIPH 70	1,808	26,61	3,590×10 <sup>4</sup>	1,827	17,61	6,51×10 <sup>6</sup>	46	46,95	46
NIPH 70-1	1,808	21,50	7,560×10 <sup>5</sup>	1,827	18,94	2,92×10 <sup>6</sup>			
NIPH 201	1,808	27,89	2,680×10 <sup>4</sup>	1,820	19,46	2,00×10 <sup>6</sup>	46	44,26	45
NIPH 201-1	1,808	20,64	1,880×10 <sup>6</sup>	1,820	18,67	3,1×10 <sup>6</sup>			
NIPH 601	1,808	28,68	1,040×10 <sup>4</sup>	1,827	21,90	4,95×10 <sup>5</sup>	0,3	0,28	0
NIPH 601-1	1,808	29,54	6,240×10 <sup>3</sup>	1,827	20,61	1,07×10 <sup>6</sup>			
NIPH 2165	1,808	33,65	5,450×10 <sup>2</sup>	1,827	25,58	5,38×10 <sup>4</sup>	88	91,30	90
NIPH 2165-2	1,808	23,76	1,970×10 <sup>5</sup>	1,827	23,29	2,13×10 <sup>5</sup>			
NIPH 2264	1,808	27,54	3,290×10 <sup>4</sup>	1,820	20,33	1,17×10 <sup>6</sup>	3	2,86	3
NIPH 2264-3	1,808	24,75	1,690×10 <sup>5</sup>	1,820	19,35	2,10×10 <sup>6</sup>			

**Vysvětlivky:** Průměr C<sub>t</sub>, průměr prahového cyklu; Průměr PM, průměr počátečního množství vzorku (molekul cDNA/ml); Pf, poměr exprese genu *adeB* mateřského kmene a jeho varianty podle metody Pfaffli; P, poměr exprese genu *adeB* selektované varianty vztažený k referenčnímu genu *rpoB*.

## 7. Diskuze

Z dosud publikovaných studií plyne, že systém AdeABC *A. baumannii* disponuje širokým substrátovým spektrem a může hrát významnou roli při vzniku rezistence u tohoto významného nemocničního patogena. Tyto studie se však vesměs zaměřily na již multirezistentní izoláty a jejich interpretace, s výjimkou primárních studií Magnet *et al.* (2001) a Marchand *et al.* (2004), spočívaly hlavně na posouzení vazby mezi mírou rezistence k určitým antibiotikům a přítomností genů systému AdeABC nebo mírou jejich exprese. Oproti tomu jsme se v naší práci pokusili posoudit roli AdeABC při vzniku rezistence nebo snížené citlivosti u vesměs primárně plně citlivých kmenů *A. baumannii*. Vyšli jsme z předpokladu, že pokud citlivý kmen nese kompletní sestavu genů potřebnou pro funkční systém AdeABC, lze z něj v přítomnosti antimikrobní látky, jež je zároveň substrátem systému AdeABC, selektovat rezistentní varianty (pravděpodobně obsahující mutace v regulačních genech systému).

Východiskem naší práce byl taxonomicky a epidemiologicky precizně definovaný soubor 15 klinických izolátů, jež byly jasně odlišné na kmenové úrovni a pro něž byla k dispozici informace o přítomnosti resp. nepřítomnosti genů systému AdeABC i míře citlivosti ke spektru antimikrobních látek. K selekci variant z těchto kmenů jsme zvolili netilmicin, jenž je jedním z nejlepších známých substrátů systému AdeABC (Magnet *et al.*, 2001) a pro nějž jsou jiné mechanismy rezistence (včetně modifikujících enzymů) vzácné (Nemec *et al.*, 2007). Vybrané kmeny jsme vystavili selekci v prostředí netilmicinu a získané rezistentní varianty studovali pomocí škály mikrobiologických technik s cílem posoudit možnou roli nadměrné exprese AdeABC pro vznik rezistence. Tyto metody zahrnovaly též porovnání donorových kmenů a z nich odvozených variant s ohledem na kvantitativní hodnoty jejich citlivosti k řadě antimikrobních látek lišících se svojí afinitou k systému AdeABC a posouzení změn exprese transportérového genu *adeB* u vybraných izogenních párů.

Předpokládali jsme, že kmeny obsahující geny pro funkční systém AdeABC, budou vytvářet varianty rezistentní k netilmicinu s vyšší frekvencí a že fenotyp citlivosti těchto variant bude odpovídat známému substrátovému spektru systému AdeABC. Předpoklad výhody přítomnosti systému AdeABC se celkově potvrdil, jak ukazují rozdíly ve frekvencích vzniku rezistentních variant u kmenů nesoucích funkční sestavu genů efluxu a kmenů s neúplnou sestavou těchto genů. Při selekci v prostředí netilmicinu 4 a 8 mg/l byla frekvence variant vyšší než  $10^{-8}$  u většiny kmenů se kompletním genotypem AdeABC a oproti kmenům bez komplet-



ního systému AdeABC (tab. 7). Podobně v prostředí netilmicinu 16 mg/l většina kmenů s kompletním efluxovým genotypem vytvářela rezistentní varianty na rozdíl od kmenů s nekompletním genotypem AdeABC. Z tohoto shrnutí plyne, že se i když při selekci pravděpodobně uplatňují různé mechanismy, přítomnost funkčního systému AdeABC je asociována se zjevnou selekční výhodou.

Potvrdil se i předpoklad, že kmeny obsahující geny pro funkční systém AdeABC budou při selekci netilmicinem generovat varianty s kvalitativně i kvantitativně vyšší rezistencí k antimikrobním látkám, jež jsou známými substráty systému AdeABC. Nově vzniklé rezistence se převážně týkaly aminoglykozidů, trimethoprimu, fluorochonolonů, tetracyklinů a tigecyklinu, což plně odpovídá substrátovému spektru systému AdeABC (Magnet et al., 2001). K cefotaximu byly rezistentní téměř všechny mateřské kmeny pravděpodobně z důvodu přirozené rezistence *A. baumannii* díky produkci chromozomální cefalosporinázy typu AmpC, jejíž aktivita byla zjištěna v 98 % kmenů tohoto druhu (Vila et al., 1993).

Pomocí metody Real-Time qRT-PCR jsme se pokusili určit rozdíly v expresi donorových kmenů a z nich odvozených variant u sedmi kmenů obsahujících kompletní sestavu genů pro funkční AdeABC. Předpokládali jsme výraznější zvýšení exprese transportérového genu *adeB* u variant s vyšším kvantitativním posunem v citlivosti k netilmicinu a současně sníženou citlivostí ke známým substrátům systému AdeABC. I tento předpoklad se do značné míry potvrdil. Hodnoty relativní exprese byly průkazně zvýšeny u pěti ze sedmi dvojic donorového kmene a z něj odvozené varianty a ve všech těchto případech byly v souladu s mírou snížení citlivosti k netilmicinu a dalším substrátům systému AdeABC. Oproti tomu u dvou zbývajících dvojic nebylo průkazné zvýšení exprese prokázáno, nicméně ani v jednom z těchto případů neodpovídal selektovaný fenotyp očekávanému profilu asociovanému s nadprodukcí AdeABC.

Navzdory tomu, že naše výsledky jsou celkově v souladu s předpokládanou rolí AdeABC při vzniku vertikálně získané rezistence u *A. baumannii*, je zjevné, že při vzniku této rezistence hrají roli i další mechanismy. K těmto mechanismům může patřit dosud neprostudovaný systém RND, na jehož existenci poukázala nedávná studie Rumbo et al. (2013), nebo dosud neznámé neefluxové mechanismy (Chen et al., 2014). V této souvislosti je nutno připomenout, že v našem experimentálním uspořádání lze jednoznačně vyloučit roli horizontálně získaných mechanismů.

Naše výsledky ukazují, že přítomnost genů pro funkční efluxový systém AdeABC může být významnou selekční výhodou pro plně citlivé kmeny *A. baumannii* v prostředí obsahujícím nízké avšak na citlivé kmeny účinné koncentrace antimikrobiálních látek. Prototypem takového prostředí je nemocniční ekosystém, jenž obsahuje různé koncentrace širokého spektra antibiotik i dezinfekčních prostředků, z nichž řada je substrátem pro efluxový systém AdeABC. Je známo, že v podstatě všechny epidemické a multirezistentní kmeny *A. baumannii* disponují konstitutivně exprimovaným systémem AdeABC a to navzdory přítomnosti mnohem účinnějších mechanismů rezistence. Efluxový systém AdeABC tak může být jedním z významných předpokladů úspěchu *A. baumannii* jakožto významného nemocničního patogenu.

## 8. Souhrn

V souladu s cíly studie jsme realizovali následující kroky.

1. Podle stanovených kritérií jsme vybrali 15 genotypově odlišných kmenů *A. baumannii*

2. Selekcí na půdách s netilmicinem jsme z každého z těchto kmenů získali po dvou variantách, jež byly dále studovány.

3. Porovnali jsme antimikrobní citlivost u donorových kmenů a odvozených variant a zjistili, že varianty odvozené z kmenů s funkčně kompletním systémem AdeABC jsou oproti většině zbývajících variant kvantitativně a kvalitativně rezistentnější k antimikrobním látkám, které jsou známými substráty pro systém AdeABC.

4. Kvantifikovali a porovnali jsme expresi genu *adeB* na transkripční úrovni u sedmi donorových kmenů a z nich odvozených variant.

5. Porovnáním přítomnosti genů pro systém AdeABC, frekvence vzniku rezistentních variant, kvantitativní a kvalitativní výše vzniklé rezistence a určení exprese genu *adeB* jsme ukázali, že naše výsledky jsou v souladu s předpokladem, že systém AdeABC poskytuje citlivým kmenům *A. baumannii* potenciální selekční výhodu a může tak hrát významnou roli při vzniku jejich rezistence ke klinicky významným antibiotikům.

## 9 Seznam literatury:

**Bergogne-Bérézin, E., Towner, K.J. (1996):** *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*, 9: 148-165.

**Bolhuis, H., Vanveen, H.W., Brands, J.R., Putman, M., Poolman, B., Driessen, A.J.M., Konings, W.N. (1996):** Energetics and mechanism of drug transport mediated by the lactococcal multidrug transporter LmrP. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 24123-24128.

**Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards, J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellberg, B., Bartlett, J. (2009):** Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48: 1-12.

**Brown, M.H., Paulsen, I.T., Skurray, R.A (1999):** The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Molecular Microbiology*, 31: 393-395.

**Clinical and Laboratory Standards Institute (2011):** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Vol. 31, No. 1.

**Coyne, S., Guigon, G., Courvalin, P., Perichon, B. (2010 a):** Screening and quantification of the expression of antibiotic resistance genes in *Acinetobacter baumannii* with a microarray. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54: 333-340.

**Coyne, S., Rosenfeld, N., Lambert, T., Courvalin, P., Périchon, B. (2010 b):** Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54: 4389-4393.

**Damier-Piolle, L., Magnet, S., Bremont, S., Lambert, T., Courvalin, P. (2008):** AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52: 557-562.

**Diancourt, L., Passet, V., Nemec, A., Dijkshoorn, L., Brisse, S. (2010):** The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One*, 5: e10034.

**Dijkshoorn, L., Nemec, A., Seifert, H. (2007):** An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews Microbiology*, 5: 939-951.

**Elkins, C.A., Mullis, L.B. (2006):** Mammalian steroid hormones are substrates for the major RND- and MFS-type tripartite multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188: 1191-1195.

**Eswaran, J., Koronakis, E., Higgins, M.K., Hughes, C., Koronakis, V. (2004):** Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Current Opinion in Structural Biology*, 14: 741-747.

**Fath, M.J., Kolter, R. (1993):** ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiological Reviews*, 57: 995-1017.

**Fournier, P.E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C., Nordmann, P., Weissenbach, J., Raoult, D., Claverie, J.M. (2006):** Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Plos Genetics*, 2: 62-72.

**Helling, R.B., Janes, B.K., Kimball, H., Tran, T., Bundesmann, M., Check, P., Phelan, D., Miller, C. (2002):** Toxic waste disposal in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 184: 3699-3703.

**Heritier, C., Poirel, L., Lambert, T., Nordmann, P. (2005):** Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 3198-3202.

**Higgins, P., Wisplinghoff, H., Stefanik, D., Seifert, H. (2004):** Selection of topoisomerase mutations and overexpression of *adeB* mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54: 821-823.

**Hirakata, Y., Srikumar, R., Poole, K., Gotoh, N., Suematsu, T., Kohno, S., Kamihira, S., Hancock, R.E.W., Speert, D.P. (2002):** Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Experimental Medicine*, 196: 109-118.

**Hornsey, M., Ellington, M., Doumith, M., Thomas, C., Gordon, N., Wareham, D., Quinn, J., Lolans, K., Livermore, D., Woodford, N. (2010):** AdeABC-mediated efflux and tigecycline MICs for epidemic clones of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65: 1589-1593.

**Huys, G., Cnockaert, M., Nemec, A., Swings, J. (2005 a):** Sequence-based typing of *adeB* as a potential tool to identify intraspecific groups among clinical strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 5327-5331.

**Huys, G., Cnockaert, M., Vaneechoutte, M., Woodford, N., Nemec, A., Dijkshoorn, L., Swings, J. (2005 b):** Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals. *Research in Microbiology*, 156: 348-355.

**Chau, S.L., Chu, Y.W., Houang, E.T.S. (2004):** Novel resistance-nodulation-cell division efflux system AdeDE in *Acinetobacter* genomic DNA group 3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 4054-4055.

**Chen, Q., Li, X., Zhou, H., Jiang, Y., Chen, Y., Hua, X., Yu, Y. (2014):** Decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter baumannii* mediated by a mutation in *trm* encoding SAM-dependent methyltransferase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69: 72-76.

**Chu, Y.W., Chau, S.L., Houang, E.T.S. (2006):** Presence of active efflux systems AdeABC, AdeDE and AdeXYZ in different *Acinetobacter* genomic DNA groups. *Journal of Medical Microbiology*, 55: 477-478.

**Jawad, A., Seifert, H., Snelling, A.M., Heritage, J., Hawkey, P.M. (1998):** Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 1938-1941.

**Jones, H.E., Holland, I.B., Jacq, A., Wall, T., Campbell, A.K. (2003):** *Escherichia coli* lacking the AcrAB multidrug efflux pump also lacks nonproteinaceous, PHB-polyphosphate Ca<sup>2+</sup> channels in the membrane. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1612: 90-97.

**Kobayashi, N., Nishino, K., Yamaguchi, A. (2001):** Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183: 5639-5644.

**Kohler, T., Van Delden, C., Curty, L.K., Hamzehpour, M.M., Pechere, J.C. (2001):** Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 183: 5213-5222.

**Koretke, K.K., Lupas, A.N., Warren, P.V., Rosenberg, M., Brown, J.R. (2000):** Evolution of two-component signal transduction. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 1956-1970.

**Lopes, B.S., Amyes, S.G.B. (2013):** Insertion sequence disruption of *adeR* and ciprofloxacin resistance caused by efflux pumps and *gyrA* and *parC* mutations in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 41: 117-121.

**Magnet, S., Courvalin, P., Lambert, T. (2001):** Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 3375-3380.

**Marchand, I., Damier-Piolle, L., Courvalin, P., Lambert, T. (2004):** Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 3298-3304.

**Midgley, M., Iscandar, N.S., and Daves, E.A. (1986):** The interaction of phosphonium ions with *Acinetobacter calcoaceticus*: evidence for the operation of an efflux system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 856: 45-49.

**Mine, T., Morita, Y., Kataoka, A., Mizushima, T., Tsuchiya, T. (1999):** Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 415-417.

**Moore, R. A., Deshazer, D., Reckseidler, S., Weissman, A., Woods, D.E. (1999):** Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 465-470.

**Navon-Venezia, S., Leavitt, A., Carmeli, Y. (2007):** High tigecycline resistance in multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 772-774.

**Nemec, A., Dolzani, L., Brisse, S., van den Broek, P., Dijkshoorn, L. (2004):** Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *Journal of Medical Microbiology*, 53: 1233-1240.

**Nemec, A., Křížová, L., Maixnerová, M., Diancourt, L., van der Reijden, T.J.K., Brisse, S., van den Broek, P., Dijkshoorn, L. (2008):** Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62: 484-489.

**Nemec, A., Maixnerova, M., Van Der Reijden, T.J.K., Van Den Broek, P.J., Dijkshoorn, L. (2007):** Relationship between the AdeABC efflux system gene content, netilmicin susceptibility and multidrug resistance in a genotypically diverse collection of *Acinetobacter baumannii* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60: 483-489.

**Nikaido, H. (2003):** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67: 593-656.

**Paulsen, I. T. (2003):** Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 446–451.

**Paulsen, I.T., Skurray, R.A., Tam, R., Saler, M.H., Turner, R.J., Weiner, J.H., Goldberg, E.B., Grinius, L.L. (1996):** The SMR family: A novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Molecular Microbiology*, 19: 1167-1175.

**Peleg, A.Y., Potoski, B.A., Rea, R., Adams, J., Sethi, J., Capitano, B., Husain, S., Kwak, E.J., Bhat, S.V., Paterson, D.L. (2007):** *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 128-131.

**Pfaffl, M.W. (2001):** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): e45.,

**Piddock L.J.V. (2006):** Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 382-402.

**Poole, K. (2004):** Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 12-26.

**Putman, M., Van Veen, H.W., Konings, W.N. (2000):** Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 672-693.

**Rahmati, S., Yang, S., Davidson, A.L., Zechiedrich, E.L. (2002):** Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. *Molecular Microbiology*, 43: 677-685.

**Rajamohan, G., Srinivasan, V., Gebreyes, W. (2010):** Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65: 1919-1925.

**Roca, I., Espinal, P., Vila-Farrés, X., Vila, J. (2012):** The *Acinetobacter baumannii* OxyMORON: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. *Frontiers in Microbiology* 3: 148.

**Roca, I., Marti, S., Espinal, P., Martinez, P., Gibert, I., Vila, J. (2009):** CraA, a Major Facilitator Superfamily Efflux Pump Associated with Chloramphenicol Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53: 4013-4014.

**Rosenberg, E. Y., Ma, D., Nikaido, H. (2000):** AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. *Journal of Biology*, 182: 1754-1756.



**Rosenfeld, N., Bouchier, Ch., Courvalin, P. (2012):** Expression of the resistance-nodulation-cell division pump AdeJK in *Acinetobacter baumannii* is regulated by AdeN, a TetR-type regulator. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56: 2504-2510.

**Rumbo, C., Gato, E., López, M., Ruiz de Alegría, C., Fernández-Cuenca, F., Martínez-Martínez, L., Vila, J., Pachón, J., Cisneros, J.M., Rodríguez-Baño, J., Pascual, A., Bou, G., Tomás, M. (2013):** Contribution of Efflux Pumps, Porins, and  $\beta$ -Lactamases to Multidrug Resistance in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57: 5247-5257.

**Ruzin, A., Keeney, D., Bradford, P.A. (2007):** AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 1001-1004.

**Seward, R.J., Lambert, T., Towner, K.J. (1998):** Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. *Journal of Medical Microbiology*, 47: 455-462.

**Schuldiner, S. (2007):** When biochemistry meets structural biology: the cautionary tale of EmrE. *Trends in Biochemical Sciences*, 32: 300.

**Srinivasan, V.B., Rajamohan, G., Gebreyes, W.A. (2009):** Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53: 5312-5316.

**Su, X.Z., Chen, J., Mizushima, T., Kuroda, T., Tsuchiya, T. (2005):** AbeM, an H<sup>+</sup>-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 4362-4364.

**Sun, J.R., Chan, M.C., Chang, T.Y., Wang, W.Y., Chiueh, T.S. (2010):** Overexpression of the *adeB* gene in clinical isolates of tigecycline-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* without insertion mutations in *adeRS*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54: 4934-4938.

**Szurmant H, White RA, Hoch JA (2007):** Sensor complexes regulating two-component signal transduction. *Current Opinion in Structural Biology*, 17: 706–715.

**Thanassi, D.G., Cheng, L.W., Nikaido, H. (1997):** Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179: 2512-2518.

**Turton, J., Ward, M., Woodford, N., Kaufmann, M., Pike, R., Livermore, D., Pitt, T. (2006):** The role of *ISAbal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiology Letters*, 258: 72-77.

**Van Guilder, H.D., Vrana, K. E., Freeman, W.M. (2008):** Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44: 619-626.

**Van Veen, H.W., Konings, W.N. (1998):** The ABC family of multidrug transporters in microorganisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1365: 31-36.

**Vila, J., Marcos, F., Marco, F., Abdalla, S., Vergara, Y., Reig, R., Gomez-Lus, R., Jimenez de Anta, T. (1993):** In vitro antimicrobial production of beta-lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and chloramphenicol acetyl-transferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37: 138-141.

**Vila, J., Ruiz, J., Goñi, P., Jimenez De Anta, T. (1997):** Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39: 757-762.

**Wieczorek, P., Sacha, P., Hauschild, T., Zorawski, M., Krawczyk, M., Tryniszewska, E. (2008):** Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*-the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 46: 257-267.

**Wong, K.K.Y., Brinkman, F.S.L., Benz, R.S., Hancock, R.E.W. (2001):** Evaluation of a structural model of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprM, an efflux component involved in intrinsic antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 183: 367-374.

**Zgurskaya, H.I., Nikaido, H. (2000):** Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Molecular Microbiology*, 37: 219-225.